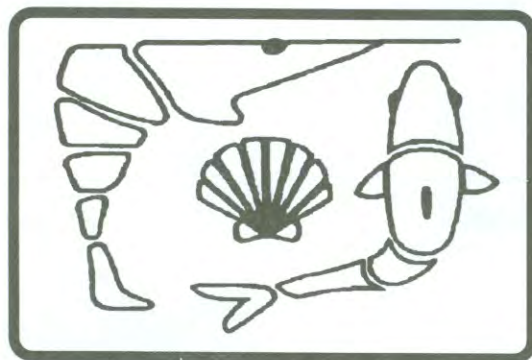




EL SABER DE MIS HIJOS  
HARÁ MI GRANDEZA

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

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ACUACULTURA**



**ROUTA DE INFECCIÓN DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA  
(WSSV) EN *Penaes vannamei* (Boone, 1931) MEDIANTE INFECCIÓN VIA ORAL**

**TESIS**

**que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS  
presenta:**

**ANA LAURA CARBAJAL HERNÁNDEZ**

# 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

## CONTENIDO

<b>RESUMEN.</b>	i
<b>ABSTRACT.</b>	ii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.</b>	iii
<b>ÍNDICE DE TABLAS.</b>	vi
<b>I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.</b>	1
<b>II.- OBJETIVOS.</b>	10
II.1 Objetivo General.	10
II.2 Objetivo Particular.	10
<b>III.- MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	11
III.1 Diseño experimental.	11
III.2 Obtención del inóculo y reactivación.	11
III.3 Infección de organismos.	12
III.4 Toma de muestras.	12
III.5 Tratamiento de Muestras.	13
III.6 Obtención de hemolinfa.	13
III.7 Análisis Histológico.	14
III.7.1 Observación de laminillas Reacción para PCR.	14
III.8 Extracción de ADN.	14
III.9 Reacción para PCR.	14
III.10 Amplificación de ADN.	16
III.11 Electroforesis de ADN.	16
III.12 Hibridación <i>In situ</i> .	16
III.13 PCR tiempo real	18
<b>IV.- RESULTADOS.</b>	19
IV.1 Infección experimental.	19
IV.2 Análisis histológico y Seguimiento de la infección Viral.	19
IV.3 Análisis de PCR.	26
IV.3.1 Reactivación del inóculo para la infección experimental.	26
IV.3.2 Seguimiento de la infección.	26
IV.4 Análisis de Hibridación <i>in situ</i>	31
IV.4.1 Seguimiento de la Replicación viral.	31

IV.5 PCR tiempo real.	38
<b>V. DISCUSIONES.</b>	39
<b>VI. CONCLUSIONES.</b>	47
<b>VII. RECOMENDACIONES.</b>	48
<b>VIII. LITERATURA CITADA.</b>	49
<b>IX. ANEXOS.</b>	56

## RESUMEN

El virus del síndrome de la mancha blanca WSSV, ha sido catalogado como uno de los más virulentos debido a que los camarones peneidos experimentan hasta el 100% de mortalidad en unos pocos días en las granjas camaronícolas. Además, presenta una rápida diseminación y un amplio espectro de hospederos. Su forma y tiempo de replicación sobre los tejidos es importante debido a que puede ayudar a realizar un diagnóstico temprano para ayudar a prevenir grandes mortalidades masivas de los camarones en cultivo. Debido a lo anterior el objetivo del presente estudio fue realizar el seguimiento de la infección del WSSV en tiempos tempranos de infección mediante inoculación vía oral; así como el registro de los primeros daños celulares, los sitios de replicación primaria y la progresión de la infección. Dos grupos de organismos fueron inoculados vía oral por medio de una cánula de venoclisis. El grupo experimental se infectó con 100 µl de inóculo de extracto de tejido infectado con WSSV, mientras que el segundo grupo fueron los organismos control. Se realizó el seguimiento de la infección en ambos grupos por medio de Histología (H-E), PCR, Hibridación *in situ* y PCR de tiempo real durante las 0, 1, 2, 4, 6, 12 y 48 horas post-infección, hpi. Los resultados indicaron que el virus del síndrome de la mancha blanca al ser inoculado en *P. vannamei* oralmente, las primeras células que se infectaron fueron las células del epitelio estomacal (2-4 hpi) en donde el virus se replicó rápidamente (6 hpi); posteriormente, posiblemente siguió la infección de acuerdo con el modelo descrito para otros baculovirus en insectos; donde el virus cruza la lámina basal hasta alcanzar capa de tejido conectivo y/o sitios asociados a senos hemales, para ser transportado por circulación de la hemolinfa (6 hpi) e infectar las branquias (12 hpi) y otros órganos de origen ectodermal y mesodermal (48 hpi); hasta finalmente invadir al organismo y provocar la muerte. Los resultados de PCR de tiempo real comprobaron los resultados de PCR e hibridación *in situ*, donde se demostró un claro incremento del ADN viral presente en estomago a partir de las 2, 4, 6, 12 y 48 hpi.

