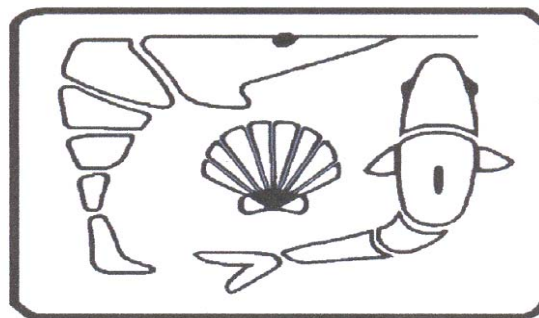




**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ACUACULTURA**



**EFECTO DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA EN  
EL CAMARÓN BLANCO, *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931), A  
DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES DE  
TEMPERATURA, SALINIDAD Y DENSIDAD DE ORGANISMOS**

**TESIS**

**Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
ALBA ROCÍO OCHOA MEZA**

**Hermosillo, Sonora.**

**Junio, 2008**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis de Alba Rocío Ochoa Meza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



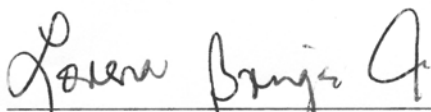
---

Dra. Reina Castro Longoria  
Co-director de Tesis  
Presidente del Jurado



---

Dr. José Manuel Grijalva Chon  
Secretario del Jurado



---

M. en C. Lorena Bringas Alvarado  
Sinodal

---

Dr. Marco Linné Unzueta Bustamante  
Co-director de Tesis  
Sinodal

## **DEDICATORIA**

*A Luís Fernando y Ana Sofía, mis dos grandes amores y mi mayor orgullo.....*

*Los Amo*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme culminar esta etapa de mi desarrollo profesional.

A la Universidad de Sonora por abrirme sus puertas y compartirme sus conocimientos.

Al SEP-CONACYT por el otorgamiento de una beca para facilitar la realización de mis estudios de Maestría.

A mis directores de tesis Dra. Reina Castro Longoria y al Dr. Marco Linné Unzueta Bustamante por su paciencia y apoyo para la elaboración de este trabajo.

A los sinodales M. C. Lorena Bringas Alvarado y Dr. José Manuel Grijalva Chon que con su colaboración enriquecieron y facilitaron el desarrollo de esta investigación.

Al Centro de Promoción a la Acuicultura CPA del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey por las facilidades otorgadas en los laboratorios para el experimental de este trabajo.

A todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron en la realización de este trabajo de investigación.

## CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS .....	.vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ABSTRACT .....	x
I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....	1
II. OBJETIVOS .....	10
II.1 General .....	10
II.2. Particulares.....	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
III.1. Unidades experimentales.....	11
III.2. Reactivación del virus WSSV .....	11
III.3. Preparación del material para alimentación.....	12
III.4. Bioensayos con Densidad.....	12
III.5. Bioensayos con Temperatura.....	13
III.6. Bioensayos con Salinidad.....	14
III.7. Procesado de las muestras.....	15
III.8. Análisis Histológico.....	15
III.9. Análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
III.10. Medidas de bioseguridad.....	17
III.11. Análisis de datos.....	18
IV. RESULTADOS.....	19
IV.1. Densidad.....	19
IV.1.1. Signos clínicos.....	19
IV.1.2. Supervivencia.....	20
IV.1.3. Análisis Histológico.....	21
IV.1.4. PCR.....	27
IV.2. Temperatura.....	28
IV.2.1. Signos clínicos.....	28
IV.2.2. Supervivencia.....	29
IV.2.3. Análisis Histológico.....	30
IV.2.4. PCR.....	33
IV.3. Salinidad.....	34
IV.3.1. Signos clínicos.....	34
IV.3.2. Supervivencia.....	35
IV.3.3. Análisis Histológico.....	36
IV.3.4. PCR.....	39
V. DISCUSIONES.....	40
VI. CONCLUSIONES.....	46
VII. RECOMENDACIONES.....	47
VIII. LITERATURA CITADA.....	48
APENDICES.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Esquematización de la relación ambiente- patógeno – hospedero donde se ilustran las rutas que puede seguir una infección en referencia a la actividad del ambiente 1a) la acción del ambiente es equilibrada tanto para el hospedero como para el patógeno, no hay presencia de enfermedad; 1b) la acción del ambiente es favorable para el patógeno, hay evidencia de enfermedad; 1c) la acción del ambiente es favorable para el hospedero, no hay presencia de enfermedad; el ambiente favorece la exclusión del patógeno del sistema de cultivo, 1d). Tomado de Lightner y Redman, (1998).	5
2	Típicos resultados de diagnóstico generados por el sistema de prevención y detección IQ2000 TM para WSSV. Se utilizó para la detección del grado de severidad en los bioensayos del presente estudio.	17
3	Organismo moribundo de <i>L. vannamei</i> infectado con WSSV donde se observó la expansión de cromatóforos rojos indicados por las flechas.	19
4	Supervivencia de los organismos de <i>L. vannamei</i> inoculados con WSSV y expuestos a diferentes densidades.	21
5	Corte histológico a 3 $\mu\text{m}$ de cámara gástrica en donde solo se observa infiltración hemocítica sin cuerpos de inclusión en organismos mantenidos a densidad de 6.6 org/m <sup>2</sup> en el bioensayo densidad y WSSV.	22
6	Corte histológico a 3 $\mu\text{m}$ de branquia de <i>L. vannamei</i> con cuerpos de inclusión característicos a WSSV en organismos del bioensayo con densidad de 19.8 org/m <sup>2</sup> . 40x.	23
7	Corte histológico a 3 $\mu\text{m}$ de glándula antenal donde se observan los cuerpos de inclusión característicos a WSSV en organismos de <i>L. vannamei</i> del bioensayo con densidad de 26.5 org/m <sup>2</sup> . 40x.	23
8	Corte histológico a 3 $\mu\text{m}$ de órgano linfoide donde se observan los cuerpos de inclusión característicos a WSSV en organismos de <i>L. vannamei</i> del bioensayo con densidad de 33.1 org/m <sup>2</sup> . 40x.	24
9	Medias y diferencias estadísticas entre tratamientos del bioensayo con densidad de organismos.	25

10	Gel de agarosa al 2% donde se aprecian los productos de amplificación de los diferentes tratamientos del bioensayo con densidad de <i>L. vannamei</i> desafiados con WSSV. Los carriles del 1-6 fueron los distintos tratamientos: 6.6 (ligero), 13.2 (severo), 19.8 (ligero), 26.5 (severo), 33.1 (ligero) y 39.8 org/m <sup>2</sup> (severo). 7 y 8 son control negativo y positivo.	28
11	Organismo del ensayo con temperatura infectado con WSSV en donde se observa la expansión de cromatóforos en el exoesqueleto.	29
12	Supervivencia de los organismos inoculados con WSSV y mantenidos en diferentes temperaturas.	30
13	Medias y diferencias estadísticas entre tratamientos del bioensayo con temperatura.	31
14	Gel de agarosa al 2% donde se aprecian los productos de amplificación de los diferentes tratamientos del bioensayo con temperatura de <i>L. vannamei</i> desafiados con WSSV. Los carriles del 1-10 fueron los distintos tratamientos, carril 1-3 22 °C (ligero), 4-5, 24 (severo), 6-7, 26 (mediano), 8-9, 28 (mediano), carril 10, 30 °C (ligero), 11 y 12 fueron control negativo y positivo respectivamente.	33
15	Gel de agarosa al 2% donde se aprecian los productos de amplificación de los diferentes tratamientos del bioensayo con temperatura de <i>L. vannamei</i> desafiados con WSSV. El carril 1 fue de 30 °C (ligero) y los carriles 2-3, fueron de 32 °C (ligero) carriles 4 y 5 control negativo y positivo respectivamente.	34
16	Organismos moribundos infectados con WSSV en el ensayo con salinidad con presencia de expansión de cromatóforos, letargia y nado lento.	34
17	Porcentaje de supervivencia de los organismos de <i>L. vannamei</i> inoculados con WSSV y mantenidos en diferentes salinidades.	35
18	Medias y diferencias estadísticas entre tratamientos del bioensayo con salinidad.	37
19	Gel de agarosa al 2% donde se aprecian los productos de amplificación de los organismos usados en el bioensayo Salinidad–WSSV donde los carriles 1-3 fueron de 35 ups, 4-5 fueron de 40 ups, 6-7 para 45 ups y 8, 9, y 10 para 50 ups. Los carriles 11 y 12 fueron control negativo y positivo respectivamente.	39



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
I	Número de camarones de <i>L. vannamei</i> utilizados para bioensayos de densidad, temperatura y salinidad.	11
II	Número de camarones de <i>L. vannamei</i> por tratamiento con WSSV para densidad por pecera, basado en el área de cada pecera (0.15 m <sup>2</sup> ) y de acuerdo con las densidades usadas en los sistemas de cultivo.	13
III	Criterio de evaluación del grado de severidad por infección viral en <i>L. vannamei</i> tomada de Lightner (1996) definida por el número de cuerpos de inclusión intranucleares que van de basofílicos a eosinofílicos (CAI'S)* presentes en los tejidos de los órganos blanco.	16
IV	Cuadro clínico en las distintas densidades de camarones y prevalencia observada en el bioensayo con <i>L. vannamei</i> sujeto a una infección con WSSV.	20
V	Grado de severidad (GS) por tratamiento en el bioensayo con densidad de organismos y WSSV.	24
VI	Medias de cuerpos de inclusión por órgano según densidades probadas en los bioensayos con WSSV sobre <i>L. vannamei</i> .	26
VII	Grado de severidad (GS) por órgano en cada tratamiento del bioensayo con densidad de organismos.	27
VIII	Grado de severidad (GS) por tratamiento del bioensayo con temperatura y WSSV.	30
IX	Medias de cuerpos de inclusión por órgano en <i>L. vannamei</i> en el bioensayo con temperatura.	32
X	Promedio de cuerpos de inclusión por órgano en el bioensayo con temperatura.	33
XI	Grado de severidad (GS) por tratamiento del bioensayo con salinidad.	36
XII	Efecto de la salinidad sobre la aparición de cuerpos de inclusión por órgano.	38
XIII	Grado de severidad y promedio de cuerpos de inclusión (CAI'S) por órgano en los tratamientos de salinidad expuestos a WSSV.	38

## RESUMEN

La producción de peneidos de cultivo ha aumentado a nivel mundial en las últimas décadas. Esta actividad tiene gran importancia en América y esta basada en el camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, pero las enfermedades virales es uno de los más graves problemas en los rendimientos de cultivo. Recientemente una de estas enfermedades virales con efectos notables sobre la actividad acuícola ha sido el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV por sus siglas en inglés). Debido a la importancia del cultivo de camarón para el Noroeste de México, se ha trabajado para poner a prueba experimentalmente la virulencia del WSSV con la densidad de los organismos, la salinidad y temperatura. Las pruebas se llevaron a cabo en camarones de *Litopenaeus vannamei* infectados con WSSV y en densidades intensiva, semiintensiva y extensiva bajo condiciones de laboratorio. La salinidad fue probada a 35, 40, 45 y 50 ups (unidades prácticas de salinidad) y estos valores fueron escogidos porque son los más comunes en las granjas del Norte. También se probaron las temperaturas prevalentes en las granjas de 22, 24, 26, 28, 30 y 32 ° C. El análisis de los camarones fue hecho por histopatología convencional y protocolos de PCR. Los resultados demostraron que la mayor densidad produjo daños graves en los camarones debido a la presencia del WSSV. La temperatura entre 28 y 30 ° C provocó mayor susceptibilidad en los camarones. La salinidad de 35 y 40 ups dió lugar a los daños más notorios en los camarones. Estos datos apoyan firmemente que las variables probadas pueden ocasionar graves problemas para el manejo de los sistemas de cultivo, en cuyo caso es muy importante tener en cuenta los valores menores de densidad, temperatura y salinidad con el fin de obtener un cultivo de *Litopenaeus vannamei* más sano y eficiente.

## ABSTRACT

Worldwide aquaculture has been increasing yields in farming penaeids during the last decades. This activity has high relevance in the Americas based up on the white Pacific Shrimp, *Litopenaeus vannamei* but the viral diseases is one of the more serious problems in cropping yields. Recently one of these viral diseases with remarkable effects on aquacultural activity is the White Spot Syndrome Virus (WSSV). Because their relevance to the Northwest Mexican shrimp farming, we challenged shrimp WSSV in order to test experimentally its virulence with the density of the organisms. Salinity and temperature were proven at different levels. Tests were carried out with infected WSSV *L. vannamei* shrimps, at the semi intensive, semi extensive and intensive density under laboratory conditions. Salinities were proven at 35, 40, 45 and 50 psu; these values were chosen because presents the environmental conditions in Northern farms. Also prevalent temperatures in farms were tested at 22, 24, 26, 28, 30 and 32 °C. Analysis on challenged shrimps was done by conventionally histopathology and by PCR protocols. The results demonstrated that the higher density resulted in severe damaged shrimps due to the presence of the virus WSSV. The temperature between 28 and 30 °C provoked higher susceptibility to the shrimps. The salinities of 35 and 40 psu resulted in the most severe WSSV shrimp damage. These data supports the contention that these proven experimentally variables may result in serious problems for management culturing systems, in which case it is very important to consider the low values of density, temperature and salinity in order to obtain a healthier and efficient culture of *L. vannamei*.

## I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La demanda de productos acuícolas alrededor del mundo se ha incrementado en los últimos 40 años, es por eso que esta industria ha crecido de manera acelerada. De acuerdo a las estadísticas de la FAO (2004), la acuicultura continúa siendo la actividad de producción de alimentos que más rápido crece a nivel global ya que se ha incrementado a una tasa promedio de 8.9 % por año desde 1970; comparado con las capturas de la pesquerías que solo han alcanzado 1.2 % y otras actividades pecuarias 2.8 % en el mismo periodo de tiempo. En 1970 la demanda *per capita* de alimentos acuícolas para la población mundial fue de 0.7 Kg hasta 6.4 Kg en 2002; lo que representó una tasa anual de crecimiento promedio de 7.2 %, mucho más alto que la tasa de crecimiento de la población mundial (FAO, 2004).

La camaronicultura es una de las ramas de la acuicultura que más desarrollo ha presentado debido al alto valor económico del camarón en el mercado. Actualmente los volúmenes de producción en el mundo rebasan ya el millón de toneladas y contribuyen con más del 30% de la producción total de éste crustáceo. No obstante, la acelerada producción ha presentado altibajos como cualquier actividad productiva ya que se presentan tanto factores que la favorecen como aquellos que la afectan. En dicho contexto, para evitar efectos indeseados en los cultivos, hay aspectos prioritarios en el manejo de granjas de camarón tales como la calidad de agua, la temperatura así como la salinidad que influyen de manera determinante en la producción (Martínez-Córdova, 2002).

En México, la actividad camaronícola ha tenido un crecimiento explosivo en los últimos 10 años; con una producción de poco más de 10,000 ton en 1990 se incrementó a más de 20,000 ton en el año 2000 (Martínez-Córdova, 2002). Posteriormente alcanzó las 62,361 ton en 2003 (SAGARPA, 2003).

Las principales especies comerciales de peneidos que se han cultivado en el Pacífico mexicano son el camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) y el camarón azul, *P. stylirostris* (Stimpson, 1871). En el Golfo de México y Caribe Mexicano el camarón blanco, *Penaeus setiferus*, es la especie más cultivada (Cifuentes-Lemus *et al.*, 1997). Actualmente la especie más cultivada es el camarón blanco del Pacífico, *L. vannamei*, el cual habita distintos ambientes acuáticos, desde los estuarinos hasta los de agua dulce. Su habilidad

inherente a tolerar un amplio intervalo de variaciones de salinidad es la clave para su supervivencia (Nunes y Velásquez- López, 2002).

De años recientes a la fecha las potencialidades de crecimiento en la acuicultura en México con la especie antes citada han sido importantes. Sin embargo, se debe encontrar soluciones a los problemas relacionados con el control del proceso reproductivo, manejo de sistemas de producción, aspectos sanitarios y capacitación del personal, a fin de aumentar las expectativas productivas (Martínez-Córdova, 2002).

Son muchos los factores que intervienen para determinar el éxito o fracaso de una empresa acuícola, pero indudablemente que el conocimiento y manejo de los aspectos ecológicos es uno de los de mayor importancia. Por otro lado los puntos básicos que un acuicultor debe considerar para realizar un cultivo son: los requerimientos ambientales de la especie a cultivar como la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH y densidades de siembra, entre otros, como el conocimiento de las comunidades bióticas del sistema y su relación con la población y finalmente el impacto que llegue a ocasionar sobre el ambiente (Martínez-Córdova, 2002).

De los factores abióticos, la temperatura es uno de los más importantes que afectan a los animales acuáticos, ya que influye sobre el metabolismo, el consumo de oxígeno, la tasa de crecimiento, el ciclo de muda y la tasa de sobrevivencia (Cheng y Chen, 2000). Los organismos pueden clasificarse según su tolerancia a la temperatura en euritermos y estenotermos, de amplio y estrecho intervalo de soporte. Los primeros se registran con mayor frecuencia en las costas. Sin embargo, en máximos térmicos presentan problemas de sobrevivencia por encontrarse en el límite superior de la tolerancia.

El incremento de la temperatura aumenta el metabolismo y en consecuencia los requerimientos energéticos. Los cambios en ésta afectan también de manera indirecta cuando se asocian con cambios en salinidad y concentración de oxígeno disuelto (Le Moullac y Haffner, 2000). En cuanto a la salinidad, los sistemas costeros pueden presentar un gradiente salino espacial y temporalmente variable, lo cual también depende de la latitud, el clima y la morfología locales.