## ABSTRACT

It has been catalogued to the white spot syndrome virus, WSSV, as one of the more virulent pathogen due to that the penaeid farmed shrimps reached mortalities of 100% in a few days. Furthermore, it has higher dissemination than other viruses having a wide spectrum of hosts. Its mode and time of replication on tissues is important because its diagnosis at early times could be of great help to prevent mass mortalities. Because of this, the objective of this work was to follow up the early course of infection (48 h) using an infective procedure of oral feeding, with a probe containing positive shrimp tissue extract to WSSV in two experimental groups of shrimps of *Penaeus vannamei*. First damage of tissues was analyzed on shrimps by histopathology (Hematoxylin-Eosine), PCR, *in situ* Hybridization and Real Time PCR. Samples of individual shrimps were taken and analyzed at 0, 1, 2, 4, 6, 12 and 48 hours post infection, hpi. The results by histopathology and *in situ* Hybridization indicated that oral administration of WSSV on *P. vannamei* affected the epithelial cells of the stomach. WSSV demonstrated a fast replicating of the virus from 2-4 hpi to 6 hpi. Also PCR demonstrated positive results at sampled times. With this result, we believe that infection could be demonstrated similarity as the other baculoviruses in insects, where it is passing the basal lamina, reach the connective tissue and the associated hemal sinuses, circulating it through the hemolymph at 6 hpi, reaching the gills at 12 hpi and then to others ectodermic and mesoderm origin tissues at 48 hpi to finally invading to all organs and provoke the dead by the viral invasion. Real Time PCR corroborated the results of PCR, and *in situ* Hybridization, demonstrating increased WSSV-DNA in stomach tissues at 2, 4, 6, 12 and 48 hpi.

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Microscopía electrónica del Virus de la mancha blanca (WSSV).	4
2	Sistema Digestivo. Sitios de toma de muestra: EA) Estómago anterior, EP) Estómago posterior, IA) Intestino Anterior, IP) Intestino Posterior. Tomado de diagnosis of shrimp diseases, FAO y Multimedia Asia Co. 1999.	13
3	Cortes histológicos a 5 $\mu$ de tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> de camarones sanos del grupo control (H&E). A) Epitelio estomacal, B) Epitelio intestinal, C) Hepatopáncreas, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células normales ( <b>n</b> ).	21
4	Cortes histológicos a 5 $\mu$ de tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> infectados con WSSV a tiempo 0, 1, 2, y 4 hpi (H&E). A) Epitelio estomacal, B) Epitelio intestinal, C) Hepatopáncreas, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células normales ( <b>n</b> ).	22
5	Cortes histológicos a 5 $\mu$ de tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> infectados con WSSV a 6 hpi (H&E). A) Epitelio estomacal, B) Epitelio intestinal, C) Hepatopáncreas, C) Epitelio intestinal, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células picnóticas ( <b>pi</b> ), Células normales ( <b>n</b> ), melanización ( <b>m</b> ), cariorrexis ( <b>c</b> ).	23
6	Cortes histológicos a 5 $\mu$ de tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> infectados con WSSV a 12 hpi (H&E). A) Epitelio estomacal, B) Epitelio intestinal, C) Hepatopáncreas, C) Epitelio intestinal, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células picnóticas ( <b>pi</b> ), Células normales ( <b>n</b> ), Hipertrofia nuclear tipo Cowdry ( <b>cd</b> ).	24
7	Cortes histológicos a 5 $\mu$ de tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> infectados con WSSV a 48 hpi. (H&E). ) Epitelio estomacal, B) Epitelio intestinal, C) Hepatopáncreas, C) Epitelio intestinal, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Hipertrofia nuclear tipo Cowdry ( <b>cd</b> ), cuerpos de inclusión intranuclear basofílicos( <b>ci</b> ), células picnóticas ( <b>pi</b> ), cariorrexis ( <b>c</b> ).	25
8	Detección de WSSV por PCR en pleópodos de <i>Penaeus vannamei</i> , infectados intramuscularmente. 1- 4) camarones infectados, 5) control positivo de WSSV.	26

- 9 Productos de PCR para WSSV en tracto digestivo de organismos no infectados con WSSV (Grupo Control): 1) Estómago anterior 0 hpi, 2) Estómago posterior 0 hpi, 3) Intestino anterior 0 hpi, 4) Intestino posterior 0 hpi, 5) Estómago anterior 1 hpi, 6) Estómago posterior 1 hpi, 7) Intestino anterior 1 hpi, 8) Intestino posterior 1 hpi, 9) Estómago anterior 2 hpi, 10) Estómago posterior 2 hpi, 11) Control positivo 12) Control negativo, 13) Intestino anterior 2 hpi, 14) Intestino posterior 2 hpi, 15) Estómago anterior 4 hpi, 16) Estómago posterior 4 hpi, 17) Intestino anterior 4 hpi, 18) Intestino posterior 4 hpi, 19) Estómago anterior 6 hpi, 20) Estómago posterior 6 hpi, 21) Intestino anterior 6 hpi, 22) Control positivo, 23) Control negativo 24) Intestino posterior 6 hpi, 25) Estómago anterior 12 hpi, 26) Estómago posterior 12 hpi, 27) Intestino anterior 12 hpi, 28) Intestino posterior 12 hpi, 29) Estómago anterior 48 hpi, 30) Estómago posterior 48 hpi, 31) Intestino anterior 48 hpi, 32) Intestino posterior 48 hpi, 33) Intestino anterior 48 hpi, 34) Control positivo 28
- 10 Productos de PCR en camarones infectados con WSSV en tracto digestivo: 1) Estómago anterior 0 hpi, 2) Estómago posterior 0 hpi, 3) Intestino anterior 0 hpi, 4) Intestino posterior 0 hpi, 5) Estómago anterior 1 hpi, 6) Estómago posterior 1 hpi, 7) Intestino anterior 1 hpi, 8) Intestino posterior 1 hpi, 9) Estómago anterior 2 hpi, 10) Estómago posterior 2 hpi, 11) Intestino anterior 1 hpi, 12) Intestino Posterior 1hpi, 13) Control positivo, 14) Estómago anterior 2 hpi, 15) Estómago posterior 2hpi, 16) Intestino anterior 2 hpi, 17) Intestino posterior 2hpi, 18) Estómago anterior 4 hpi, 19) Estómago posterior 4 hpi, 20) Intestino anterior 4 hpi, 21) Intestino posterior 4 hpi, 22) Estómago anterior 6 hpi, 23) Estómago posterior 6 hpi, 24) Control positivo 25) Control negativo, 26) Intestino anterior 6 hpi, 27) Intestino posterior 6 hpi, 28) Estómago anterior 12 hpi, 29) Estómago posterior 12 hpi, 30) Intestino anterior 12 hpi, 31) Intestino posterior 12 hpi, 32) Estómago anterior 48 hpi, 33) Estómago posterior 48 hpi, 34) Intestino anterior 48 hpi, 35) Intestino posterior 48 hpi, 36) Control positivo, 37) Control negativo. 29
- 11 Detección de WSSV por PCR en hemolinfa de *P. vannamei* a diferentes tiempos post-infección: 1) Marcador de peso molecular, 2) Control 0 hpi., 3) Control 1 hpi, 4) Control 2 hpi, 5) Control 4 hpi, 6) Control 6 hpi, 7) Control 12 hpi, 8) Control 48 hpi. 9) 0 hpi., 10) Control positivo, 11) Control negativo, 12-13) 0 hpi., 14-16) 1 hpi., 17-19) 2 hpi., 20-22) 4 hpi., 23) Control positivo, 24-26) 6 hpi, 27-29) 12 hpi, 30-32) 48 hpi, 33) Control positivo. 30



- 12 Detección por Hibridación *in situ* de WSSV en tejidos de 5 $\mu$  de *Penaeus vannamei* no infectados. A) Epitelio estomacal anterior, B) Epitelio estomacal posterior, C) Hepatopáncreas, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células normales (**n**). 32
- 13 Detección por Hibridación *in situ* de WSSV en tejidos de 5 $\mu$  de *Penaeus vannamei* infectados experimentalmente a 0, 1, 2, y 4 hpi, A) Epitelio estomacal anterior, B) intestino, C) Hepatopáncreas, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células normales (**n**). 33
- 14 Detección por Hibridación *in situ* de WSSV en tejidos de 5 $\mu$  de *Penaeus vannamei* infectados experimentalmente después de 6 hpi. A) Epitelio estomacal anterior, B) Epitelio estomacal posterior, C) Intestino, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células positivas a WSSV ( flechas rojas), células normales (**n**). 34
- 15 Detección por Hibridación *in situ* de WSSV en tejidos de 5 $\mu$  de *Penaeus vannamei* infectados experimentalmente después de 12 hpi. A) Epitelio estomacal anterior 100x, B) Intestino, C) Hepatopáncreas, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células positivas a WSSV (flechas gruesas), células normales (**n**). 36
- 16 Detección por Hibridación *in situ* de WSSV en tejidos de 5 $\mu$  de *Penaeus vannamei* infectados experimentalmente después de 12 hpi. A) Epitelio estomacal anterior 100x, B) B) Branquias, D) Hepatopáncreas. 400X. Células positivas a WSSV (flechas gruesas). 37
- 17 Amplificación de ADN viral en estómago de *Penaeus vannamei* a diferentes horas post-infección. 38

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Diseño de toma de muestras de <i>P. vannamei</i> infectado con WSSV.	12
2	Grados de severidad de infección y cambios histopatológicos provocados por WSSV.	15
3	Condiciones de amplificación para ADN de WSSV para el juego de iniciadores de DiagXotics ® Inc.	16
4	Escala relativa para medir el grado de infección de WSSV por hibridación <i>in situ</i> , mediante la intensidad de coloración e integridad celular.	17
5	Detección y grado de severidad provocada por WSSV por la técnica histológica (H&E), en tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> infectados experimentalmente a diferentes tiempos post-infección.	20
6	Presencia de WSSV a lo largo del tracto digestivo y en hemolinfa de <i>Penaeus vannamei</i> . ND: no detectado, D: detectado.	27
7	Detección de WSSV por Hibridación <i>in situ</i> , en tejidos de <i>Penaeus vannamei</i> infectados experimentalmente a diferentes tiempos post-infección. (-) ausencia de precipitado negro o azul en las células, (+) ligera presencia de precipitado azul. (++) incremento de precipitado, células intactas pero con hipertrofia celular, (+++) precipitado azul- negro células con desintegración en la membrana nuclear. (+++++) intenso precipitado negro con obvios cambios citopatológicos.	35

## I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

Como actividad económica, el cultivo de camarón ha logrado constituirse en los últimos años en una de las principales actividades dentro de la acuicultura en México, debido a la derrama de ingresos y empleos que ha generado, además del rápido desarrollo que ha alcanzado. Año tras año el consumo de camarones experimenta un incremento; solo en la década pasada (1995–2005) la contribución del camarón de cultivo a la oferta mundial creció en aproximadamente un 400 % (Zarain-Herzberg y Asencio-Valle, 2001, Carvajal, 2006).