En climas húmedos con aportes fluviales regulares, la salinidad tenderá a mantenerse oligohalina; en las latitudes tropicales en épocas de lluvia se puede registrar el gradiente de agua dulce a la marina, siempre y cuando las bocas se mantengan abiertas, pero durante la

sequía, por las altas tasas de evaporación se incrementa la salinidad heterogéneamente con la influencia de la batimetría. En ambos casos la salinidad puede fluctuar diaria o mensualmente en función de la marea y estacionalmente en la mayoría de las veces por el caudal de los ríos. Así mismo, la salinidad influye en la distribución de los organismos y a nivel funcional en la reproducción, nutrición y crecimiento.

Mientras algunas especies de peneidos son consideradas estenohalinas, por tener la habilidad de vivir solamente en un estrecho intervalo de salinidad, varias especies son eurihalinas y capaces de soportar fluctuaciones repentinas de hasta 10 ups (unidades prácticas de salinidad). Dentro de las especies eurihalinas se encuentra el camarón blanco del Pacífico *P. vannamei* que puede habitar en salinidades que van de 1-40 ups (Bray *et al.*, 1994), siendo su límite máximo de tolerancia 45 ups. A esta especie y al camarón tigre de Asia (*P. monodon*) se les considera como fuertes osmoreguladores (Nunes y Velásquez-López, 2002).

La camaronicultura en el noroeste de México se ha desarrollado con el camarón blanco del Pacífico en salinidades que van desde 38-40 ups y temperaturas que van desde los 18-33 °C (COSAES, 2006). Para el camarón blanco, estos valores podrían resultar bajos ya que según Boyd (1989) en esta región se han presentado cultivos de hasta 59 ups, pero el límite ideal para esta especie es de 15-25 ups.

Otro de los factores primordiales que se consideran para el cultivo de camarón es la densidad de organismos por área determinada. En México se han considerado tres sistemas de producción: semiextensivo, semiintensivo e intensivo. En el semiextensivo las granjas regularmente tienen estanques de 10-50 ha con bajas densidades de siembra de 8-12 organismos por metro cuadrado ( $\text{org}/\text{m}^2$ ) de siembras directas y alimentación suplementaria. En el semiintensivo las granjas generalmente presentan estanques de 5-10 ha con densidades de 15-30  $\text{org}/\text{m}^2$ , con siembras directas o sistemas de precría y con alimentación suplementaria. Las granjas intensivas son escasas en el país y utilizan estanques de 1-2 ha con aireación y densidades de 40-50  $\text{org}/\text{m}^2$  de siembra directa y con alimentación suplementaria (Gutiérrez-Venegas, 2005).

Además de las consideraciones anteriormente citadas en el cultivo de camarón, el mayor reto que enfrenta la camaronicultura es el impacto causado por las enfermedades y la interacción de éstas con las variables ambientales. En México son pocos los estudios sobre los efectos de las variables fisicoquímicas en presencia de patógenos como la temperatura y la

salinidad en los camarones peneidos, así como el estudio del impacto de la cantidad de animales en cultivo, como la densidad.

La fisiología en algunas especies de crustáceos ha sido estudiada por Mantel y Farmer (1983) quienes observaron que la capacidad de los peneidos para adaptarse a cambios en temperatura y salinidad es el principal factor para su supervivencia. Los cambios en el ambiente salino provocan un desbalance osmótico de la hemolinfa lo cual conduce a que el organismo no se encuentre en las condiciones óptimas para desarrollarse (McFarland y Lee, 1983).

Para optimizar las condiciones de producción es necesario investigar el efecto de la temperatura y la salinidad en la fisiología, crecimiento y reproducción de la especie, así como su efecto en presencia de otros factores, como los agentes patógenos (Chen y Lin, 1994). Paralelo al crecimiento acelerado de esta actividad en México durante los últimos años, se han presentado una serie de problemáticas que han afectado la producción. La problemática más importante son las enfermedades, consideradas como el mayor impedimento para el aumento de la producción. Por ello, los cultivos incluyen un riesgo y éste se disminuirá según la capacitación del productor y el manejo adecuado que haga del cultivo (Garza *et al.*, 1997). A su vez, la interacción de las variables ambientales en el sistema de cultivo son de vital importancia ya que la relación ambiente-patógeno-hospedero determina la virulencia sobre la especie en cultivo (Lighthner, 1996).

En el rubro ambiental, las variables como densidad de organismos, temperatura y salinidad juegan un papel primordial en el desarrollo o inhibición de enfermedades. Una enfermedad es el resultado final de una compleja interacción de los organismos, su ambiente y el patógeno (Lightner y Redman, 1998). El diagnóstico de las enfermedades de crustáceos es de suma importancia y deben de considerarse la relación ambiente-patógeno (Fig. 1) ya que en muchas de ellas se desconoce *a priori* el agente causal. Por otro lado, se ha demostrado ampliamente que las enfermedades dependen del tipo de sistema de cultivo empleado, es decir, que mientras más intensos sean los cultivos mayores serán los riesgos y el número de problemas con el que se puede encontrar la capacidad de producción (Lightner, 1996).

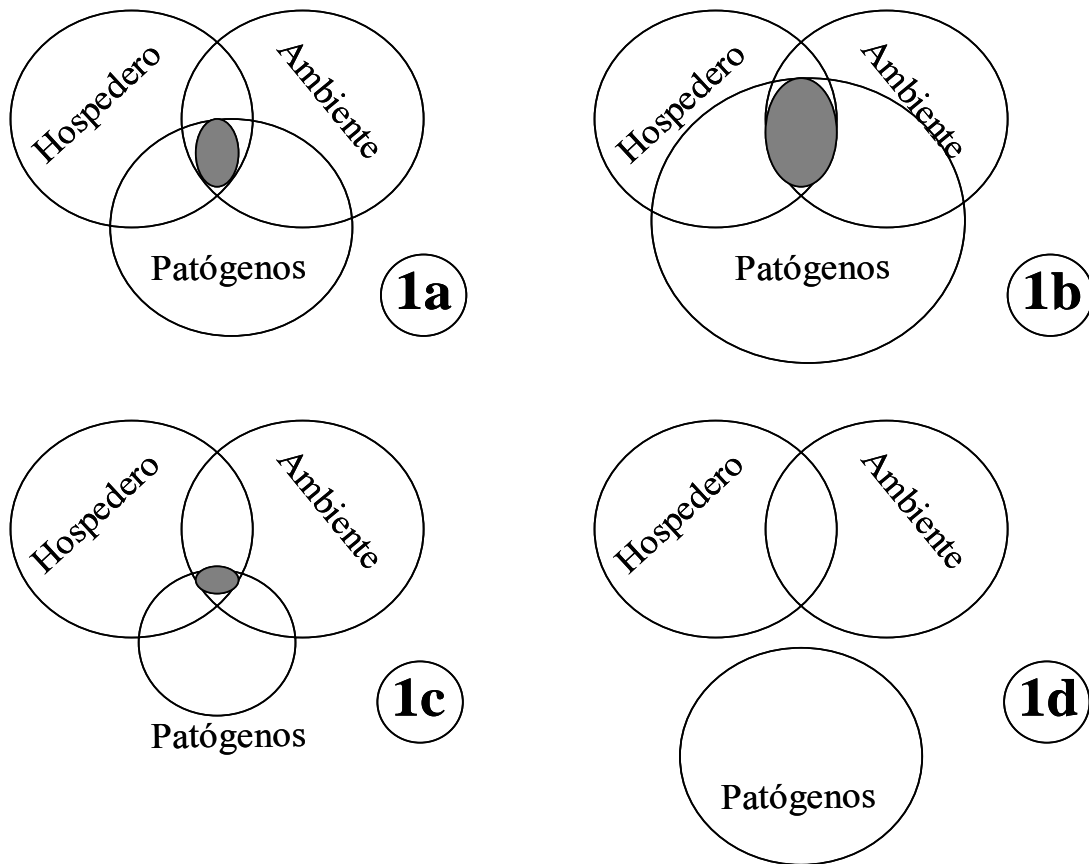


Figura 1. Esquematzación de la relación ambiente-patógeno-hospedero donde se ilustran las rutas que puede seguir una infección en referencia a la actividad del ambiente, 1a) la acción del ambiente es equilibrada tanto para el hospedero como para el patógeno, no hay presencia de enfermedad; 1b) la acción del ambiente es favorable para el patógeno, hay evidencia de enfermedad; 1c) la acción del ambiente es favorable para el hospedero, no hay presencia de enfermedad; 1d) el ambiente favorece la exclusión del patógeno del sistema de cultivo. Tomado de Lightner y Redman (1998).

Para determinar el estado de salud de un organismo se deben tomar en consideración los diferentes componentes del entorno del mismo y considerar al patógeno como el factor determinante de la presencia de una enfermedad. En este contexto, si la presencia de un solo patógeno o la suma de varios de ellos incrementan el desequilibrio en conjunto de los diferentes componentes presentará mayor probabilidad a sucumbir ante la presencia de éste e inversamente, cuando el hospedero se encuentra en condiciones adecuadas cuando se presenta una baja virulencia del patógeno. Sin embargo, lo ideal es la exclusión del patógeno permitiéndole al hospedero regular su fisiología (Lightner, 1996).



Al hablar de enfermedades en crustáceos se pueden considerar a patógenos tan diversos como bacterias que incluyen la vibriosis, enfermedad del caparazón, la enfermedad bacteriana de las branquias y la enfermedad de las branquias negras. También Rickettsias, necrohepatopancreatitis (NHP), hongos, micosis larval y aflatoxicosis. Para enfermedades parasitarias podemos tener protozoarios ciliados epicomensales, protozoarios parásitos como gregarinas, microsporidios (camarón de leche), así como las virales entre las que se encuentran el virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV), Virus del Síndrome del Taura (TSV), Virus de la Cabeza Amarilla, (YHV) y el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca, WSSV (Lightner, 1996).

Dentro de las enfermedades, las virales son las que en los últimos años han causado un mayor índice de mortalidades con las consecuentes pérdidas económicas en los cultivos de camarón. Entre los de mayor importancia se citan aquellas que han provocado pérdidas considerables como el TSV, WSSV, YHV e IHHNV (Lightner, 1996). Por ejemplo, dichos virus en términos económicos han generado pérdidas en La Republica Popular de China por 250 millones de dólares en 1993; en India para 1994-1995 fueron 17.6 millones de dólares; en Tailandia en 1997 se tuvieron pérdidas por 600 millones de dólares; en Ecuador en el 2000 se perdieron 400 millones de dólares (Hill, 2000). Como México no es la excepción, en el año 2000 se presentaron pérdidas cuantificadas en 30.2 millones de pesos (SAGARPA, 2000).

La diseminación de las enfermedades ha afectado a muchas de las regiones de cultivo de camarón en el mundo. Los esfuerzos realizados por tratar de disminuir estos problemas no han surtido mucho efecto, por ejemplo las restricciones a las importaciones de organismos se han pasado por alto ya que estos se mueven sin ninguna certificación o proceso de selección, lo cual favorece la proliferación de patógenos (Lightner *et al.*, 1992; Wyban *et al.*, 1992; Pruder *et al.*, 1995; Newman, 1999).

El virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV por sus siglas en inglés) es un organismo que es clasificado en la base de datos universal de virus (ICVTdb) como un Whispo-virus de la familia Nimaviridae, baciliforme de 70–150 nm por 275–380 nm y cuyo genoma consiste de una doble cadena de ADN (dsDNA) de 293-305 kb (Vlak *et al.*, 2002). El WSSV fue descrito primeramente en el noreste de Asia en 1992-1993 y rápidamente se observó su dispersión a otros países, principalmente en Indonesia, Taiwán, Vietnam, Malasia e India. En el continente americano, se informó de su presencia por primera vez en el sur del

estado de Texas en Noviembre de 1995 en granjas de cultivo de *Penaeus setiferus* (Lightner, 1996). Las infecciones naturales del WSSV han sido previamente señaladas en *P. monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, *F. indicus*, *F. merguensis*, *Marsupenaeus japonicus* y *P. setiferus* (Lo *et al.*, 1999). También se han observado infecciones naturales en un gran número de otras especies de crustáceos decápodos como cangrejos, cangrejos de río, langostas y camarones y puede afectar a otros crustáceos, aunque en estas especies la enfermedad no es letal (Lightner, 1996).

En enero de 1999, la presencia del WSSV fue detectada en muestras de tejidos de camarones de granjas en tres países centroamericanos: Nicaragua, Guatemala y Honduras. El reporte inicial fue en Honduras, donde a mediados de enero los organismos de cultivo mostraron signos de estrés, que fueron considerados no comunes para el periodo de cultivo. Los signos observados fueron similares a los asociados con el síndrome de Taura (Jory, 1999).

Actualmente en México, principalmente en el noroeste del país, el WSSV es uno de los más importantes debido a los estragos que ha causado en los cultivos desde el momento de su diagnóstico (SAGARPA, 2004). Los brotes de WSSV pueden producirse en cualquier estación del año y en todas las fases de cría de los camarones, aunque probablemente las fluctuaciones drásticas en las condiciones ambientales podrían favorecer dichos brotes. Hipotéticamente, otros factores favorecerían el desencadenamiento de brotes de WSSV, como el estrés provocado por la presencia de residuos químicos e insecticidas (Chang *et al.*, 1998).

Los animales afectados por WSSV generalmente despliegan signos de enfermedad tales como depósitos blancos de calcio en la cutícula, pigmentación cuticular desde rosada a café debido a la expansión de sus cromatóforos, letargia, disminución del consumo de alimento, nado lento y permanencia en las orillas de los estanques. Las mortalidades del 100% ocurren entre los 3 a 10 días después de presentarse los primeros signos de enfermedad (Lightner, 1996). Debido a dicha respuesta y del problema desde sus inicios en Asia en forma drástica y rápida, se hizo evidente la necesidad de un sistema que permitiera establecer los focos infecciosos para tomar medidas y así evitar la dispersión del patógeno. Dadas las condiciones de la industria camaronera era necesario que este sistema fuese simple, ágil y poco costoso de operar.

Ante el escaso progreso en la implementación de las técnicas de manejo que permitieran incrementar los niveles de producción del cultivo de camarón hasta un punto en que la actividad volviera a ser rentable en algunas partes del mundo, varios productores empezaron a realizar pruebas de cultivos intensivos en lo que se denominó tierras altas, es decir dentro del continente y no en áreas costeras. Estos sistemas consistieron de estanques pequeños ( $\leq 1$  ha) con agua proveniente de pozos con salinidades menores de 7 ups. Los cultivos de camarón en bajas salinidades se han trasladado incluso hasta áreas desérticas costeras que, aunque no son muchas, han comenzado a desarrollarse en Arabia Saudita aprovechando las especies nativas como *Penaeus semisulcatus*, *P. indicus*, *P. latisulcatus*, *P. monodon* y *Metapenaeus affinis* (Limsuwan, 2001).

En México, también se ha desarrollado el cultivo de camarón en zonas áridas. Sin embargo, los factores que comúnmente sensibilizan al camarón blanco ante WSSV son temperaturas y salinidades variables, según datos disponibles de COSAES (2006) en el noroeste de México; específicamente en algunas regiones del estado de Sonora. Se han realizado estudios con diferentes rangos de salinidades con exposición a WSSV como los realizados por Ochoa–Meza, *et al.* (2006) y Carvajal–Sánchez, *et al.* (2008) quienes mencionan que los organismos cultivados en salinidades entre 10 y 15 ups manifiestan mayor susceptibilidad a WSSV que aquellos mantenidos en salinidades entre 2-5 ups. Las variaciones de temperaturas y salinidades a lo largo del ciclo de cultivo son muy comunes en estos cultivos, lo que provoca mayor sensibilidad de los organismos ante WSSV. En dicho contexto el estrés experimentado por los organismos puede ser un detonante aprovechado por patógenos como el WSSV.

La transmisión del WSSV es una de las principales preocupaciones de los productores camaronícolas ya que adicionalmente a lo ya citado previamente, existen otros factores que pueden actuar como vectores de enfermedades; por ejemplo las fuentes de agua que regularmente son descargadas sin ningún control, el uso de organismos silvestres, la actividad humana, así como las aves y especialmente las escasas medidas de bioseguridad existentes. Lightner (1993) y Bachère *et al.* (1995) mencionan que la sustentabilidad de la producción camaronícola reside en el equilibrio de la calidad del ambiente. También la prevención de enfermedades, su diagnóstico y epidemiología así como el estado de salud de los animales reside en medidas estrictas de bioseguridad.

Los aspectos a considerar y que estarían estrechamente asociados a la temperatura en la infección por WSSV son los hospederos, las múltiples vías de infección, la gran velocidad de replicación del virus, su poder de propagación y el estado fisiológico del huésped (Wang *et al.*, 1997). Otros factores de cultivo son la salinidad y la densidad de organismos en cultivo (Lightner y Redman, 1998). La susceptibilidad a WSSV por *L. vannamei* es mayor a temperaturas inferiores a 29 °C, contrariamente se han documentado supervivencias al 100 % en camarones desafiados con WSSV en condiciones de hipertermia (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002).

El efecto dramático de la temperatura sobre la susceptibilidad del camarón blanco al WSSV, ha promovido con éxito el establecimiento en el Ecuador de cultivos intensivos en piscinas cubiertas (invernaderos) a fin de mantener la temperatura arriba de los 31 °C (Calderón y Sonnenholzner, 2003). Rodríguez *et al.*, (2003) mencionan que en estanques comerciales se han observado mayores pérdidas en la estación fría-seca que en la estación cálida-lluviosa. Esto debido a que las temperaturas en dicha estación son más frías y por tanto los organismos son más susceptibles al WSSV.