La camaronicultura en México se ha duplicado en los últimos diez años; con 120 granjas de cultivo, produjo unas ocho mil toneladas en 10 mil hectáreas en el año 1990. Para el año 2000 se registró una producción de 20 mil toneladas en 220 granjas lo que demuestra un crecimiento del 100% en sólo una década (González de la Rocha, 2000). La principal producción y comercialización de camarón esta dada por camarón blanco *Penaeus vannamei*, con más del 90% del camarón de cultivo, y los estados de Sonora y Sinaloa son los estados más importantes en producción (SAGARPA, 2003; FAO 2004).

En los últimos años el interés por el control sanitario en las granjas camaronícolas se ha incrementado debido al desarrollo y a la expansión en la producción, procesos y demanda en el comercio internacional (SAGARPA 2000). A nivel mundial, el desarrollo de la industria camaronera ha estado sometida a un permanente estado de alerta sanitario y ha debido encarar un gran número de obstáculos que entraban en el proceso productivo, especialmente los relacionados con las enfermedades. Hasta hoy a nivel mundial han sido reportadas un número considerable de enfermedades de naturaleza infecciosa y no infecciosa (Lightner *et al.*, 1997; Lightner, 1998; Álvarez, 2003). Las que se encuentran dentro del primer grupo son aquellas de etiología viral y bacteriana, asociadas las primeras con el colapso casi absoluto de esta industria en el continente asiático (Álvarez, 2003; Flegel, 2006).

Las enfermedades virales y bacterianas desde la década de los 90 hasta la fecha, constituyen un factor de riesgo significativo en la producción comercial globalizada<sup>1</sup>.

Últimamente la incidencia de brotes de enfermedades virales se han hecho más severos, por los serios estragos en la industria, que limitan la producción y expansión (De la Rosa y Bonami, 2002).

---

<sup>1</sup><http://www.fao.org/Regional/LAmerica/prior/recnat/recursos/pesca/virus.htm>

Las infecciones virales frecuentemente han provocado elevadas mortalidades y prácticamente grandes pérdidas económicas (Browdy *et al.*, 1998).

Los virus son parásitos obligados intracelulares que provocan un amplio espectro de enfermedades que van desde la infección sin signos patognomónicos hasta la muerte. Definitivamente son los patógenos más peligrosos para la acuicultura moderna y en particular para la camaronicultura (Figueras-Gil, 2000).

El primer virus detectado en camarones peneidos fue el virus del síndrome de la nucleosis poliédrica de *Penaeus vannamei* (Pv SNPV) antes conocido como *Baculovirus penaei* (BP). Desde entonces, se han detectado alrededor de 15 virus, los cuales han sido reportados como agentes infecciosos en diferentes poblaciones de camarón alrededor del mundo (Lighthner, 1998; Lighthner *et al.*, 1998). Después que se descubrió a *Baculovirus penaei* la lista de virus que infectan a los camarones ha crecido considerablemente (Lightner y Redman, 1998).

Existen cuatro virus que se encuentran dentro de los más importantes en virtud a su frecuencia de aparición, su amplia distribución y su capacidad de provocar severas epizootias, las cuales provocan altas mortalidades y fuertes pérdidas económicas en los cultivos. Estos son: el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopóyética (IHHNV), el virus del síndrome de Taura (TSV), el virus del síndrome de la cabeza amarilla (YHV) y el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) (Bonami, 1997).

El síndrome de la mancha blanca es una de las enfermedades virales más serias e importantes en el cultivo de camarón en el mundo (Lightner, 1996; Flegel, 1997). Desde los primeros daños ocasionados por el virus en Asia, este ha sido blanco de intensivas investigaciones y sin duda alguna, una de las principales cuestiones a investigar ha sido la transmisión del virus y su velocidad de dispersión dentro de los camarones. Esto ha llevado a tratar de establecer claramente su dinámica infectiva dentro y fuera de las especies, mediante mecanismos que se asemejen al medio natural en que se presentan las infecciones, especialmente en etapas tempranas.

Sin duda uno de los puntos de control más difíciles en el cultivo de camarón ha sido el manejo de las enfermedades virales. Las pérdidas más graves provocadas por los virus ocurrieron entre 1993 y 1999, cuando una epizootia mundial provocada por el virus del

síndrome de la mancha blanca (WSSV) causó la bancarrota de muchas granjas camaronícolas en todo el mundo; esta explosiva epizootia marcó un período crítico sin precedentes (González de la Rocha, 2000).

En Febrero de 1999, el virus fue encontrado en camarones silvestres y cultivados de Honduras y Nicaragua (Galavíz-Silva, 1999; Galavíz-Silva *et al.*, 2004) donde pasó a Panamá (país eminentemente exportador de larvas de camarón para cultivos) y de ahí se difundió rápidamente por la región, donde impactó principalmente a Ecuador, Perú, Colombia, todos los países centroamericanos y México. Los efectos de la mancha blanca se han hecho sentir en esta parte del mundo, principalmente en la zona del Pacífico latinoamericano (FAO, 2002).