Con respecto a la experimentación controlada de WSSV en laboratorio, se han realizado infecciones mediante inyección, inmersión e ingestión (Takahashi *et al.*, 1994). Las infecciones por inyección tienen la ventaja de permitir una infección mucho más rápida para experimentación controlada ya que violan la primera barrera natural de defensa del camarón que es la cutícula así como los mecanismos de defensa a ella asociados (Corbel *et al.*, 2001). Al contrario de la inyección, las infecciones realizadas por ingestión de alimento contaminado por el virus representarían una vía natural de ingreso al organismo (Lightner *et al.*, 1998). Las infecciones experimentales por inmersión de camarones en agua con solo el virus de WSSV realizadas en *L. vannamei* por Wu *et al.* (2001) han demostrado que ésta constituye un vehículo de transmisión, lo cual es potencialmente peligroso por las altas cargas virales producto de camarones infectados en los estanques de cultivo. Con base en lo anterior se puede plantear la hipótesis que las variables físico-químicas como salinidad y temperatura y a su vez las densidades que se presentan en los estanques de producción en los diferentes sistemas, pueden representar una marcada influencia en la susceptibilidad a la enfermedad de los organismos, es por eso que mediante el presente trabajo se evaluó la respuesta del camarón blanco ante variaciones de estos factores en presencia de patógenos virulentos como el WSSV.

## **II. OBJETIVOS.**

### **II.1 General.**

Evaluar la respuesta del camarón blanco *L. vannamei* ante la infección experimental con WSSV sometido a diferentes variables de temperatura, densidad de organismos y salinidad.

### **II.2. Particulares.**

- ❖ Evaluar la susceptibilidad del camarón blanco expuesto a WSSV en diferentes densidades de cultivo: 6.6 org/m<sup>2</sup> (sistema extensivo); 13.2, 19.8, 26.5, 33.1 org/m<sup>2</sup> (sistema semiintensivo) y 39.8 org/m<sup>2</sup> (sistema intensivo).
  
- ❖ Determinar la sensibilidad del camarón blanco ante WSSV a las temperaturas de 22, 24, 26, 28, 30 y 32 °C.
  
- ❖ Evaluar el efecto que presenta una infección por WSSV en camarón blanco cultivado en diferentes salinidades: 35, 40, 45 y 50 ups.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### III.1. Unidades experimentales.

Se realizaron bioensayos en las instalaciones del Centro de Promoción a la Acuicultura (CPA) del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM) Campus Guaymas. Para lo cual se utilizaron 57 peceras de plástico de 60 L, al 35% de su capacidad (20 L) con agua marina previamente filtrada a 1 y 5  $\mu\text{m}$ , con aireación constante. En los bioensayos se utilizaron adultos de la especie *L. vannamei* para los factores de densidad de organismos, temperatura y salinidad. La cantidad de camarones para cada factor varió así como el peso. En el bioensayo con salinidad se usaron organismos con un menor peso, debido a la disponibilidad de éstos en el momento de poner en marcha el bioensayo (Tabla I). En todos los casos se usaron organismos procedentes del CPA-ITESM y de un laboratorio comercial de producción de postlarva.

Tabla I. Número de camarones de *L. vannamei* utilizados para bioensayos de densidad, temperatura y salinidad.

	BIOENSAYOS		
	Densidad	Temperatura	Salinidad
Número de camarones	63	108	72
Peso promedio (g) y desviación estándar	16.19 $\pm$ 2.38	21.11 $\pm$ 2.79	3.97 $\pm$ 1.09

#### III.2. Reactivación del virus WSSV.

Para llevar a cabo el experimental, primeramente se reactivó el virus de WSSV. En una pecera se colocaron tres organismos de 17.4 g a los que se les aplicaron 200  $\mu\text{L}$  (vía inyección intramuscular) de un homogenizado de camarón positivo a WSSV, determinado por la técnica de Shrimple para inmunoensayo (Shrimple EnBioTec Laboratories Co., Ltd.) y confirmado por PCR con el juego de reactivos IQ 2000, siguiendo las especificaciones de uso del fabricante (Farming IntelliGene Tech. Corp.). Se pesó y maceró 1 a 2 g de cefalotórax sin pedúnculo ocular y hepatopancreas en 3 ml de solución estéril de NaCl al 0.9%. Se centrifugó

durante cinco minutos a 500 X g y una vez obtenido el sobrenadante, éste se tomó para su comprobación. Una vez que el resultado del inóculo fue positivo a WSSV, se administró a dos organismos de 14 g de peso promedio a razón de 200 µL por organismo vía inyección intramuscular. Con estos camarones infectados se contó con material para la preparación del alimento para la inoculación de los bioensayos.

### **III.3. Preparación del material para alimentación.**

Para alimentar oralmente a los camarones de los bioensayos con densidad, temperatura y salinidad se realizó una nueva inoculación a 10 organismos de 14 g de peso promedio vía inyección intramuscular a razón de 140 µL por camarón con los dos organismos utilizados en la reactivación de WSSV.

### **III.4. Bioensayos con Densidad.**

Se colocaron los organismos a densidades de 6.6, 13.2, 19.8, 26.5, 33.1 y 39.8 org/m<sup>2</sup> en tres unidades experimentales por tratamiento. Para observar las diferencias naturales asociadas a la densidad y el estrés sin patógeno se colocaron controles negativos en los tratamientos de mayor densidad (26.5, 33.1 y 39.8 org/m<sup>2</sup>). Los tratamientos de menores densidades no contaron con un control negativo debido a que se consideró que el bajo número de organismos no representaría un factor de cambio por efecto de densidad ya que se encontraban de 1 a 2 organismos en cada pecera, y fueron mantenidos a 27 °C y a 35 ups de salinidad. (Tabla II).

Tabla II. Número de camarones de *L. vannamei* por tratamiento con WSSV para densidad por pecera, basado en el área de cada pecera (0.15 m<sup>2</sup>) y de acuerdo con las densidades usadas en los sistemas de cultivo.

	Tratamientos org/m <sup>2</sup>	Sistema de cultivo	Organismos por pecera
Con control negativo	6.6	Extensivo	1
	13.2	Semiintensivo	2
	19.8	Semiintensivo	3
	26.5	Semiintensivo	4
	33.1	Semiintensivo	5
	39.8	Intensivo	6

Para reducir el estrés provocado por manejo, los camarones fueron colocados en las peceras 24 horas antes de iniciar el bioensayo. Posteriormente fueron alimentados con papilla del tejido de camarón positivo a WSSV obtenido de la prueba de inoculación por inyección. Esto fue a razón de 3.5% de la biomasa por día por pecera y en dos raciones diarias durante tres días, donde además como alimento suplementario se agregó “pellet” comercial al 1.5% de la biomasa por pecera por día, como alimento suplementario y con “pellet” al 5% de la biomasa por pecera por día durante el resto del bioensayo. Posteriormente, se procedió a la observación de los organismos durante los siguientes siete días. Se retiraron aquellos camarones que morían y fueron fijados con solución Davidson para histología y pleópodos en alcohol al 96% para PCR. Una vez que el tratamiento alcanzó el 50% de mortalidad los organismos supervivientes fueron retirados de las peceras y procesados para las diferentes técnicas.

### III.5. Bioensayos con Temperatura.

Para el bioensayo de las temperaturas a 22, 24, 26, 28, 30 y 32 °C se colocaron seis peceras por triplicado, con seis organismos por unidad experimental a 35 ups. Se proveyó un calentón por pecera con termostato a 32 °C como máximo. Estos organismos fueron



aclimatados a las diferentes temperaturas por espacio de una semana con incrementos de 1-2 °C por día, suministrando alimento comercial al 35% de proteína y con recambio diario. Una vez concluida la aclimatación se añadió al alimento tejido de camarón positivo a WSSV como papilla a razón del 3.5% de la biomasa por pecera en dos raciones diarias durante tres días; al término de los cuales se continuó la alimentación con “pellet” comercial a razón de 5% de la biomasa diaria durante el resto del bioensayo. Posteriormente se procedió a la observación de los organismos durante los siguientes siete días; se retiraron aquellos que morían y fueron fijados con solución Davidson para histología y en alcohol al 96% para PCR. Una vez que el tratamiento alcanzó el 50% de mortalidad los organismos supervivientes fueron retirados de las peceras y procesados para las diferentes técnicas.

### **III.6. Bioensayos con Salinidad.**

Para el bioensayo con salinidad se colocaron seis peceras por triplicado con agua de mar previamente filtrada con 1 y 5  $\mu\text{m}$ , con aireación constante. La aclimatación se llevó a cabo con 10 organismos por pecera para asegurar que al menos sobrevivieran seis organismos a la aclimatación. Para el aumento de la salinidad se partió de 36 ups a 29 °C con los camarones del bioensayo correspondiente y se aumentó gradualmente hasta lograr 40, 45 y 50 ups en ocho días mediante la adición de sal marina, ya que si la salinidad se ajusta con los animales, éstos sufren menor estrés durante este proceso.

Una vez que se alcanzó la salinidad deseada se mantuvieron los camarones por tres días en esas condiciones para reducir el estrés que sufrieron durante la aclimatación, se suministró alimento comercial con 35% de proteína. Durante el proceso de aclimatación y acondicionamiento se realizaron recambios diarios por sifoneo con agua a la misma salinidad que correspondía a cada tratamiento preparada ésta con la adición de sal marina para lograr la salinidad requerida.

Después del proceso de aclimatación a las salinidades correspondientes, los 120 organismos sobrevivientes se alimentaron con papilla de tejido de camarón positivo a WSSV a razón del 5% de la biomasa por pecera por día en dos raciones diarias durante tres días y durante el resto del bioensayo se alimentó con “pellet” comercial en la misma dosis. Posteriormente se procedió a la observación de los organismos en los siguientes siete días, se retiraron aquellos que morían y fueron fijados con solución Davidson para histología y en

alcohol al 96% para PCR. Una vez que el tratamiento alcanzó el 50% de mortalidad los organismos supervivientes fueron retirados de las peceras y procesados para las diferentes técnicas. Se realizaron recambios diarios de agua por sifoneo durante los bioensayos con agua a las salinidades correspondientes para cada tratamiento, esto con la finalidad de retirar alimento no consumido y heces. El agua de descarte fue colocada en unidades de almacenamiento preparadas con una solución de hipoclorito de Sodio a una concentración de 200 ppm de cloro libre, durante un período de 24 horas antes de su eliminación.

### **III.7. Procesado de las muestras.**

A la muerte de cada organismo, definida por el cese del movimiento del escafognatito, se retiraron los organismos de las unidades experimentales y fueron fijados en solución Davidson y etanol al 96% para los análisis histológicos y PCR. Los organismos, recién retirados de las unidades experimentales, fueron seccionados a partir de la parte media del primer somite abdominal y se procedió posteriormente de la siguiente manera según la técnica de Bell y Lightner (1988) a continuación descrita.

1. El cefalotórax se inyectó con solución Davidson, aproximadamente 3 mL en cada extremo del hepatopaneas y 4 mL en el resto del cefalotórax. Se colocó en recipientes previamente etiquetados con fecha, hora de muerte, tratamiento y unidad experimental para su posterior análisis por histología.
2. El abdomen se colocó en bolsas plásticas previamente etiquetadas y almacenado a -20 °C para contar con material infectado para posteriores estudios.
3. Los pleópodos fueron retirados del abdomen y colocados en viales con alcohol al 96%, se etiquetaron y conservaron para su posterior estudio mediante la técnica de PCR.

### **III.8. Análisis Histológico.**

Se realizaron cortes, a nivel de la parte media del primer somite abdominal de los organismos fijados con solución Davidson. Al cabo de 72 horas de fijación, las muestras se colocaron en solución de etanol al 70% para su almacenamiento hasta ser procesadas mediante la deshidratación e infiltración de tejidos en parafina y tinción con Hematoxilina y Eosina de Harris. En general el protocolo es de la siguiente manera: 1) disección y selección de tejidos,

2) deshidratación y embebido en parafina, 3) corte a 3-5  $\mu\text{m}$  con micrótopo rotatorio y 4) tinción y montaje (Bell y Lightner, 1988) (Ver protocolo en apéndice 1).

Una vez que la muestra se procesó, se revisó al microscopio desde los objetivos a 10x, 40x y 100x. Se contabilizó en el objetivo de 40x el número de células por órgano como campos oculares del microscopio por cada órgano, revisando cuatro órganos: cámara gástrica, órgano linfoide, glándula antenal y branquias. También se contabilizó el número de cuerpos de inclusión por campo del microscopio y se realizó una clasificación denominada grado de severidad (GS) la cual esta definida por el número de cuerpos de inclusión intranucleares característicos a WSSV encontrados por campo (Tabla III). Todos los organismos recolectados de las unidades experimentales fueron procesados y se capturaron imágenes fotográficas de los órganos analizados mediante una cámara digital unida aun microscopio compuesto

Tabla III. Criterio de evaluación del grado de severidad (GS) por infección viral en *L. vannamei* tomada de Lightner (1996) definida por el numero de cuerpos de inclusión intranucleares que van de basofílicos a eosinofílicos (CAI'S)\* presentes en los tejidos de los órganos blanco.

GS	CAI'S	CAI'S/ Campos	HISTOPATOLOGIA
0	No observados	0	Sin daños visibles
1	Escasos	1/200	Niveles detectables
2	Moderados	10/200	Niveles detectables
3	Amplio número	100/200	Niveles significativos
4	Abundantes	> 10/1	Potencialmente letales

\*Número estimado de CAI'S observados con objetivo de 40x por sección (1/200 = 1 CAI por 200 campos). El término histopatología es usado para definir necrosis típicas de las células, así como picnosis de núcleos, inflamación hemocítica y desarreglo general de tejidos asociados con la presencia de CAI'S.

### III.9. Análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La técnica de PCR se usó como una técnica confirmativa para los resultados obtenidos por la técnica de histología. El par de pleópodos del abdomen de todos los organismos, retirados de las unidades experimentales de cada uno de los bioensayos se procesó mediante el juego de reactivos del IQ2000 para WSSV (Ver protocolo en apéndice 2), se siguieron las

especificaciones del fabricante (Farming IntelliGene Tech. Corp.). Se realizó una sola corrida para todos los tratamientos mediante pruebas en grupos de seis organismos por cada uno de los tratamientos de los diferentes bioensayos siendo que para densidad se corrieron seis grupos, para temperatura 13 grupos y para salinidad 10 grupos y se realizó el diagnóstico según la escala de severidad proporcionada por el fabricante (Fig. 2).

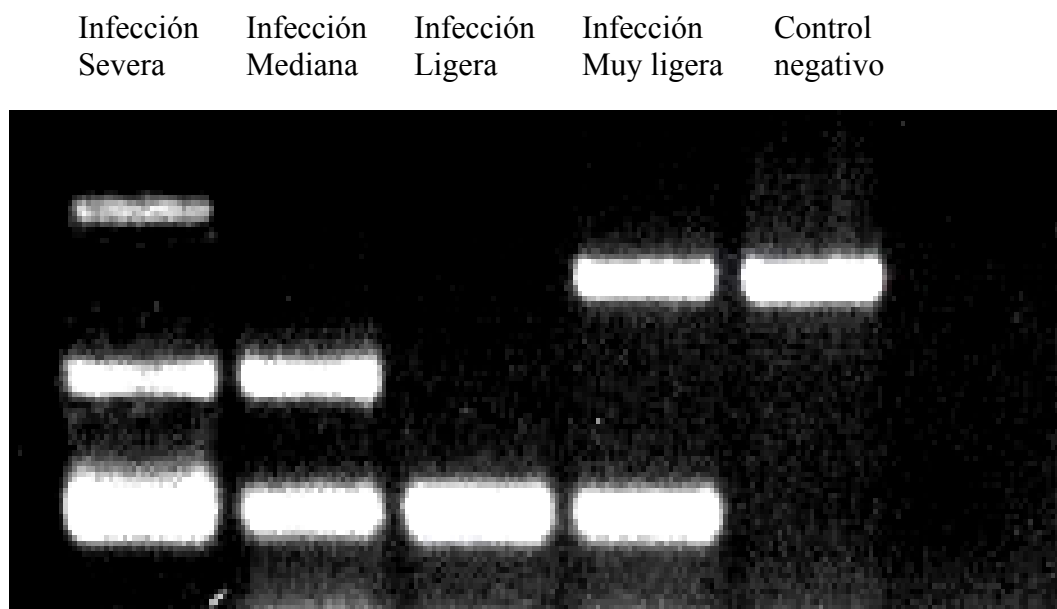


Figura 2. Típicos resultados de diagnóstico generados por el sistema de prevención y detección IQ2000<sup>TM</sup> para WSSV. Se utilizó para la detección del grado de severidad en los bioensayos del presente estudio.

### III.10. Medidas de bioseguridad.

Durante el periodo del bioensayo se llevaron a cabo desinfecciones periódicas del área de trabajo, como pisos y materiales cada tres horas con una solución de 200 ppm de hipoclorito de sodio. Además, el agua drenada también fue clorada y se dejó reposar por 24 horas antes de ser eliminada. Una vez que terminó el bioensayo todo el equipo como redes, mangueras de aireación, cubetas, unidades experimentales fueron desinfectados, así como también finalmente se desinfectó el área de trabajo por medio de fumigación con formalina al 4% (Lightner, 1996).

### **III.11. Análisis de datos.**

La prevalencia se representó en porcentaje como el número de camarones infectados o con signos clínicos del total del experimental. Los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad para su tratamiento estadístico donde la distribución de los datos no se ajustó a la distribución normal, según las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilkins y las varianzas no se distribuyeron homogéneamente entre los tratamientos, por lo que no fue posible realizar la aplicación de pruebas paramétricas y los tratamientos fueron comparados con la prueba de Kruskal Wallis, mediante el paquete estadístico NCSS trial version (NCSS Kaysville, USA) se utilizó la prueba *a posteriori* de comparación múltiple de Duncan`s para determinar la diferencia estadística entre tratamientos; se seleccionó esta prueba atendiendo al rigor que utiliza para la separación de tratamientos.