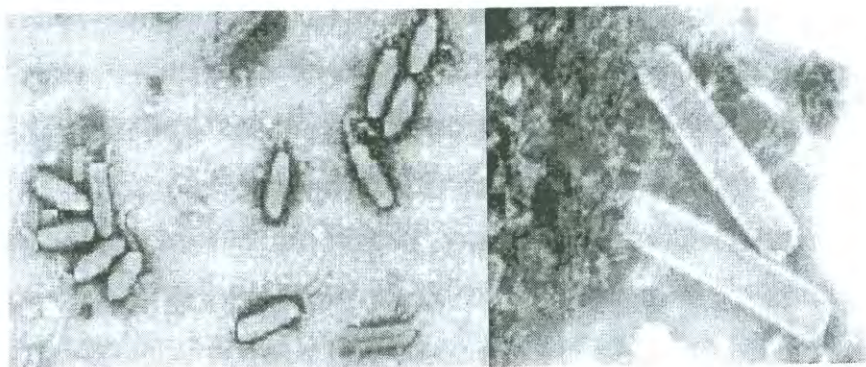
Durante 1999, las mortalidades causadas por WSSV en México fue relativamente baja (entre 2% y 10%), y los signos clínicos fueron no específicos. Desafortunadamente, el impacto económico durante el siguiente año fue mucho más alto, debido a que afectó alrededor de 6,500 hectáreas de producción (Galavíz-Silva *et al.*, 2004). El estado afectado fue Sinaloa, obteniendo cosechas tempranas y por ende tallas pequeñas de *Penaeus vannamei* y *Penaeus stylirostris* (Montoya-Rodríguez y López-Félix 2002; FAO, 2002).

En cuanto a pérdidas económicas, debido a la disminución de exportaciones por las tallas chicas provenientes de las cosechas afectadas por WSSV, que no tuvieron un mercado atractivo de exportación en el 2002; se obtuvieron US \$ 34.5 millones contra los US \$ 44.8 del año anterior (FAO, 2002).

Los estudios de microscopía electrónica revelan que el WSSV es un virus grande con una doble cadena de DNA (dsDNA), con un tamaño estimado de 305 kpb. Los viriones son partículas que contienen una envoltura trilaminar y una nucleocapside de forma ovoidal a baciliforme, con medidas que van de los 275 a 380 nm de longitud hasta los 70 a 120 nm de ancho (Fig. 1). Una de las características principales del virus es un accesorio, tipo flagelo al final o extremo del virion (Van Hulten *et al.*, 2001; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Durand *et al.*, 1997).

El análisis genético indica que WSSV es un representante de un nuevo género de virus provisionalmente llamado *Whispovirus*, agrupado dentro de una nueva familia llamada Nimaviridae. Otros nombres se han usado en la literatura para WSSV, son SEMBV

(baculovirus sistémico ectoderal y mesodermal) y WSBV, síndrome de la mancha blanca asociado a baculovirus (Wang *et al.*, 1995; Just *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Microscopía electrónica del virus de la mancha blanca (WSSV). Tomado de diagnosis of shrimp diseases, FAO y Multimedia Asia Co. 1999.

Whispovirus tiene una amplia gama de hospederos, infecta crustáceos acuáticos desde camarones y cangrejos de agua salada hasta crustáceos de agua dulce; sin embargo, se ha observado que en algunas especies la enfermedad no es letal (Cai *et al.*, 1995; Lightner, 1996; Van Hulten *et al.*, 2000; Sahul Hameed *et al.*, 2000, 2001; Just *et al.*, 2002).

Estudios sobre la replicación del virus y morfogénesis de los viriones muestran que la replicación de ADN y su nueva formación, ocurren en el núcleo de la célula, donde los viriones son reunidos y liberados para la infección por ruptura celular. Una vez liberados los viriones infectan a sus hospederos que posteriormente presentan signos gruesos de letargia, disminución del apetito, coloración rojiza debido a la expansión de los cromatóforos, movimiento lento y en algunas especies se han observado manchas blancas en el exoesqueleto (Durand *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000; Just *et al.*, 2002; Yoganandhan *et al.*, 2003a). El virus puede provocar el 100% de mortalidad acumulativa en un corto tiempo (2 a 10 días) en las granjas de camarón (Durand *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001).

Tan *et al.* (2001), determinaron la curva de replicación viral en *P. monodon* mediante un análisis de PCR competitivo, por medio de infección de camarones con WSSV. Se identificaron tres fases; la llamada eclipse (ligera) que va de las 0 a las 24 horas pos-

infección (hpi); la fase logarítmica (moderada) de las 24 a las 48 hpi y la fase estable (fuerte) de las 48 a las 120 hpi en la cual los organismos ya presentan signos clínicos de la enfermedad y están moribundos.