## IV. RESULTADOS.

### IV.1. Densidad.

#### IV.1.1. Signos clínicos.

Los organismos alimentados con tejido de camarón con WSSV presentaron con independencia de la densidad manejada, los signos clínicos característicos a este virus tales como expansión de cromatóforos, el tono acanelado, la cutícula flácida (Fig. 3) y la disminución en el consumo de alimento en un tiempo entre las 48 y 72 horas post infección (hpi). De acuerdo con el cuadro clínico correspondiente se observó que los organismos menos afectados fueron los de menor densidad con una prevalencia de 33% para la densidad de 6.6 org/m<sup>2</sup>.



Figura 3. Organismo moribundo de *L. vannamei* infectado con WSSV que demuestra los signos clínicos con WSSV, con expansión de cromatóforos rojos indicados por las flechas.

Asimismo, para la densidad de 13.2 org/m<sup>2</sup> se encontró el 66% de prevalencia y en 26.5 org/m<sup>2</sup> un 50% a las 63 hrs. Para los tratamientos de 19.8 y 39.8 org/m<sup>2</sup> se observó una prevalencia del 50-100% en el periodo de 48 a 60 horas. Destaca en estos resultados el menor tiempo para la aparición de signos clínicos, correspondiente a la mayor densidad a las 48 horas como se muestra en la Tabla IV.

#### IV.1.2. Supervivencia.

El tratamiento que mostró el mayor tiempo de tolerancia a WSSV con la más baja prevalencia (33%), fue el de menor densidad (6.6 org/m<sup>2</sup>). El tratamiento de alta densidad de 39.8 org/m<sup>2</sup> fue el que presentó menor supervivencia en menor tiempo, la prevalencia fue del 100% a las 48 horas. A su vez, los tratamientos de 19.8 y 39.8 org/m<sup>2</sup> presentaron menor supervivencia a WSSV, descendiendo del 80% a las 108 hpi, hasta el 40% a las 156 hpi (Fig. 4, Tabla IV).

Tabla IV. Cuadro clínico en las distintas densidades de camarones y prevalencia observada en el bioensayo con *L. vannamei* sujeto a una infección con WSSV.

Densidad Org/m <sup>2</sup>	Cuadro Clínico	Tiempo de aparición de los signos	Org. afectado / Org. totales	Prevalencia
6.6	Letargia, anorexia, flacidez del exoesqueleto y permanencia en el fondo del acuario.	72 horas	1/3	33 %
13.2	Expansión de cromatóforos letargia, anorexia, flacidez del exoesqueleto y permanencia en el fondo del acuario.	63 horas	4/6	66 %
19.8	Anorexia, letargia, flacidez muscular y nado errático.	60 horas	9/9	100 %
26.5	Anorexia, nado lento, expansión de cromatóforos tornándose de rojo a café, movimientos violentos y cutícula flácida.	63 horas	5/12	50 %
33.1	Cromatóforos rojos letargia, anorexia, flacidez.	54 horas	15/15	100 %
39.8	Expansión de cromatóforos letargia, anorexia, flacidez del exoesqueleto y permanencia en el fondo del acuario.	48 horas	18/18	100 %

Org. afectado/org.totales= Prevalencia (%).

La supervivencia de los organismos del bioensayo con densidad se vió afectada en el periodo de las 108-120 hpi. El tratamiento de 39.8 org/m<sup>2</sup> fue el de menor supervivencia (50%) en este periodo. el tratamiento de 26.5 org/m<sup>2</sup> presentó una supervivencia del 65% a las 136 hpi. En el resto de los tratamientos la supervivencia fue aproximadamente entre el 55 y 65% desde las 144-156 hpi, con excepción del tratamiento de 6.6 org/m<sup>2</sup> el cual se mantuvo en el 100% (Fig. 4).

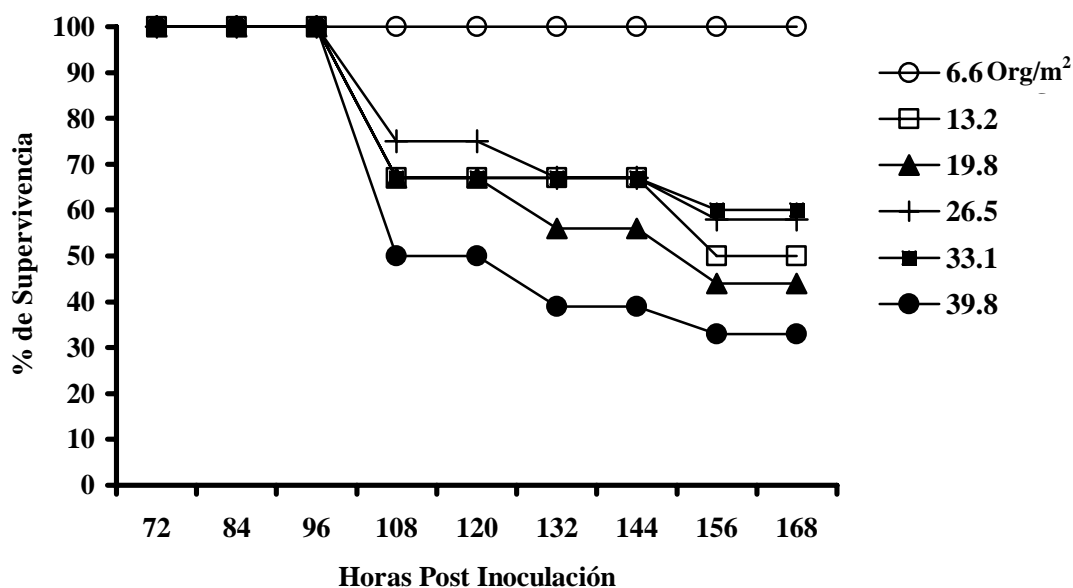


Figura 4. Supervivencia de los organismos de *L. vannamei* inoculados con WSSV y expuestos a diferentes densidades.

#### IV.1.3. Análisis Histológico.

El análisis histológico en las densidades de animales probadas permitió determinar en qué grado afectó el patógeno al organismo. Los daños fueron evidentes en cámara gástrica, glándula antenal, órgano linfoide y branquias. El tratamiento de 6.6 org/m<sup>2</sup> no presentó daño a nivel histológico ya que no se encontraron cuerpos de inclusión intranucleares y solamente se evidenció la presencia de hemocitos dentro de los órganos preferenciales por el WSSV (Fig. 5).



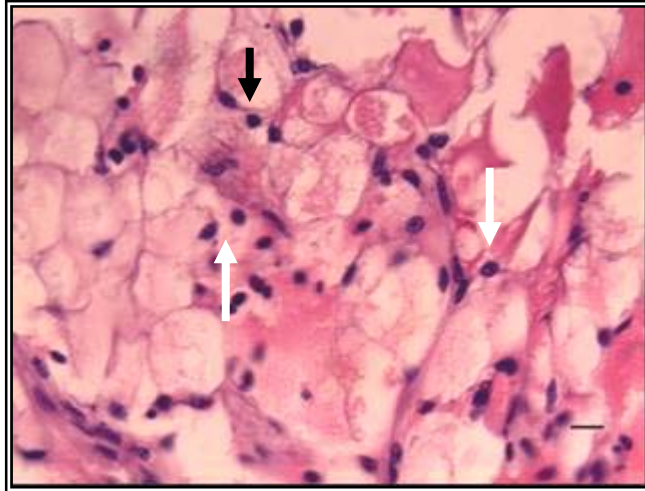


Figura 5. Corte histológico a 3  $\mu\text{m}$  de cámara gástrica en donde se observa infiltración hemocítica (flechas) sin cuerpos de inclusión en organismos mantenidos a densidad de 6.6 org/m<sup>2</sup>. La barra representa 20  $\mu\text{m}$ .

Los tratamientos de 13.2, 19.8, 26.5, 33.1 y 39.8 org/m<sup>2</sup> presentaron las lesiones características a WSSV que se pueden detectar mediante la técnica de histología. Estas se caracterizaron por prominentes cuerpos de inclusión intranucleares que van de basofílicos a eosinofílicos (CAI'S) en los órganos preferenciales por este patógeno como son cámara gástrica, glándula antenal, branquia y órgano linfoide y principalmente en la densidad de 39.8 org/m<sup>2</sup> (Fig. 6, 7 y 8).

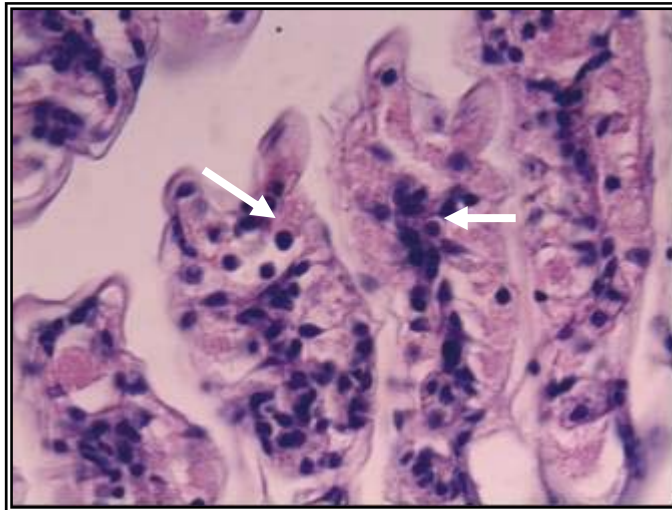


Figura 6. Corte histológico a 3  $\mu\text{m}$  de branquia de *L. vannamei* con cuerpos de inclusión característicos a WSSV en organismos del bioensayo con densidad de 19.8 org/m<sup>2</sup>. 400x.

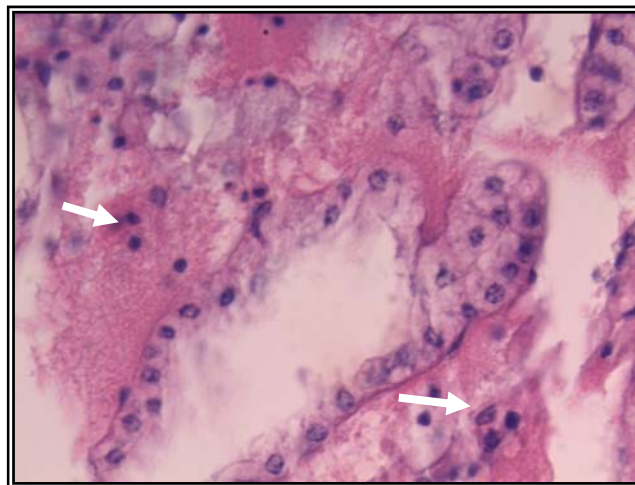


Figura 7. Corte histológico a 3  $\mu\text{m}$  de glándula antenal donde se observan los cuerpos de inclusión característicos a WSSV en organismos de *L. vannamei* del bioensayo con densidad de 26.5 org/m<sup>2</sup>. 40x.

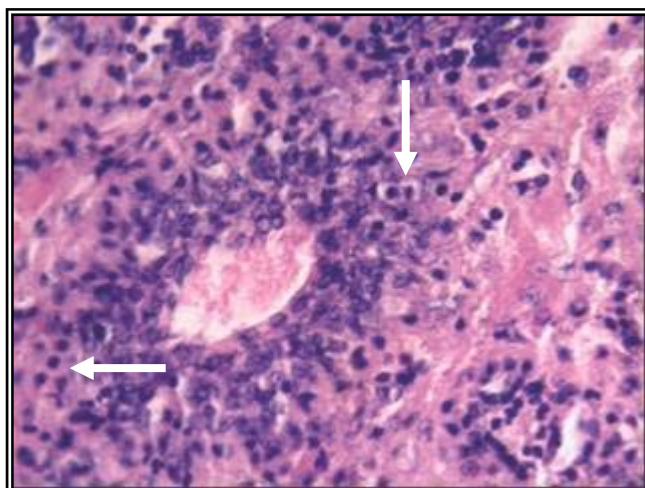


Figura 8. Corte histológico a 3  $\mu\text{m}$  de órgano linfoide donde se observan los cuerpos de inclusión característicos a WSSV en organismos de *L. vannamei* del bioensayo con densidad de 33.1 org/m<sup>2</sup>. 100x.

A su vez mediante histología se observó que de manera global el tratamiento más afectado fue 26.5 org/m<sup>2</sup> con el grado 4 según la escala de clasificación de Lightner (1996). La media de CAI'S fue de las más altas con  $9.5 \pm 0.45$  no obstante, 13.2, 19.8 y 39.8 org/m<sup>2</sup> no presentaron diferencias entre ellos, pero si con los demás tratamientos, siendo los tratamientos de 26.5 y 33.1 org/m<sup>2</sup> diferentes entre si y diferentes de los demás, por su parte el tratamiento de 6.6 org/m<sup>2</sup> fue diferente de todos los demás tratamientos (Tabla V, figura 9).

Tabla V. Grado de severidad (GS) por tratamiento en el bioensayo con densidad de organismos y WSSV.

Tratamiento org/m <sup>2</sup>	GS	No de organismos analizados
6.6	0	3
13.2	3	4
19.8	3	4
26.5	4	10
33.1	3	12
39.8	3	11

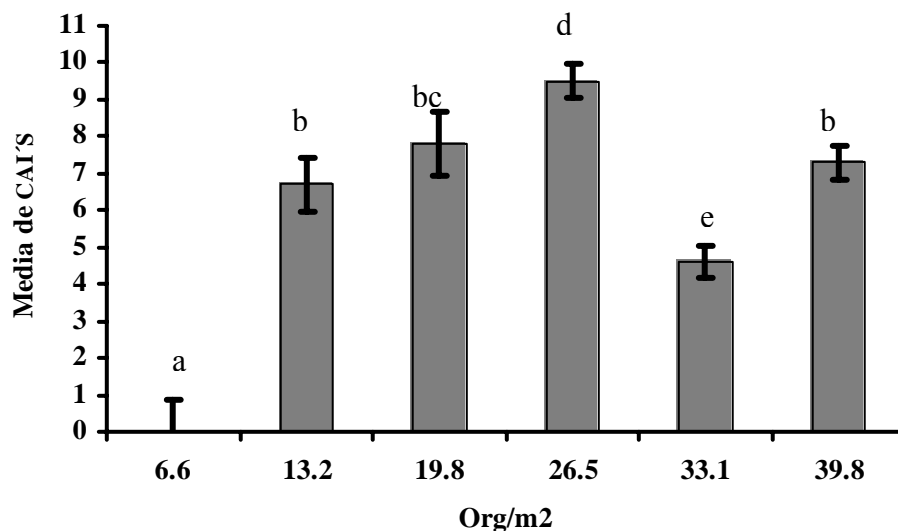


Figura 9. Medias y diferencias estadísticas entre tratamientos del bioensayo con densidad de organismos.

El grado de afectación por órgano en conjunto con la densidad probada del camarón, demostró un mayor promedio ( $33.6 \pm 2.5$ ) en los CAI'S a la densidad de  $13.2 \text{ org/m}^2$  en órgano linfoide; seguido por cámara gástrica,  $4.7 \pm 1.4 \text{ org/m}^2$  dentro del mismo tratamiento y en la densidad de  $26.5 \text{ org/m}^2$  de  $18.5 \pm 1.1$ , los menores promedios para todos los órganos con excepción de órgano linfoide fueron con la densidad de  $13.2 \text{ org/m}^2$ . El tratamiento de  $6.6 \text{ org/m}^2$  presentó una ausencia total de cuerpos de inclusión en todos los órganos analizados (Tabla VI).

Mediante la prueba *a posteriori* se obtuvo que en cámara gástrica el tratamiento de  $6.6 \text{ org/m}^2$  presentó diferencias con los demás tratamientos, mientras que las densidades de  $13.2$  y  $19.8 \text{ org/m}^2$  no presentan diferencias entre ellos pero si con los demás tratamientos. A su vez el tratamiento de  $26.5 \text{ org/m}^2$  presentó diferencias con todos los tratamientos mientras que  $19.8$  y  $39.8 \text{ org/m}^2$  son similares entre si y diferentes de los demás. En branquias los tratamientos de  $6.6$ ,  $13.2$  y  $19.8 \text{ org/m}^2$  no presentan diferencias entre ellos pero si con los demás, sin embargo, a su vez  $19.8$  no presenta diferencias con  $33.1 \text{ org/m}^2$ .  $26.5$ ,  $33.1$  y  $39.8 \text{ org/m}^2$ , no presentan diferencias entre si pero son diferentes de los demás tratamientos. En el caso de glándula antenal los tratamientos de  $6.6$ ,  $13.2$ ,  $33.1$  y  $39.8 \text{ org/m}^2$  no presentaron diferencias entre si pero si con los demás tratamientos. Los tratamientos de  $19.8$  y  $26.5 \text{ org/m}^2$

fueron similares entre si pero diferentes de los demás tratamientos. En órgano linfoide no existieron diferencias entre los tratamientos con excepción del tratamiento de 13.2 org/m<sup>2</sup> que fue diferente a todos los demás tratamientos (Tabla VI).

Tabla VI. Medias de cuerpos de inclusión por órgano según densidades probadas en los bioensayos con WSSV sobre *L. vannamei*.

Órgano	6.6 org/m <sup>2</sup>	13.2 org/m <sup>2</sup>	19.8 org/m <sup>2</sup>	26.5 org/m <sup>2</sup>	33.1 org/m <sup>2</sup>	39.8 org/m <sup>2</sup>
Cámara gástrica	0 ± 0.0 a	4.7 ± 1.4 b	11.1 ± 1.2 c	18.5 ± 0.8 d	7.4 ± 0.5 b	12.6 ± 0.8 c
Branquia	0 ± 0.0 a	0.22 ± 0.9 a	1.4 ± 0.8 ab	3.6 ± 0.5 c	4.1 ± 0.4 bc	3.8 ± 0.5 bc
Glándula antenal	0 ± 0.0 a	0.35 ± 0.2 a	1.7 ± 0.2 b	2.0 ± 0.1 b	0.5 ± 0.1 a	0.7 ± 0.1 a
Órgano linfoide	0 ± 0.0 a	33.6 ± 2.5 b	0 ± 0.0 a	10 ± 1.8 a	2.6 ± 1.7 a	11 ± 1.8 a

Valores en el mismo renglón con la misma literal, son estadísticamente iguales. Duncan's 5%.

De acuerdo con la histología, los grados de severidad fueron notoriamente de cero en los cuatro órganos analizados a la densidad más baja. En branquias para todas las densidades mayores de 19.8 org/m<sup>2</sup> el máximo valor alcanzado fue homogéneo con un GS de 3, mientras que en cámara gástrica los valores más altos fueron obtenidos por las densidades de 19.8, 26.5 y 39.8 org/m<sup>2</sup> y en órgano linfoide fueron las densidades de 13.2, 26.5 y 39.8 org/m<sup>2</sup> las que obtuvieron un GS de 4 y para glándula antenal los valores fueron de 1 a 2 siendo los más altos los tratamientos de 19.8 y 26.5 org/m<sup>2</sup> (Tabla VII).

Tabla VII. Grado de severidad (GS) por órgano en cada tratamiento del bioensayo con densidad de organismos.

Órganos	6.6 org/m <sup>2</sup>	13.2 org/m <sup>2</sup>	19.8 org/m <sup>2</sup>	26.5 org/m <sup>2</sup>	33.1 org/m <sup>2</sup>	39.8 org/m <sup>2</sup>
Cámara gástrica	0	3	4	4	3	4
Branquia	0	1	2	3	3	3
Glándula antenal	0	1	2	2	1	1
Órgano linfoide	0	4	0	4	3	4

#### IV.1.4. PCR.

Todos los tratamientos fueron positivos a WSSV aún aquellos que no fueron detectados en histología. Se catalogó el grado de severidad de la muestra mediante la intensidad del amplicon presentado en el gel, lo que indicó que los tratamientos de 13.2, 26.5 y 39.8 org/m<sup>2</sup> tuvieron un grado de infección severo, mientras que 6.6, 19.8 33.1 org/m<sup>2</sup> presentó un grado ligero de infección (Fig. 9). A su vez los controles negativos de 19.8, 33.1 y 39.8 org/m<sup>2</sup> no presentaron amplificación mediante PCR.

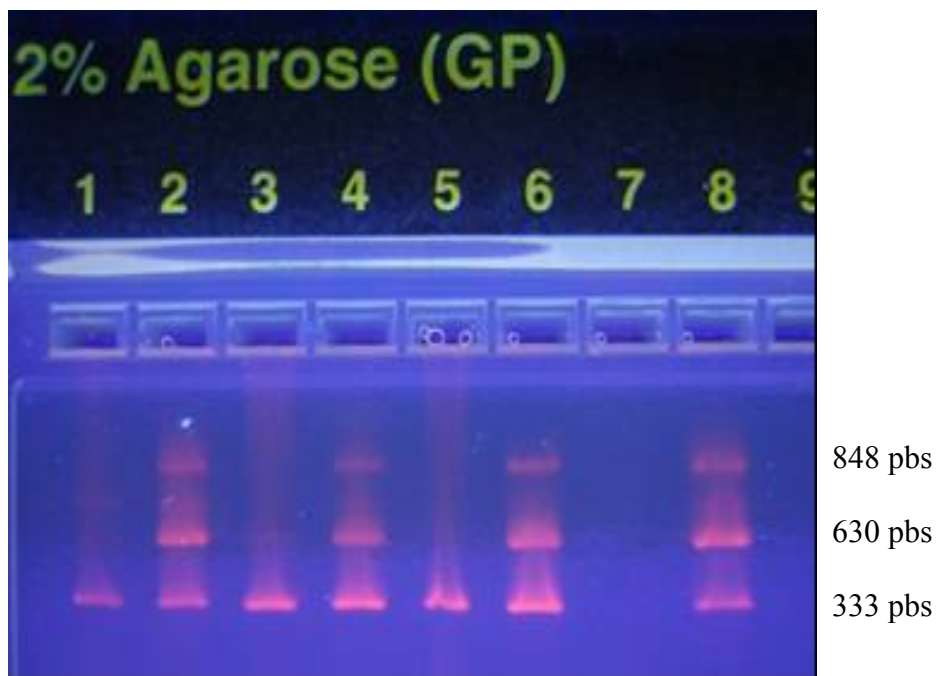


Figura 10. Gel de agarosa al 2% donde se aprecian los productos de amplificación de los diferentes tratamientos del bioensayo con densidad de *L. vannamei* desafiados con WSSV. Los carriles del 1-6 fueron los distintos tratamientos: 6.6 (ligero), 13.2 (severo), 19.8 (ligero), 26.5 (severo), 33.1 (ligero) y 39.8 org/m<sup>2</sup> (severo), 7 y 8 son control negativo y positivo.

## IV.2. Temperatura.

### IV.2.1. Signos clínicos.

Los organismos alimentados con tejido de camarón con WSSV presentaron anorexia después del segundo día del bioensayo, letargia, expansión de cromatóforos rojos y un leve aspecto rojizo o acanelado en la cutícula (Fig. 11).



Figura 11. Organismo del ensayo con temperatura infectado con WSSV en donde se observa la expansión de cromatóforos en el exoesqueleto.

#### **IV.2.2. Supervivencia.**

En el bioensayo con temperatura y WSSV se observó que la supervivencia de los organismos presentó un mayor porcentaje en los tratamientos de 22 y 24 °C del 80 y 100% en las primeras 95 hpi. Los tratamientos de 26 y 28 °C fueron los que mantuvieron supervivencias menores al 50% entre las 100 y 110 hpi. El tratamiento que presentó menor supervivencia fue el de 30 °C llegando alrededor del 30% en las primeras 80 hpi mientras que el tratamiento de 32 °C mantuvo el 55% de supervivencia cercano a las 110 hpi (Fig. 12).



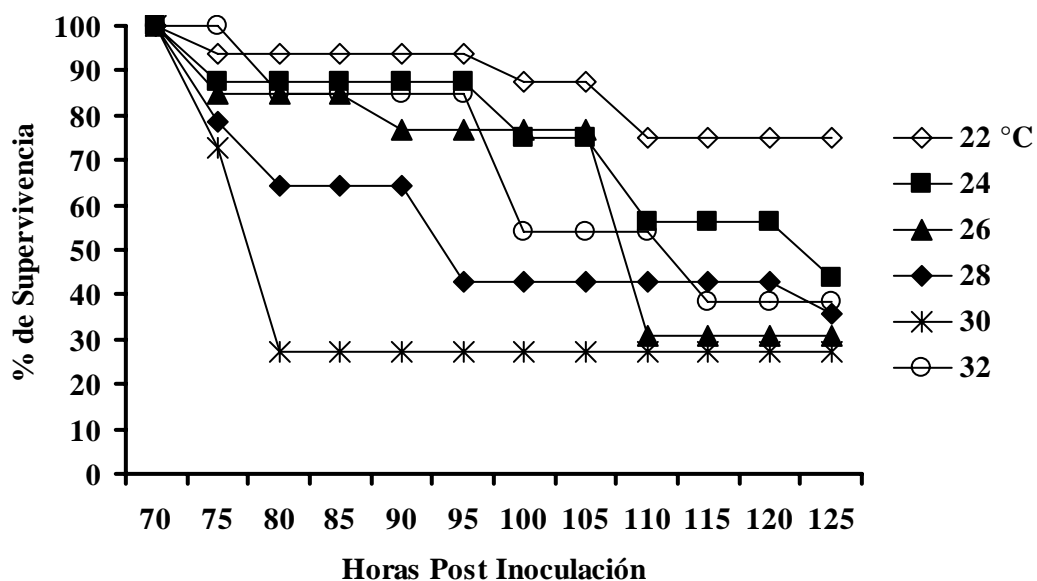


Figura 12. Supervivencia de los organismos de *L. vannamei* inoculados con WSSV y mantenidos en diferentes temperaturas.

#### IV.2.3. Análisis Histológico.

En los tratamientos del bioensayo con temperatura los más afectados fueron de 24-30 °C con un grado de severidad 3 y los tratamientos de 22 y 32 °C presentaron un grado de severidad de 2 y 1 respectivamente, resultando todos los tratamientos diferentes entre si (Tabla VIII).

Tabla VIII. Grado de severidad (GS) por tratamiento en el ensayo con temperatura y WSSV.

Tratamiento °C	GS	No de organismos analizados
22	2	16
24	3	16
26	3	13
28	3	14
30	3	11
32	1	13

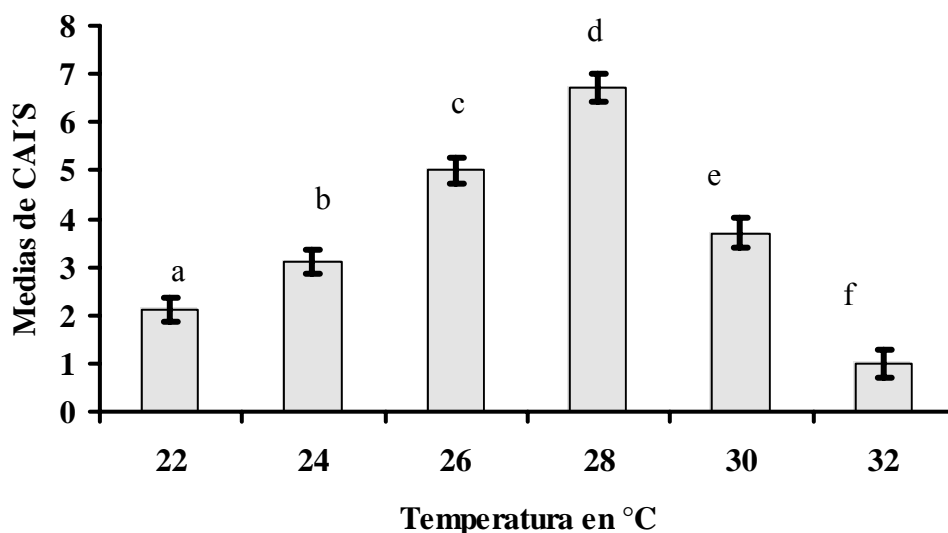


Figura 13. Medias y diferencias estadísticas entre tratamientos del bioensayo con temperatura.

Mediante la técnica de histología los órganos afectados durante el bioensayo con temperatura fueron cámara gástrica, branquia, glándula antenal y órgano linfoide. La cámara gástrica fue el que presentó un grado de severidad más alto, en el tratamiento de 28 °C con un promedio de 12.6 CAI'S/ campo y órgano linfoide en el tratamiento de 26 °C con un promedio de 16.2 CAI'S/ campo (Tabla IX).

En el bioensayo con temperatura la cámara gástrica no presentó diferencias entre los tratamientos de 22 y 32 °C, de igual manera los tratamientos de 24 y 26 no presentaron diferencias entre ellos pero si con los demás tratamientos. Los tratamientos de 28 y 30 °C presentaron diferencias entre ellos y con todos los demás tratamientos. En branquia 22, 24, 30 y 32 °C no presentaron diferencias entre si en cuanto a la afectación de este órgano, y fue el tratamiento de 26 °C similar a 28 °C pero diferentes de los demás y el tratamiento. En glándula antenal los tratamientos de 24 y 32 °C no presentaron diferencias entre si, sin embargo la temperatura de 28 °C no presentó diferencias con el de 26 °C y fue el tratamiento de 22 °C diferente a todos. En órgano linfoide los tratamientos de 22, 24, 28 y 30 °C no presentaron diferencias entre ellos, mientras que 26 °C fue diferente de todos los demás tratamientos mientras que 32, 22 y 24 son iguales entre si. (Tabla IX).

Tabla IX. Promedio de cuerpos de inclusión por órgano en *L. vannamei* en el bioensayo con temperatura.

Órgano	22 °C	24 °C	26 °C	28 °C	30 °C	32 °C
Cámara gástrica	2.7 ± 0.4 a	5.8 ± 0.5 b	5.9 ± 0.5 b	12.6 ± 0.5 c	8.1 ± 0.6 d	2.2 ± 0.5 a
Branquia	1.2 ± 0.2 a	1.1 ± 0.2 ab	2.5 ± 0.2 c	2.8 ± 0.2 c	0.3 ± 0.3 a	0.2 ± 0.2 a
Glándula antenal	1.1 ± 0.1 a	0.2 ± 0.1 bc	0.6 ± 0.1 b	0.4 ± 0.1 bc	0.09 ± 0.1 bc	0.1 ± 0.1 c
Órgano linfoide	4.2 ± 1.0 bc	4.2 ± 1.1 bc	16.2 ± 1.1 a	7.5 ± 1.2 b	3.9 ± 1.3 b	0.5 ± 1.3 cd

Valores en el mismo renglón con la misma literal, son estadísticamente iguales. Duncan's 5%.

El mayor grado de severidad para cámara gástrica fue en el tratamiento de 28 °C, con un GS de 4; para branquias en los tratamientos de 26 y 28 °C con GS de 3; para glándula antenal no hubo variación en los tratamientos ya que todos presentaron un GS de 1 y para órgano linfoide el tratamiento de 26 °C fue el que presentó mayor GS en un nivel 4 (Tabla X).

Tabla X. Grado de severidad por órgano dentro de los tratamientos del bioensayo con temperatura.

Órganos	22 °C	24 °C	26 °C	28 °C	30 °C	32 °C
Cámara gástrica	2	3	3	4	3	2
Branquia	2	2	3	3	1	1
Glándula antenal	1	1	1	1	1	1
Órgano linfoide	3	3	4	3	3	1

#### IV.2.4. PCR.

Mediante la técnica de PCR se obtuvo que todos los tratamientos del bioensayo fueron positivos a WSSV. Los tratamientos de 22 y 26 °C presentaron una infección de ligera a mediana, los de 24, 28 y 30 °C una infección de mediana a severa y el de 32 °C una infección ligera (Fig. 14 y 15).



Figura 14. Gel de agarosa al 2% donde se aprecian los productos de amplificación de los diferentes tratamientos del bioensayo con temperatura de *L. vannamei* desafiados con WSSV. Los carriles del 1-10 fueron los distintos tratamientos, carril 1-3 22 °C (ligero), 4-5, 24 (severo), 6-7, 26 (mediano), 8-9, 28 (mediano), carril 10, 30 °C (ligero), 11 y 12 fueron control negativo y positivo respectivamente.

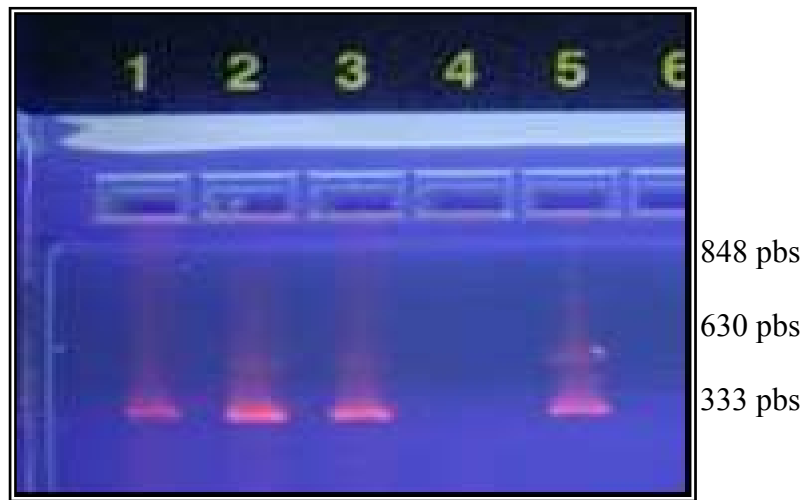


Figura 15. Gel de agarosa al 2% donde se aprecian los productos de amplificación de los diferentes tratamientos del bioensayo con temperatura de *L. vannamei* desafiados con WSSV. El carril 1 fue de 30 °C (ligero) y los carriles 2-3, fueron de 32 °C (ligero) carriles 4 y 5 control negativo y positivo respectivamente.

### IV.3. Salinidad.

#### IV.3.1. Signos clínicos.

Los organismos alimentados con tejido de camarón con WSSV presentaron anorexia después del segundo día de inoculación, letargia, expansión de cromatóforos rojos en la cutícula, pero no presentaron los característicos depósitos de calcio del WSSV que se han observado en los organismos en otras regiones de cultivo (Fig. 16).



Figura 16. Organismos moribundos infectados con WSSV en el ensayo con salinidad con presencia de expansión de cromatóforos, letargia y nado lento.

### IV.3.2. Supervivencia.

En cuanto a la supervivencia, antes de las 72 hpi se presentaron diferencias en la susceptibilidad sobre todo en aquellos organismos mantenidos en 40 ups y a las 84 hpi todos los tratamientos presentaron entre el 30 y 60% de supervivencia iniciando la mortalidad a las 48 hpi (Fig. 17).