Histológicamente los organismos infectados muestran alteraciones celulares como células degeneradas con núcleos basófilos hipertrofiados e inclusiones intracelulares en distintas fases de desarrollo, así como cromatina marginada. Los principales blancos de infección del WSSV son tejidos de origen ectodermal y mesodermal, tales como branquias, órgano linfoide y epitelio cuticular (Chang *et al.*, 1996; Karunasagar *et al.*, 1997; Vijayan *et al.*, 2003),

Infecciones controladas mediante inyección viral, inmersión de camarones en agua con virus e ingestión de papilla infectada, se han realizado en laboratorio tratando de considerar la mayoría de los posibles vectores de transmisión de WSSV. Se ha demostrado que las infecciones por inyección tienen la ventaja de ser más rápidas pues el virus se dispersa rápidamente en el organismo; sin embargo, esto no ocurre en la naturaleza y se viola la primera barrera natural de defensa del camarón y los mecanismos de defensa a ella asociados al entrar la aguja y traspasar la cutícula del exoesqueleto. Por otro lado las infecciones por ingestión representan una vía natural de infección que provee una forma más exacta para evaluar los daños de WSSV (Takahashi *et al.*, 1994). Por otro lado las infecciones por inmersión con WSSV realizadas en *P. vannamei*, han demostrado que el agua constituye un vehículo de transmisión que indica el potencial peligro de altas cargas virales en los estanques de cultivo (Chou *et al.*, 1995, Wu *et al.*, 2001).

Cada una de estas formas de infecciones han ayudado a establecer cuales son los principales órganos blanco del virus, así como los tiempos en que se pueden observar los signos de la infección. Dentro de los trabajos que han abordado algunos de estos aspectos podemos encontrar al de Chang *et al.*, (1996), quienes identificaron por medio de hibridación *in situ* algunos tejidos y órganos blanco de WSSV en *Penaeus monodon* así como el grado de infección, y etapas de progresión del virus mediante una infección oral. Sus resultados sugieren, que el epitelio cuticular de cada parte del cuerpo del camarón, es el principal tejido blanco de WSSV así como el tejido conectivo de algunos órganos. En términos de órganos, observaron severos daños en estomago, branquias, órgano linfoide, glándula antenal y

corazón. El estómago, branquias, corazón y epidermis cuticular son los órganos donde inicialmente aparece el virus después de 16 hpi. Los órganos menos infectados son el hepatopáncreas, el nodo nervioso, el tejido conectivo del intestino anterior y posterior. Una de las conclusiones es que el virus pueda infectar principalmente tejidos que se originan del ectodermo y del mesodermo.

Nadala *et al.* (1997) realizan un experimental en el cual infectaron intramuscularmente camarones de *P. vannamei* con WSSV a diferentes intervalos de tiempo. Por medio del análisis de Western blot detectaron la presencia del virus y sus resultados revelaron la detección en hemolinfa y branquias de camarones infectados a las 41 y 43 hpi.

Lo *et al.* (1997) y Lo *et al.* (1998) estudiaron la distribución y prevaencia del virus en camarones infectados de *Penaeus monodon*. Por medio de hibridización *in situ*, observan que cierto tipo de células de algunos órganos, soportan más frecuentemente la replicación del WSSV, y se sugirió que los pleópodos, las branquias, la hemolinfa, el estómago y el músculo abdominal son los cinco órganos prevalentemente más infectados. En ambos estudios; se concluyó, que estos son los órganos, en que el virus aparece mas frecuentemente y se replica.

En este mismo año Kou *et al.* (1998) publicó un trabajo muy similar al de Loe *et al.* (1997) sobre la distribución del virus (WSSV) en los tejidos de camarones adultos de *Penaeus monodon*. En dicho trabajo, observaron que en organismos ligeramente infectados el virus fue particularmente prevalente en branquias, seguido por hemolinfa, músculo abdominal, estómago, pleópodos, integumento, pereiópodos, pedúnculo ocular y hepatopáncreas. Esta lista es significativamente diferente al trabajo anterior, sin embargo los pleópodos, las branquias, la hemolinfa, el estómago y el músculo abdominal, son los cinco órganos que más son infectados. Con este estudio Kou *et al.* (1998) recomiendan utilizar branquias, pleópodos y hemolinfa para diagnósticos en portadores sin signos clínicos de la enfermedad.

Por otro lado Chou *et al.* (1998) determinaron la transmisión del WSSV en camarones *P. indicus* y *P. japonicus* mediante inmersión e ingestión oral y en diferentes tiempos post-infección (3, 5, 12, 24, 48 hpi). Mediante PCR ellos observaron la presencia de WSSV a las 6 hpi en organismos de *P. monodon* infectados vía inmersión y en los organismos infectados oralmente se presentó el virus hasta las 24 hpi tanto en *P. monodon*, como en *P. japonicus*.



Yoganandhan *et al.*, (2003a) por medio de una infección intramuscular en *P. indicus*, observaron histológicamente la presencia de cuerpos de inclusiones intranucleares en el tejido de las branquias, pedúnculo ocular, apéndices y tejido conectivo después de las 36 hpi, y en el corazón y estómago a 48 hpi. Por análisis de PCR detectaron a WSSV en hemolinfa a las 6 hpi y en los otros órganos a las 12 hpi. Histológicamente el hepatopáncreas no presentó cuerpos de inclusión a ningún tiempo post-infección, aunque por PCR se detectó a las 12 hpi.

Escobedo-Bonilla (2006), realizó una estandarización en los procedimientos de inoculación vía oral e intramuscular para WSSV; utilizando técnicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), determinó los sitios de replicación primaria de WSSV y su dispersión a los órganos blanco. Sus resultados indicaron que las células epiteliales del estómago anterior del tracto digestivo y branquias, son los sitios de replicación primaria, siendo evidente a las 12 hpi; una vez que el virus se replica en los sitios primarios, cruza la lámina basal y alcanza capa de tejido conectivo y/o sitios asociados a senos hemales, donde el virus es transportado a otros órganos blanco por circulación de la hemolinfa.