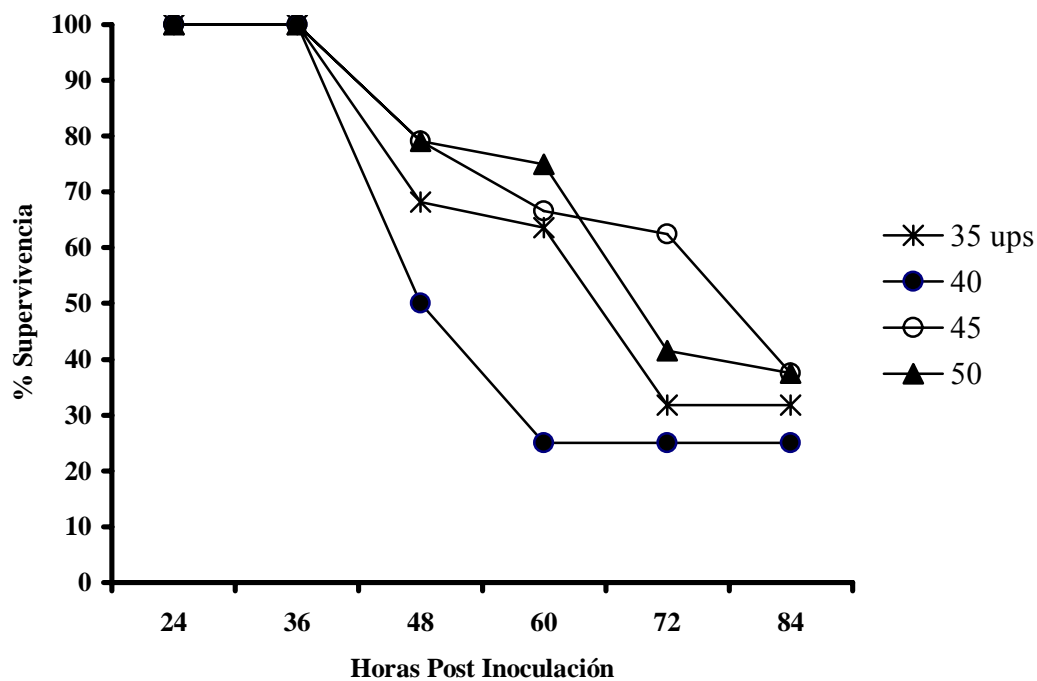


Figura 17. Porcentaje de supervivencia de los organismos de *L. vannamei* inoculados con WSSV y mantenidos en diferentes salinidades.

### IV.3.3. Análisis Histológico.

Mediante la técnica de histología en el bioensayo Salinidad - WSSV se evidenció que el tratamiento de 35 ups fue el que presentó un grado de severidad 4, el más alto de los tratamientos del bioensayo. En donde también se pudo observar que si existieron diferencias entre los tratamientos ( $P>0.05$ ) siendo tanto 35 como 40 ups diferentes de todos los tratamientos (Tabla XI).

Tabla XI. Grado de severidad (GS) por tratamiento del bioensayo con salinidad.

<b>Tratamiento ups</b>	<b>GS</b>	<b>No. de organismos analizados</b>
35	4	22
40	3	20
45	3	24
50	3	20

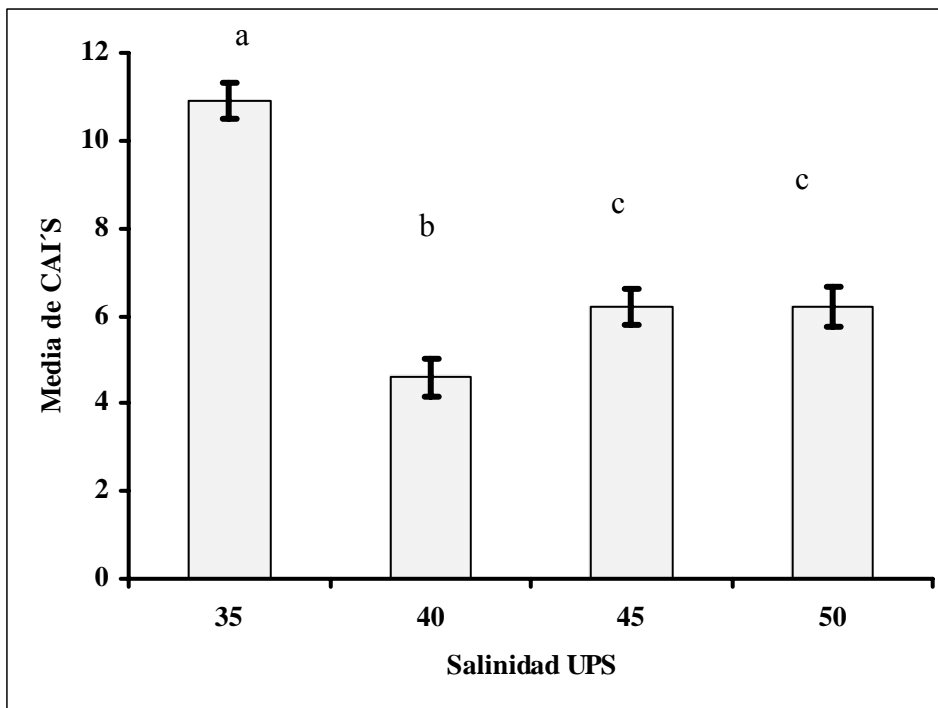


Figura 18. Medias y diferencias estadísticas entre tratamientos del bioensayo con salinidad.

En cuanto al grado de severidad por órgano, el más afectado fue cámara gástrica en todos los tratamientos con un grado de severidad de 4, siendo branquia el que presentó un grado de severidad de 2 a 50 ups y glándula antenal el órgano menos afectado en todos los tratamientos (Tablas XII y XIII).

Mediante el análisis estadístico se obtuvo que en el caso de órgano linfoide no existieron diferencias ( $P > 0.05$ ), mientras que en glándula antenal el tratamiento donde se obtuvo la mayor presencia de CAI'S fue el de 45 ups ya que este fue diferente de todos los tratamientos, mientras que 40 y 50 ups no presentaron diferencias entre ellos y 35 ups fue diferente de todos los tratamientos. Para cámara gástrica no se presentaron diferencias entre los tratamientos de 40 y 45 ups, y tampoco entre 45 y 50 ups mientras que 35 ups fue diferente a todos los tratamientos. Para branquia los tratamientos de 35 y 45 ups no mostraron diferencias entre si ( $P > 0.05$ ), de manera similar a los tratamientos de 40 y 50 ups (Tabla XII).



Tabla XII. Efecto de la salinidad sobre la aparición de cuerpos de inclusión por órgano.

Órgano	35 ups	40 ups	45 ups	50 ups
Cámara gástrica	22.6 ± 0.8 c	10 ± 0.8 a	11.9 ± 0.8 ab	13.1 ± 0.9 b
Branquia	2.2 ± 0.3 a	0.8 ± 0.3 b	2.7 ± 0.3 a	1.0 ± 0.3 b
Glándula antenal	1.1 ± 0.1 a	0.4 ± 0.1 b	1.7 ± 0.1 c	0.3 ± 0.2 b
Órgano linfoide	1.7 ± 0.4 a	1.4 ± 0.5 a	2.2 ± 0.4 a	2.2 ± 0.6 a

Valores en el mismo renglón con la misma literal, son estadísticamente iguales. Duncan's 5%.

En cuanto al grado de severidad por órgano, cámara gástrica fue el de mayor afectación con un GS de 4 para todos los tratamientos, en branquias se mantuvieron valores de 1- 3 siendo 40 ups el más bajo y 35 ups el más alto en glándula antenal 35 y 40 ups un GS 1 para órgano linfoide 35 y 40 ups fue el valor más bajo (2) y los demás tratamientos presentaron un GS de 3 (Tabla XIII).

Tabla XIII. Grado de severidad y promedio de cuerpos de inclusión (CAI'S) por órgano en los tratamientos de salinidad expuestos a WSSV.

Órgano	35 ups	40 ups	45 ups	50 ups
Cámara gástrica	4	4	4	4
Branquia	3	1	3	2
Glándula antenal	2	2	1	1
Órgano linfoide	2	2	3	3

#### IV.3.4. PCR.

Mediante la técnica de PCR se obtuvo que todos los tratamientos del ensayo con salinidad fueron positivos al WSSV ya que en cada grupo analizado se presentó el producto de amplificación correspondiente al ADN de WSSV, siendo los tratamientos de 35 y 50 ups los que presentaron un nivel de infección medio mientras que en 40 y 45 ups se encontró un nivel de infección ligero (Fig. 19).



Figura 19. Gel de agarosa al 2% donde se aprecian los productos de amplificación de los organismos usados en el bioensayo Salinidad–WSSV donde los carriles 1-3 fueron de 35 ups, 4-5 fueron de 40 ups, 6-7 para 45 ups y 8, 9, y 10 para 50 ups. Los carriles 11 y 12 fueron control negativo y positivo respectivamente.

## V. DISCUSIONES.

El síndrome de la mancha blanca tuvo sus primeras apariciones en Asia durante 1992-1993 con pérdidas millonarias a la camaronicultura. No obstante, gracias al dinamismo de la industria, se ha logrado convivir y manejar la enfermedad mediante diversas estrategias, con lo cual también ha sido posible aumentar el conocimiento en el manejo y comportamiento de la misma (Yang *et al.*, 2001).

Con las pruebas realizadas durante este trabajo, se encontraron signos clínicos de WSSV, similares a aquellas encontradas por Ortiz-Ibarra (2006) y Molina-Garza *et al.* (2007), quienes mencionan que los organismos afectados por WSSV se caracterizan por comportamiento letárgico, disminución en el consumo de alimento, coloración rojiza en el exoesqueleto debido a la expansión de cromatóforos y depósitos de calcio en la cutícula. Molina-Garza *et al.* (2007) agregan además el nado errático y la permanencia de organismos infectados en la orilla del estanque, sin embargo estos últimos síntomas no se presentaron en el presente trabajo.

Durante los bioensayos realizados, se coincidió también con los resultados de Ortiz-Ibarra (2006) en cuanto a la falta de las manchas blancas características, que se presentan en los cultivos asiáticos, y que han dado su nombre a esta enfermedad, de igual manera tampoco se han encontrado en diferentes granjas y estudios realizados en México (Molina-Garza *et al.*, 2007) Esto se debe presumiblemente, a las condiciones climáticas imperantes en las zonas de cultivo de nuestro país (Molina-Garza *et al.*, 2007). A su vez, los resultados del presente trabajo también coinciden con lo expuesto por Sahul-Hamed *et al.*, (2001) en cuanto a la aparición de los signos clínicos causados por WSSV. Sin embargo, el tiempo de aparición es diferente, ya que ellos mencionan la aparición de signos a partir de las 24 hpi y en el presente trabajo se presentaron hasta las 48 hpi causado probablemente por diferencias en vías de inoculación y condiciones de cultivo.

El estudio de la enfermedades en los crustáceos es reciente, en una gran mayoría de ellas no se conoce la causa y muchas otras no han sido siquiera reconocidas. Por otro lado, se ha demostrado ampliamente que las enfermedades dependen del sistema de cultivo empleado, asociando en forma directa la intensidad del sistema con el riesgo de enfermedades (Páez-Osuna, 2001).

La asociación del riesgo con el sistema de cultivo es debida a varios factores, entre los que se destaca que en sistemas de cultivo intensivos, una mayor densidad de organismos facilita la transmisión de enfermedades de un organismo a otro. Por otra parte, en estos sistemas el alimento natural disponible no es suficiente y es necesario agregar alimentos artificiales. Si se desconocen los requerimientos nutricionales, es posible que en la mayoría de las ocasiones no se proporcionen alimentos adecuados y suficientes para satisfacer esos requerimientos y por lo tanto se presentan problemas de tipo nutricional, que a su vez predisponen a problemas de tipo infeccioso como ha sido señalado por Páez-Osuna, 2001. Dadas las consideraciones anteriores, en este tipo de sistemas el manejo de la calidad de agua debe ser más estricto, ya que es muy fácil llegar a un rompimiento del equilibrio en cualquier momento y por cualquier causa, generando con esto también problemas de tipo patológico (Páez-Osuna, 2001). Las aseveraciones anteriores, generalmente aceptadas, difieren de lo observado en el presente trabajo, donde los organismos mantenidos a menores densidades presentaron un mayor grado de afectación por WSSV a nivel histológico que aquellos mantenidos a mayores densidades. En el bioensayo con densidad es posible notar que hay una relación inversa de la densidad con la supervivencia de organismos, lo cual concuerda con reportes previos que indican que a mayores densidades *L. vannamei* es sometido a mayor estrés, que se refleja en tasas más altas de mortalidad. El contraste de las tasas de supervivencia con el grado de severidad mostrado, indica una relación poco definida ya que es posible notar en densidades bajas (13.2 org/m<sup>2</sup>), intermedias (26.5 org/m<sup>2</sup>) y altas (39.8 org/m<sup>2</sup>) grados de severidad considerados altos mientras que tratamientos intermedios presentan valores considerados intermedios o bajos. Las referencias de trabajos donde se evalúe el efecto de la densidad son pocos por lo que no es posible contrastar estos resultados, sin embargo, algunas recomendaciones del COSAES, 2006 señalan la importancia de disminuir las densidades en una estrategia encaminada a convivir con el WSSV. La inconsistencia de los resultados, podría atribuirse al comportamiento de los organismos donde por la voracidad del camarón y el modo de inoculación pudo existir una carga viral diferente para cada organismo.

En el bioensayo con temperatura, el tratamiento que se observó menos afectado mediante lo observado por histología y PCR además de presentar la mayor supervivencia con la presencia de WSSV fue el de mayor valor (32 °C), lo cual concuerda con lo obtenido por Rodríguez (2005) quien menciona que la temperatura por si sola actúa de forma positiva sobre la respuesta inmune del hospedero con presencia de una mayor proliferación celular en los organismos sometidos a mayores temperaturas.

La propuesta hecha por Alday-Sanz *et al.* (2006) mencionan que los organismos mantenidos a temperaturas mayores de los 30 °C presentan menor susceptibilidad a WSSV debido a que en altas temperaturas la replicación del virus es bloqueada, coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo donde el tratamiento de 32 °C presentó menor grado de severidad que aquellos a temperaturas menores, sin embargo, los mantenidos a 30 °C presentaron mayor susceptibilidad ante WSSV.

De acuerdo con Vidal *et al.* (2001), el incremento de temperatura de 26 °C a 32 °C modifica dramáticamente la historia natural de WSSV y se ve reflejada en una mayor supervivencia a estas temperaturas. El mecanismo preciso de los efectos de la temperatura en la respuesta inmune esta determinado por el hecho bien conocido de que el incremento de la temperatura corporal induce a la expresión de algunas proteínas biológicamente activas que modifican la respuesta inmune del camarón ante una infección viral; lo cual no coincide con lo observado en el presente trabajo donde se registró mayor sobrevivencia a las temperaturas más altas pero los valores entre 26-30 fueron los más afectados.

La temperatura afecta también algunos pasos del ciclo de replicación de los virus, incluyendo etapas irreversibles como las tasas de absorción, la síntesis de grandes moléculas (proteínas y ácidos nucleicos) y la actividad de las enzimas (Yang, 1990) lo que explica el comportamiento de los camarones en las temperaturas de 32 °C donde el virus presentó poca actividad ya que la supervivencia en esta temperatura fue muy alta y el grado de severidad bajo (GS 2) para este tratamiento. De estos resultados se infiere que los valores más favorables para la replicación del virus son de 26 a 30 °C, lo cual difiere de lo reportado por Guan *et al.* (2003) quienes mencionan que la temperatura para la replicación de WSSV es entre los 23-26 °C.

Las características histopatológicas encontradas en pruebas realizadas con organismos en condiciones de hipertermia (Vidal *et al.*, 2001), revelan que en condiciones de altas temperaturas no se encuentran cuerpos de inclusión en la totalidad de órganos de animales infectados, sin embargo en este trabajo se encontraron cuerpos de inclusión característicos a WSSV en todos los órganos blanco del camarón.

Se conoce que algunas especies de *Penaeus* son consideradas estenosalinas por tener la habilidad de vivir solamente dentro de un estrecho rango de salinidad, por debajo del estándar de agua de mar varias especies son eurihalinas y capaces de soportar fluctuaciones repentinas de salinidad de hasta 10 ppm (Cheng y Chen, 2000). Dentro de estas se incluyen el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) y el camarón tigre de Asia (*P. monodon*) ambos reconocidos como fuertes osmoreguladores.

En algunas explotaciones, los organismos pueden exponerse a niveles de alrededor de 50 ups logrando un buen desarrollo (Nunes y Velásquez-López, 2002). Esto coincide con lo observado en el presente trabajo, donde los organismos aclimatados a las diferentes salinidades tuvieron un buen desempeño antes de ser expuestos a WSSV. Por lo tanto, el daño causado a la glándula antenal no fue tan severo a pesar de ser un órgano osmoregulador, ya que al momento de aplicar la infección este órgano ya no presenta un nivel de estrés tan fuerte como aquel que se realizó en el tiempo de aclimatación.

Los procesos fisiológicos de la osmoregulación se llevan a cabo principalmente en tres órganos: branquia, glándula antenal y el intestino. Las branquias tienen como función principal la absorción de sales. La glándula antenal regula el volumen de líquido interno e intercambia algunas sales reabsorbiendo cloruro de sodio. El intestino se caracteriza por cumplir funciones de absorción de fluidos ión-dependientes (Mantel y Farmer, 1983). En el presente trabajo se encontró que los órganos preferentes por WSSV fueron branquia y glándula antenal, aunque éstos presentan grados de severidad bajos en los niveles más altos de salinidad.

En el presente trabajo las lesiones histopatológicas revelan la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares en branquia, glándula antenal, órgano linfoide y cámara gástrica, principales órganos blanco de este virus. Lo anterior coincide con lo reportado por Yoganandhan *et al.* (2003), quienes mencionan que estos órganos son los principalmente

afectados por WSSV, ya que para todos los tratamientos de salinidad se presentaron grados de severidad altos en cámara gástrica.

Galli y Stern (1999) mencionan que las alteraciones encontradas en el estudio histológico, concuerdan con la funcionalidad de los órganos observados. Las lesiones de los epitelios de la glándula antenal y la exfoliación de la mucosa del intestino medio, llevan al organismo a un estado de choque osmótico irreversible que eventualmente se traduce en la muerte del animal, mientras que el tipo de lesiones observadas podría adicionalmente exponer a los organismos a procesos infecciosos secundarios.

Las vías de infección experimental de WSSV son dos principalmente, la vía de infección por inyección intramuscular y la vía oral la cual puede ser mediante alimentación forzada o bien vía papilla. Carvajal-Sánchez *et al.* (2008) menciona que la infección oral mediante papillas ejemplifica una ruta de infección muy similar a una probable ruta de infección natural, sin embargo la carga viral consumida puede ser diferente, lo cual coincide con lo encontrado en el presente trabajo ya que hubo organismos que a pesar de encontrarse dentro del mismo tratamiento mostraron menor susceptibilidad al virus, que otros.

En el Estado de Sonora las condiciones promedio de las variables de cultivo como salinidad y temperatura se mantienen entre los valores de 28 y 32 °C y salinidades de 40 ups, mientras que las densidades se manejan dependiendo de la zona de cultivo. Siendo para la zona norte (Costa de Hermosillo) es de 29.3 org/m<sup>2</sup>, para la zona centro (Guaymas, Cruz de piedra y Lobos) de 29.1 org/m<sup>2</sup> y para la zona sur (Melagos, Atanasia, Tobarí, Siaric, Aquirupo, Riito, Sta. Barbara y Agiabampo) de 17 org/m<sup>2</sup> (COAES, 2006). Lo anterior coincide con los resultados aquí mostrados ya que las condiciones de temperatura que se encuentran en estas zonas resultaron las menos afectadas en el presente estudio.

Para salinidad por su parte, difiere, ya que los valores reportados en cultivo son aquellos de menor sobrevivencia en el presente estudio, pero los de menor grado de severidad. En densidad de organismos se reporta en el presente trabajo que las densidades de cultivo reales se ajustan a las densidades que presentaron una susceptibilidad media a WSSV.

Los tiempos de supervivencia de los organismos, diferentes en todos los bioensayos, nos muestra que temperatura 48 horas, salinidad 80 horas y densidad 108 horas en ese orden, influyen sobre la supervivencia de los camarones expuestos a WSSV haciendo manifiesta la importancia relativa de un adecuado control de estos factores. Por otra parte la mayor presencia de signos del virus, detectados principalmente por histopatología podría indicar que la capacidad del camarón para tolerar la presencia del virus, aumenta cuando las condiciones son cercanas al óptimo, permitiendo una dispersión mayor en los organismos y en el caso contrario, el organismo muere antes de que el virus ataque los órganos con mayor intensidad.



## **VI. CONCLUSIONES.**

De acuerdo con el presente estudio, las condiciones de temperatura y salinidad ejercen un efecto en la supervivencia, mayor que aquel ejercido por densidades recomendadas de cultivo, sin embargo, densidades mayores a las recomendadas parecen tener un efecto directo en el grado d estrés del camarón, reflejado en una mayor presencia del virus y por ende una mayor mortalidad.

Por otra parte condiciones de cultivo cercanas a las óptimas reportadas, favorecen una mayor tolerancia a la presencia del virus, como se ve en los tiempos de supervivencia y presencia del virus en los organismos.

Dado lo anterior se considera de vital importancia cuidar los rangos de éstas variables ya que como se ha mencionado antes, el factor de estrés esta relacionado a los cambios en los factores abióticos como son temperatura, salinidad así como la densidad es aprovechado por patógenos como WSSV.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Es altamente recomendable la continuación de estudios con WSSV en esta área, ya que las variables como temperatura y salinidad presentan una gran interacción con otras variables como concentración de oxígeno, pH entre otras, representando de alguna manera factores de riesgo para el cultivo de camarón ante una amenaza de este virus.

Considerando los resultados obtenidos, resulta de particular interés explorar el impacto de la densidad de población, a las temperaturas y salinidades de operación comerciales y las determinadas aquí como aquellas donde la virulencia del WSSV es menor, como pudiera ser como 32 °C y 40 ups.

Es recomendable que ante una sospecha de WSSV se realicen análisis tanto por PCR como por histología ya que si bien la técnica de PCR es muy práctica por la rapidez de sus resultados en algunos casos pueden presentarse anomalías ya sea por el tratamiento de la muestra, por la caducidad de los reactivos o bien por el tiempo transcurrido desde el momento de la toma de la muestra hasta el análisis.

## VIII. LITERATURA CITADA.

- Alday-Sanz V. M.M Escobedo-Bonilla, C.M Coortel, M. Dantas-Lima y J.J. Wille. 2006. Effect of high water temperature (33° C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*.
- Bachère, E. E., Y. Miahle y J. Rodriguez. 1995. Identification of defense effectors in the haemolymph of crustacean with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and application. *Fish & Shellfish Immunology*. 5: 597-612.
- Bell, T.A. y D.V. Lightner. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. Special publication.
- Boyd, C.E. 1989. Water quality management and aeration in shrimp farming. Fisheries and Allied Aquacultures Departmental Series. No 2 Alabama Agricultural Experiment Station. Auburn, University, Alabama 70 pp.
- Bray, W. A., A. L. Lawrence y J.R. Leung-Trujillo. 1994. The effects of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interactions of IHHN virus and salinity. *Aquaculture Research*. 122:133-146.
- Calderón, J. y S. Sonnenholzer. 2003. Cultivo de camarón: experiencia y desafíos en el uso de invernaderos. *El mundo acuícola* 9: 4-8.
- Carvajal-Sánchez. I. S., R. Castro-Longoria y J.M. Grijalva-Chon. 2008. Experimental WSSV challenge of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone) at different salinities. *Aquaculture Research*. En prensa.
- Chang, P.S., H.C. Chen y Y.C. Wang. 1998. Detection of the white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture Research*. 164: 233-242.
- Chen, J. C. y C.Y. Lin. 1994. Responses of osmotic and chloride concentrations of *Penaeus chinensis* Osbeck subadults acclimated to different salinity and temperature levels. *Journal Experimental Marine Biology Ecology*., 179, 267-278.
- Cheng, W. y J.C. Chen. 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the fresh water prawns *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunology*., 10: 387-391.

- Cifuentes-Lemus, J.L., M.P. Torres-García y M. Frías-Mondragón. 1997. El océano y sus recursos XI acuicultura. 2da. Edición. Fondo de cultura económica S.A. de C.V. México D.F 127-135.
- Corbel, V., Z., Zuprizal, C. Shi, H. Sumartono, J.M Arcier y J.R. Bonami. 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Fish Diseases*, 24:377-382.
- COSAES. 2006. Diagnóstico de datos técnicos de granjas acuícolas. 2004-2006. 99-115, 86-88. Reporte Técnico.
- FAO. 2004. The state of world fisheries and Aquaculture in 2004 (SOFIA) a FAO report, March-April 34.
- Galli, L. y S. Stern, 1999. Alteraciones histológicas por cambios en la salinidad en juveniles de *Litopenaeus vannamei*. *Acuicultura del Ecuador*. Mayo-Junio. Pp. 31-33.
- Garza, J.R., K.W. Hasson, B.T. Poulos, R.M. Redman, B.L.White, y D.V. Lightner. 1997. Demonstration of infectious Taura Syndrome Virus in the feces of the seagulls collected during an epizootic in Texas. *Journal of Aquatic Animal Health*. 9:156-159.
- Guan, Y., Y. Zhiming y C. Li. 2003. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83: 257-260.
- Gutiérrez-Venegas, J.L. 2005. La industria del cultivo de camarón en México, su historia presente y proyección a futuro. *Industria Acuícola*. 1: 6-22.
- Hill, B.J. 2000. The impact of disease spread. *International Trade in Farmed Fish and Shellfish in: Sustainable Animal Production*. Hannover, Germany. October 16, 2000.
- Jory, D.E. 1999. Shrimp white spot virus in the western hemisphere. *Aquaculture Magazine*. 25 (3). Pp. 83-91.
- Le Moullac, G. y P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacean. *Aquaculture Research*. 191: 121-131.
- Lightner, D.V. 1992. Shrimp virus disease: Diagnosis, Distribution y management. In: Wyban, J. (Ed.), *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA, pp. 253-283.
- Lightner, D. V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: Mcvey. J. (ed) *CRC handbook of mariculture*, Vol. 1. Crustacean Aquaculture CRC press boca Raton, P 393-486.

- Lightner, D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostics procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Section 3: Viruses. World Aquaculture Soc. Baton Rouge, LA.
- Lightner, D.V. y R.M. Redman, 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods *Aquaculture Research*. 164: 201-220.
- Lightner, D.V., K.W. Hasson, B.L. White y R.M. Redman. 1998. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with asian white spot syndrome virus and asian yellow head virus. *Aquatic Animal Health*, 10: 271-281.
- Lo, C.F., H.C. Hsu, M.F. Tsai, C.H. Ho, S.E. Peng, G.H. Kou, D.V. Lightner. 1999. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Diseases. Aquaculture. Org.* 35: pp 175-185.
- Limsuwan, C. 2001. Ciertas consideraciones de manejo para el cultivo exitoso de camarón en tierras continentales. *Boletín Nicovita Camarón de Mar*. 6. (01). pp 1-4.
- Mantel, L.H. y L. L. Farmer. 1983. Osmotic and ionic regulation In: *The biology of Crustacea*. 5. Mantel, L.H. Ed., Academic Pres, New York.
- Martínez-Córdova, L. R. 2002. Camaronicultura avances y tendencias. A.G.T. Editor México D.F. Pp 28-63.
- McFarland, W. N. y B.D. Lee. 1983. Osmotic and ionic concentration of Penaeidean shrimps of the Texas coast. *Bull. Mar. Sci. Gulf Carib.* 13. pp 391-417
- Molina-Garza, Z.J., L. Galaviz, J.C. Ibarra, J.M. Alcocer, y J.L. Rosales. 2007. Filogenia del virus de la mancha blanca (WSSV) patógeno de *Litopenaeus spp* en México. *Industria acuícola*. 4:10-14.
- Newman, S.G. 1999. A review of the use of non specific immune-stimulants to reduce the impact of the WSSV. Paper presented at the Fifth Ecuatorian Aquaculture Conference, Cenaim, Guayaquil, Ecuador. Oct. 28-30, 1999.
- Nunes, J.P. y M.Velásquez-López. 2002. *Boletín Nicovita camarón de mar*. 7 (1) 5 pp.
- Ochoa-Meza, A.R., A.O. Santos-Moroyoqui y M.L. Unzueta-Bustamante. 2006. Efecto del WSSV sobre camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) cultivado experimentalmente a bajas salinidades. *Industria Acuícola*. 2. (3) 4-8.

- Ortiz-Ibarra, L.F. 2006. Tiempo al que se presenta el primer daño citológico provocado por WSSV en *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) al ser inoculado oralmente. Tesis de Licenciatura en Biología. Instituto Tecnológico Agropecuario No 21. Bácum, Sonora. 48 pp.
- Páez-Osuna, F., 2001. Camaronicultura y medio ambiente. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mazatlán, Sinaloa, México. 452 pp.
- Pruder, G.D., C.L. Brown, J.N, Sweeney y W.H. Carr. 1995. High health shrimp systems: seed supply, theory and practice. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S., Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 40-52.
- Rodríguez, J., B. Bayot, Y. Amano, F. Panchana, I de Blas, V. Alday y J. Calderón. 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vananmei* (Boone) in Ecuador whit emphasis on histopathology and ultraestructure. Journal of Fish Diseases, 26: 439-450.
- Rodríguez, J. 2005. Efecto sobre la respuesta inmune y la supervivencia a desafíos con WSSV de la combinación temperatura inmunoestimulantes. Boletín informativo fundación CENAIM-ESPOL; Ecuador. pp 1-3.
- SAGARPA, 2000. Anuario Estadístico de Pesca. SAGARPA, Mexico.
- SAGARPA, 2003. Anuario Estadístico de Pesca. SAGARPA, Mexico.
- SAGARPA, 2004. Anuario Estadístico de Pesca. SAGARPA, Mexico.
- Sonnenholzner, S.J., F. Rodríguez, I. Pérez, F. Betancourt-Echeverría y J. Calderón. 2002. Supervivencia y respuesta inmune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. Boletín El mundo acuícola 8(1), 50-56.
- Takahashi, Y., T. Itami, M. Kondo, M. Maeda, R. Fujii, S. Tomonaga, K. Supamattaya y S. Boonyaratpalin. 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). Fish Pathology. 29:121-125.
- Vidal, O., C. Granja, F. Aranguren, J.A. Brack y M. Salazar. 2001. A profound effect of the hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White Spot Syndrome Virus. Journal of the World Aquaculture Society. 32:364-372.

- Vlak J.M., J.R. Bonami, T.W. Flegel, G.H. Kou, D.V. Lightner, C.F. Lo, P.C. Loh, y P.J. Walker. 2002. *Nimaviridae*, A new virus family infecting aquatic invertebrates. XIIth International Congress of Virology, 27 de Julio a 1 de Agosto. Paris. Francia.
- Wang, C.S., K.F.J. Tang, G.H. Kou, y S.N. Chen. 1997. Light and electron microscopic evidence of white spot disease in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) and the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* (Bate) cultured in Taiwan. *Journal of fish Diseases*. 20: 323-331.
- Willumsen, B. 1989. Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. *J. Fish Diseases*. 12: 275-277.
- Wu, J.L., A. Namikoshi, T. Nishizawa, K. Mushiake, K. Teruya, y K. Muroga. 2001. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47: 129-135.
- Wyban, J.A., J.S. Swingle, J.N Sweeney y J.D Pruder. 1992. Development and commercial performance of high health shrimp using specific pathogen free (SPF) broodstock *Penaeus vannamei*. In: Wyban, J.A., (Ed.), *Proceedings of the Special Session on Farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 254-259.
- Yang, F., J. He, X. Lin, Q. Li, D. Pan, X. Zhang y X. Xu. 2001. Complete genoma sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *Journal of Virology*. 75: 11811-11820.
- Yang, F.H.(Ed.). 1990. *Virology*. Hunan science and technology press, Changsha, pp.173-247.
- Sahul Hameed, S., K. Yoganandhan, S. Sathish, M. Rasheed, V. Murugan y Kunthala Jayaraman. 2001. White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture*, 201 3-4 pp 179-186.
- Yoganandhan, K., S. Shatish, V. Murugan, R.B. Narayanan y A.S. Sahul-Hammed. 2003. Screening the organs for early detection of white spot síndrome virus in *Penaeus indicus* by histopatology and PCR techniques. *Aquaculture Res*, 215: 21-29

## **APÉNDICE I.** Protocolos de laboratorio seguidos en este estudio.

### **MATERIALES Y REACTIVOS**

- Alcohol etílico al 100 %.
- Agua destilada
- Ácido acético glacial
- Azul de metileno
- Ácido clorhídrico concentrado
- Alcohol de caña
- Ácido cítrico
- Cassettes
- Charola o tabla de disección
- Cristales hematoxilina
- Cronómetro
- Cubre objetos 22X30 y 22X50
- Cubetas de tinción
- Estuche de disección
- Eosina Y
- Floxina B
- Formaldehído
- Frascos plásticos con boca ancha
- Fucsina básica
- Grenetina
- Glicerol
- Navajas para micrótomo
- Xileno
- Guantes de látex quirúrgicos
- Gradilla o rack para portaobjetos
- Hidróxido de amonio
- Xileno (o Hemo De)
- Ictiómetro o vernier
- Jeringas insulínicas, de 5 y 10 ml
- Pañuelos desechables
- Medio de montaje
- Moldes para bloques
- Oxido de mercurio rojo
- Porta objetos esmerilados
- Placa caliente
- Portaobjetos cargados
- Papel parafilm
- Papel secante
- Parafina P.F. 54- 56 ° C
- Sulfato de aluminio y potasio



### **Medidas de seguridad.**

En el preparado y manejo de las soluciones es necesario atender a las medidas de seguridad recomendadas por los fabricantes de los productos, en especial al manejar soluciones cáusticas, recomendándose para su manejo el siguiente equipo de protección:

- Bata de laboratorio.
- Guantes de látex.
- Máscara antivapores.
- Lentes de seguridad
- Uso de propipetas.
- Uso de campanas extractoras en los laboratorios.

Tener sumo cuidado de no sobrecalentar la parafina pues cuando ésta llega a temperaturas cercanas a los 80°C es inflamable.

Extremar cuidados en el uso del Silo ya que el contacto con este compuesto produce cáncer así como los alcoholes grado reactivo.

Tener cuidado en el manejo del fuego en estas áreas ya que es muy frecuente el uso de sustancias inflamables.

Extremar cuidados en la manipulación de la navaja del micrótopo al momento de instalarla para evitar accidentes.

Usar siempre el seguro del micrótopo al momento de colocar el bloque, previo a cortar, pues al hacer presión para sujetarlo, si no está puesto el seguro es común que ocurra el deslizamiento natural, pudiendo ocasionar un accidente. Es aconsejable retirar el portanavajas al momento de colocar el bloque para evitar posibles accidentes.

Etiquetar debidamente cada una de las soluciones para evitar confusión en su manejo.