Sin duda, estos trabajos han hecho importantes contribuciones para establecer la dinámica de la infección viral; sin embargo, existen algunas diferencias en sus observaciones, que se pueden atribuir a las formas de infección y métodos de diagnóstico utilizados. Por esto en el presente trabajo se hace uso de varias herramientas que permitan visualizar el seguimiento de la infección de WSSV durante las primeras horas post-infección, a través de una inoculación oral, la cual representa la forma más natural y probable de que el virus entre a los camarones en los estanques de cultivo.

Un punto importante para la detección oportuna y manejo de las enfermedades virales, es el diagnóstico temprano, puesto que permite implementar medidas de control y desarrollar estrategias de manejo para prevenir su dispersión. Varios métodos de diagnóstico se han desarrollado en diferentes laboratorios alrededor del mundo para detectar el virus de la mancha blanca. Dentro de estas técnicas se pueden en listar las siguientes: Observación de signos externos, técnicas inmunológicas, histopatología, microscopía electrónica, técnicas de hibridación de ADN y ARN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La técnica tradicional ha sido la histología y/o histopatología; en años recientes la tendencia se ha dirigido hacia métodos indirectos basados en el ADN como molécula blanco.

El diseño y construcción de herramientas moleculares han sido sin duda una alternativa más específica, sensible, oportuna y eficaz para la detección y diagnóstico de agentes virales. De acuerdo a su sensibilidad cada una de estas técnicas ofrece distinta información, por lo que la elección depende del propósito del diagnóstico (Bonami, 1997).

La reacción en cadena de la polimerasa, permite la amplificación de una región específica de ADN *in vitro*. Este proceso es altamente sensitivo y requiere solo de pequeñas cantidades de ADN blanco para su amplificación. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Esta técnica ha formado parte esencial del diagnóstico de enfermedades asociadas a una gran lista de patógenos de naturaleza micótica, viral y bacteriana<sup>2</sup>.

A principios de la década pasada, se empezaron a construir sondas moleculares capaces de detectar bajos niveles de infección (Bonami, 1997). Estas sondas han sido desarrolladas a partir de la clonación de fragmentos del genoma viral, presente en camarones infectados que posteriormente han sido marcadas no radiactivamente, para utilizarse en el diagnóstico de enfermedades de una manera rápida y eficiente en pruebas de hibridación *in situ* o *dot blot* (Mari *et al.*, 1993; Bonami, 1997; Durand *et al.*, 1996; Lightner *et al.*, 1998a; Méndez-Payan, 2003; Vega-Pérez, 2003).

La técnica de Hibridación *in situ* es muy eficaz en la búsqueda de virus primordialmente en la detección de bajo número de copias de ADN (Heino y Hukkanen, 1992). Esta técnica es especialmente útil para la localizar ADN viral en el interior de las células, emplea como herramienta molecular sondas específicas las cuales se aplican directamente sobre cortes histológicos y consiste en la hibridación de fragmentos marcados de ADN de una hebra o de ARN con secuencias complementarias (sondas) a ADN/ARN celular, que en condiciones apropiadas forman híbridos estables (De la Rosa-Vélez y Bonami, 2002, 2006).

---

<sup>2</sup>[http://escuela.med.puc.cl/publ/PatologiaGeneral/Patol\\_126.html](http://escuela.med.puc.cl/publ/PatologiaGeneral/Patol_126.html)

La Hibridación *in situ* ha sido empleada con éxito para el diagnóstico de diversos virus: Por ejemplo para el *Baculovirus penaei* (Bruce et al., 1993, 1994) para IHHNV (Mari et al., 1993) para PmSNPV (Poulos et al., 1994) para HPV (Mari et al., 1995) para YHV (Tang y Lightner, 1999) y para WSSV (Chang et al., 1998).

Sin duda alguna el virus de la mancha blanca ha traído intensas investigaciones de carácter científico y tecnológico, dando como resultado importantes avances para su control y prevención. Sin embargo, aspectos como el seguimiento de la infección en etapas tempranas así como los primeros sitios de replicación viral y su dispersión en el organismo son aspectos que no se han establecido con claridad, por lo que el presente trabajo plantea la siguiente hipótesis: Cuando *Penaeus vannamei* es infectado oralmente por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) las primeras células que se infectan son las del epitelio estomacal y posteriormente el virus se dispersa por hemolinfa a otros órganos como, las branquias, hasta posteriormente invadir todos los órganos blanco.

## II.- OBJETIVOS.

### II.1. Objetivo General

Determinar la ruta de infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en *Penaeus vannamei*, en etapas tempranas de infección, mediante una infección forzada vía oral.

### II.2. Objetivo Específicos

- Detectar la presencia de WSSV por PCR en el tracto digestivo de *Penaeus vannamei*.
- Dar Seguimiento de la infección de WSSV por medio de cortes histológicos con la técnica H-E en algunos órganos blanco.
- Determinar por medio de Hibridación *in situ* las primeras células infectadas por WSSV.

### **III.- MATERIAL Y METODOS.**

#### **III.1.- Diseño experimental**

Para la realización de este estudio se obtuvieron 50 camarones de la Unidad Experimental Kino del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. La talla aproximada de los organismos era de 16 g y libres de patógenos. Los organismos se transportaron al laboratorio de Ciencias del Mar del mismo departamento en Hermosillo, Sonora en donde se realizó el bioensayo. De igual manera se transportó agua de mar y una vez en el laboratorio se filtró a 4 $\mu$ m y esterilizó mediante UV.