Tener cuidado de no verter al lavabo las sustancias de deshecho pues en su mayoría son tóxicas, se recomienda manejar como basura especial.

Las porciones sobrantes de organismos fijados se recomienda incinerar o enterrar en fosa séptica para evitar posibles envenenamientos con animales

## Protocolo histológico.

La fijación es una operación destinada a la conservación de los tejidos y su propósito es mantener los tejidos de la forma más parecida a su estado normal, previniendo lo más posible la autólisis. La solución Davidson AFA\* (Humanson 1972), es el fijador por excelencia utilizado en camarones (para su preparación ver tabla). En la fijación se recomienda seguir los siguientes pasos:

1. Inyectar de 0.1 a 10 ml. de fijador (dependiendo del tamaño del camarón), en la región dorso-lateral del hepatopáncreas, por ambos lados.
2. Inyectar en ambos lados de la región anterior, media y posterior del abdomen como se muestra en la figura. Realizar cortes superficiales de cutícula en región cefalotorácica, justo en la línea media dorsal, procurando que el corte no interese el tejido.
3. En la porción abdominal se realizan cortes a ambos lados de la región media lateral.
4. Sumergir en solución Davidson durante un periodo de 24 a 72 hrs. dependiendo del tamaño del organismo, manteniendo la relación de fijador-muestra (10:1).
5. Al término del proceso de fijación los organismos deberán ser transferidos a una solución de alcohol etílico (50 - 70%) para su almacenaje hasta su procesado.



La figura de la izquierda presenta un corte longitudinal de la región cefalotorácica de un camarón. En la imagen de la derecha se pueden apreciar las secciones de mayor interés para el diagnóstico de enfermedades. De izquierda a derecha: 5o y 6o segmento abdominal,

1er segmento abdominal, branquias, cefalotórax (seccionado en dos porciones) y cassette contenedor.

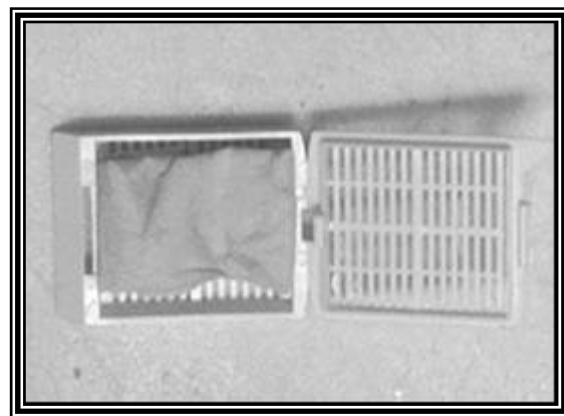
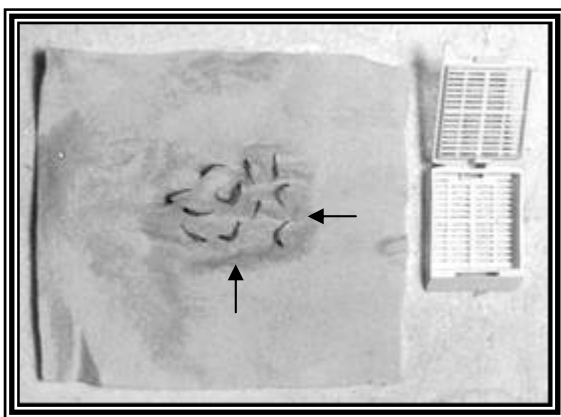
#### **Formulación de la solución Davidson AFA.**

Formaldehído al 37-41 % no amortizado.\*AFA= Alcohol, Formalina y Acido acético (Humason, 1972).

<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD (ml)</b>
Etanol	330
Formalina	220
Acido acético glacial	115
Agua potable	335

#### **Seccionado de muestras (Bell y Lightner, 1988).**

El camarón se disecciona con un bisturí o navaja, las porciones de interés serán colocadas en un cassette plástico mismo que contendrá las muestras durante todo el procesado hasta la preparación de los bloques. Para larvas y juveniles pequeños no es necesaria la disección; es suficiente con sólo colocar los organismos en los cassettes como se muestra en la ilustración. Para el caso de larvas se pueden envolver en papel absorbente, para evitar que salgan del cassette durante el procesado; para lo anterior se deben seguir las siguientes consideraciones:



Las ilustraciones muestran la forma de como se pueden contener postlarvas en los cassettes evitándose así que salgan por las rendijas durante el procesado. La envoltura es de pañuelo desechable (puede ser esponja) y contendrá la muestra hasta el momento de realizar el bloque de parafina.

1. Inicialmente se toman las características físicas externas y se anotan en la bitácora los datos biométricos más relevantes.
2. Posteriormente se realiza un corte transversal en la región media del primer segmento abdominal, separando así la porción cefalotóraxica de la abdominal.
3. Realizar corte longitudinal en la línea media ventral del cefalotórax.
4. Tomar una porción media y retirar apéndices (pereiópodos, maxilas, etc.), lo que evitará dañar la navaja del micrótopo.
5. Extraer cuidadosamente cutícula, mandíbula y exceso de alimento, cuidando de no retirar tejido epitelial, pues éste resulta de gran importancia en el diagnóstico de ciertas enfermedades.
6. Realizar un corte transversal en la parte anterior del cefalotórax, a la altura de la base del pedúnculo ocular.
7. Posteriormente la porción resultante es introducida dentro del cassette, si ésta es muy grande y gruesa tendrá que ser seccionada de tal forma que el cassette contenedor no la presione (grosor de 4 mm. aprox.); para el caso de organismos grandes estos serán seccionados por partes (a,b,c, y d), en el caso de que así se requiera, procurar incluir en estas porciones los órganos o tejidos de mayor interés
8. Anotar en el cassette la clave correspondiente a la muestra.
9. Todos los casetes preparados son introducidos en alcohol al 70%.

### **Deshidratación e infiltración en parafina.**

La deshidratación tiene como función la eliminación del agua para lograr la infiltración de la parafina; el proceso consiste en llevar los tejidos de una concentración de alcohol etílico de 70% hasta el 100% en forma gradual posteriormente se incluye en una solución de xileno, el siguiente paso es desalojar el xileno lo cual se logra con la infiltración de parafina líquida en

los tejidos, mediante la rutina de deshidratación, infiltración de parafina (Bell y Lightner, 1988) como se muestra a continuación:

SOLUCIÓN	TIEMPO (hr)
Etanol 70% (1)	1
Etanol 70 % (2)	1
Etanol 80 % (1)	1
Etanol 80 % (2)	1
Etanol 95 % (1)	1
Etanol 95 % (2)	1
Etanol 100 % (1)	1
Etanol 100 % (2)	1
Xileno (1)	1
Xileno (2)	1
Parafina (1)	1
Parafina (2)	1

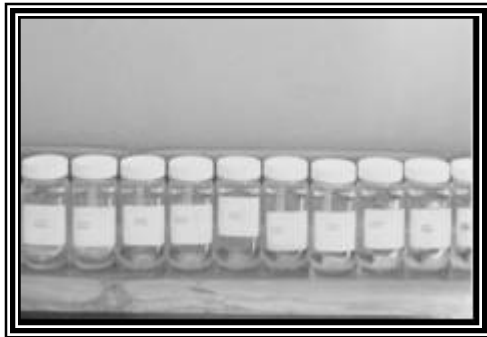
### **Inclusión en parafina (Bloqueo).**

Posterior a la infiltración en parafina se realiza la inclusión de los tejidos en parafina o realización del bloque. Esta operación se basa en el principio de que la parafina proporciona un medio sólido a temperatura ambiente lo cual facilita su corte al micrótopo.

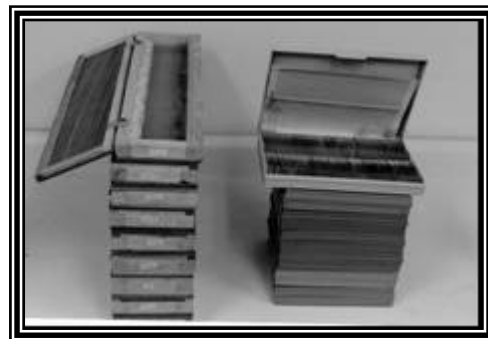
Antes de la solidificación se eliminan las burbujas, se recomienda que el tejido se coloque de una forma estratégica, de tal manera que la porción de interés esté orientada por el lado que será cortado por la cuchilla del micrótopo. Una vez estos listos se almacenan en un refrigerador a una temperatura de 5°C para facilitar su corte.

1. Una vez elaborados los bloques, se procede a cortar al micrótopo a un grosor no mayor de 5 µm.
2. Los cortes se extienden en un baño de tejidos con agua (0.12% de gelatina microbiológica) a 45°C.

3. Se selecciona del listón de cortes, aquel que contenga la presencia de mayor número de tejidos u órganos que interesen revisar (verificar al microscopio).
4. Se monta sobre un portaobjetos, éste deberá estar previamente señalado con la clave correspondiente al tejido.
5. Dejar secar el tejido durante 24 hrs. a temperatura ambiente libre del polvo o llevarlo a la estufa a una temperatura de 60°C por un tiempo de 30 minutos, se recomienda ésta última opción.



En la figura de la izquierda se pueden apreciar los recipientes que contienen etanol y dos recipientes de xileno los cuales sirven para deshidratar y aclarar los tejidos. La segunda ilustración muestra de izquierda a derecha un micrótopo rotatorio, un baño de flotación y un histoembebedor (bloqueador).



Caja de cassettes, medio de montaje, cubreobjetos y hematoxilina ya lista para ser usada. En la segunda ilustración se muestran cajas porta laminillas las cuales sirven de archivero.

### **Rutina de tinción.**

La rutina de tinción comprende los diferentes procesos en los que se encuentran: desparafinación, hidratación, tinción, fijación del colorante, y deshidratación para su posterior montaje.

### **Rutina de tinción (Bell y Lightner, 1988).**

<b>SOLUCIÓN</b>	<b>TIEMPO</b>
Xileno (1)	2 min
Xileno (2)	2 min
Etanol al 100 % (1)	1 min
Etanol al 100 % (2)	1 min
Etanol al 95 % (1)	1 min
Etanol al 95 % (2)	1 min
Agua de la llave	10 min
Hematoxilina	15 min
Agua de la llave	20 min
Alcohol ácido	10 sumergidas
Agua Amoniacal	5 sumergidas
Agua de la llave	20 min
Eosina-floxina	30 seg
Etanol al 95 % (1)	2 min

<b>SOLUCIÓN</b>	<b>TIEMPO</b>
Etanol al 95 % (2)	2 min
Etanol al 100 % (1)	3 min
Etanol al 100 % (2)	3 min
Xileno (1)	2 min
Xileno (2)	2 min
Montaje	

**NOTA:** Los tiempos de tinción pueden variar con base en el tiempo de preparación de los reactivos.

Formulación para la preparación de Hematoxilina de Harris.

<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Cristales de hematoxilina	5.0 g
Etanol absoluto	50 ml
Sulfato (Alum) de aluminio y potasio	100.0 g
Agua destilada	1000 ml
Óxido de mercurio rojo	2.5 g

Formulación del alcohol ácido.

<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Etanol al 70 %	1000 ml
Ácido clorohídrico conc.	10 ml

Formulación del agua amoniacal.

<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Agua destilada	1000 ml.
Hidróxido de amonio	2 a 3 ml.



#### Formulación de Eosina-floxina.

REACTIVO	CANTIDAD
Solución de eosina (1% Sol. acuosa de eosina Y)	100 ml
Solución de floxina (1% Sol. acuosa floxina B)	10 ml
Etanol al 95%	780 ml
Ácido acético glacial	4.0 ml

#### Formulación de alcohol ácido, agua amoniacal.

REACTIVO	CANTIDAD
Alcohol ácido: EtOH* 70%	1000 ml
HCl conc.	10 ml
Agua Amoniacal: Agua destilada	1000 ml
NH <sub>4</sub> OH	2-3 ml <sup>&amp;</sup>

\*EtOH= Etanol

<sup>&</sup> Por cada 100 ml de solución

#### Montaje.

El montaje del tejido es el último paso que concreta la preparación de las muestras, en el cual es muy importante el tamaño del corte pues de este depende la cantidad de medio de montaje así como el tamaño del cubreobjetos, para este caso en muestras grandes se utilizaran cubreobjetos de un tamaño de 22 x 50 mm mientras que para muestras pequeñas de 22 x 30 mm el medio de montaje a utilizar es de uso histológico constituido por tolueno, resina acrílica y antioxidante:

1. Adicionar 2 ó 3 gotas en un costado del portaobjetos que contiene la muestra.
2. Se toma el portaobjetos y se orienta hacia el cubreobjetos al hacer contacto en un punto cercano a los bordes.
3. Se inclina lenta y suavemente hasta empalmarlos, es importante anotar que una vez que el ángulo de inclinación entre cubre y porta se estrecha, el cubreobjetos que esta en la parte inferior, se adhiere al portaobjetos, si se deja que estos se empalmen de una forma natural por fenómeno de adhesión se evitan problemas con burbujas.

4. Se hace una pequeña presión para retirar el exceso de resina y posteriormente se alinean correctamente.
5. Dejar secar a temperatura ambiente.

Una vez preparadas las laminillas, están listas para ser revisadas al microscopio en campos de 4, 10, 20, 40 y 100X respectivamente a fin de detectar anomalías en los tejidos.

### **Análisis por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Toma de muestra: Se colectan pleópodos de los organismos y se almacenan en alcohol al 96%.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se lleva a cabo como sigue:

#### **IQ2000™ WSSV\* Detection and Prevention System.**

1. ADN extraído por Buffer de Lisis para pleópodos, pereiopodos, branquias, <PL12, nauplios solamente.
  - a. Colocar la muestra en un tubo eppendorff de 1.5 ml.
  - b. Adicionar 500 µl de Buffer de Lisis y macerar adecuadamente.
  - c. Incubar la preparación a 95°C por 10 minutos, después centrifugar a 12000 x g (12000 rpm r=5 a 7 cm) por 10 minutos.
  - d. Transferir 200 µl de la solución clara (sobrenadante) a un tubo eppendorff limpio de 1.5 ml y agregar 400 µl de EtOH 95%.
  - e. Agitar (vortex) brevemente, centrifugar a 12000 x g durante 5 minutos, decantar el EtOH y secar el pellet.
  - f. Disolver el pellet con ddH<sub>2</sub>O o buffer TE.
  
2. Dilución de ADN: Dependiendo de la muestra, esta contendrá diferentes concentraciones de ADN, por lo que se requiere de ajustar la concentración disolviendo el pellet de ADN en diferentes volúmenes de ddH<sub>2</sub>O o Buffer TE.

<b>ORIGEN DE LA MUESTRA</b>	<b>VOLUMEN</b>
Pedúnculo ocular de reproductores	100 µl
PL	200 µl
Pleopodo o pereopodo	200 µl
Branquia	50 µl
Fondo de estanque	20 µl
Agua de estanque	10 µl

Si la muestra deberá ser preservada por un largo periodo de tiempo, el buffer TE es recomendado. Las muestras deberán ser almacenadas a -20°C por un tiempo no mayor de 1 año.

3. Protocolo de amplificación: El siguiente protocolo de amplificación es para realizarlo en tubos eppendorf de 0.2 ml de pared delgada o placa de 96 rxns.

#### **Condiciones de reacción.**

Perfil de la primera reacción:

94°C 30 segundos; 62°C 30 segundos; 72°C 30 segundos, repetir 5 ciclos y después  
 94°C 15 segundos; 62°C 15 segundos; 72°C 20 segundos, repetir 15 ciclos y después  
 Adicionar 72°C 30 segundos; 20°C 30 segundos al final del ciclo.

Perfil de la reacción anidada.

94°C 20 segundos; 62°C 20 segundos; 72°C 30 segundos, repetir 25 ciclos y adicionar  
 72°C por 30 segundos; 20°C por 30 segundos al final del ciclo.

#### **Preparación de reactivos:**

Mezcla de reactivos para la primera reacción de PCR: 8 µl/reacción.

First PCR PreMix		7.5 µl
IQzyme DNA Polimerase	2U/µl	0.5 µl

a. Mezcla para la reacción anidada de PCR: 15 µl/reacción

Nested PCR PreMix		14 µl
IQzyme DAN Polymerase	2U/µl	1 µl

### **Procedimiento de reacción.**

- a. Preparar las mezclas de reactivos de las reacciones primera y anidada requerida de acuerdo al no. de muestras. Para cada mezcla de reacción, usar solo lo necesario para tener 3 estándares positivos ( $10^3$ ,  $10^2$  y  $10^1$ ) y un control negativo (ddH<sub>2</sub>O o yeast tRNA).
- b. Pipetear 8  $\mu$ l de la mezcla de la primera reacción en cada tubo de 0.2 ml debidamente etiquetado.
- c. Adicionar 2  $\mu$ l de la muestra de ADN extraída o los estándares de cada mezcla de reacción.
- d. Cubrir cada mezcla de reacción con aceite mineral (NO NECESARIO)
- e. Realizar la primera reacción.
- f. Adicionar 15  $\mu$ l de la mezcla para la reacción anidada después de que la primera reacción haya terminado.
- g. Realizar la reacción anidada.
- h. Después de la reacción anidada haya sido completada, adicionar 5  $\mu$ l de 6X loading dye a cada tubo de reacción y mezclar bien.
- i. Después de la mezcla la muestra está lista para la electroforesis.

### **Electroforesis.**

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio Invitrogen (cat #G501801, part. # 45-0111), donde se colocaran 10  $\mu$ L de la muestra que salió del termociclador y se coloca esto en una cámara de electroforesis E-gel Invitrogen durante 15 minutos. Se analizaron las bandas amplificadas con un transiluminador UV UVP.