En el laboratorio, los camarones se colocaron en acuarios de plástico con capacidad de 55 litros, con agua de mar de salinidad 35 ppm, temperatura de 28° C y aireación constante. Tuvieron recambio de agua cada 3 días del 50% y se alimentaron dos veces al día con un alimento balanceado, cuya cantidad proporcionada fue del 5% de la biomasa. Bajo estas condiciones los organismos se mantuvieron por seis días previos a la infección experimental, para aclimatarlos y eliminar el estrés.

#### **III.2.- Obtención del inóculo viral.**

Para la preparación del inóculo se utilizó un camarón congelado infectado con WSSV, confirmado positivo con análisis de PCR. Se le disectó un fragmento de 5 g. aproximadamente de la región abdominal y se maceró con 10 ml de solución salina al 5 %. El extracto fue centrifugado a 2,500 rpm por 10 min a 4° C, y el sobrenadante se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Una vez extraído el sobrenadante, se pasó por un filtro de 0.45  $\mu$  y con una jeringa de 1ml se inyectaron 100  $\mu$ l a cinco camarones en el segundo segmento abdominal. Después de 36 horas post infección cuando los organismos presentaron los signos de la infección, se les extrajo hemolinfa con una jeringa de 1 ml con anticoagulante (Anexo A). A estos organismos también se les cortaron los pleópodos, los cuales se conservaron en alcohol al 95° para posteriormente confirmar por PCR la presencia del virus WSSV. Los organismos una vez ya muertos se etiquetaron y se congelaron a -70° C.

### III.3.- Infección de organismos.

La infección se realizó mediante alimentación forzada, se utilizó el inóculo que previamente se elaboró. El fragmento de músculo se maceró con solución salina al 5%, y se centrifugó por 10 min a 2500 rpm. Una vez centrifugado se tomó el sobrenadante y se pasó por un filtro de 0.45  $\mu$ . De la misma manera se elaboró un inóculo de un camarón negativo a WSSV.

Se utilizaron 26 camarones divididos en dos grupos: 19 camarones en el grupo tratamiento y siete en el grupo control. Los organismos del experimento fueron infectados con 100  $\mu$ l de inóculo con WSSV, vía alimentación forzada con una cánula de venóclisis, los organismos control se inocularon de la misma manera pero con el extracto de camarón sano.

### III.4.- Toma de muestras.

El muestreo fue al azar tomando tres camarones infectados y un organismo control por tiempo; las muestras se tomaron al tiempo 0, 1, 2, 4, 6, 12 y 48 hpi. En la última toma de muestra a las 48 horas, se tomó solo un camarón infectado y uno control. A cada organismo se le tomaron muestras de hemolinfa, región cefálica y abdominal (Tabla 1).

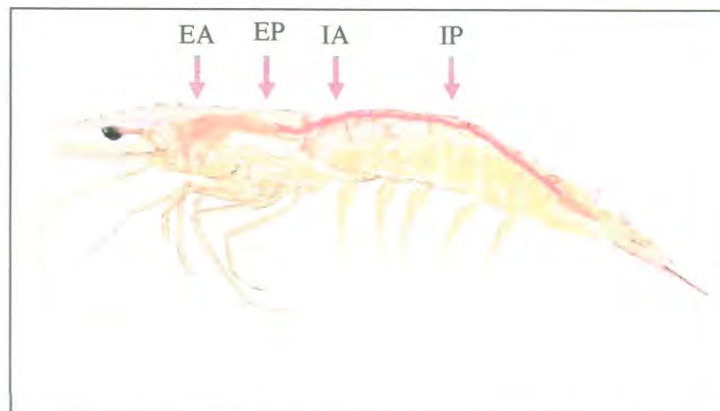
**Tabla 1.** Diseño y toma de muestras de *P. vannamei* infectado con WSSV.

Tiempo	Organismos infectados	Organismos Control	MUESTRA
0	3	1	
1 hpi	3	1	Hemolinfa
2 hpi	3	1	Región cefálica
4 hpi	3	1	y
6 hpi	3	1	Región Abdominal
12 hpi	3	1	
48 hpi	1	1	

### III.5.- Tratamiento de muestras.

Los organismos fueron seccionados dorsoventralemte a la altura del cefalotórax, para separar la región cefálica de la abdominal. Con una jeringa se inyectó solución Davison (Anexo A) en el hepatopáncreas y el músculo abdominal para garantizar una buena fijación. Posteriormente se colocaron ambas partes en solución Davison para evitar su autólisis. En este fijador permanecieron 48 horas y posteriormente se lavaron con agua, para eliminar el exceso de fijador y finalmente se colocaron en alcohol a 70° para realizar el análisis histológico e hibridación *in situ*.

Una vez que las muestras de las regiones cefálicas y abdominales estuvieron bien fijadas en alcohol al 70°, se tomaron muestras de estómago anterior y posterior, así como de intestino anterior y posterior, las cuales fueron procesadas para el aislamiento y amplificación de ADN (Fig. 2). De igual manera, muestras de la región cefálica y abdominal fueron cortadas en secciones de 1cm aproximadamente, para ser procesadas para análisis histológico.



**Figura 2. Sistema Digestivo.** Sitios de toma de muestra: EA) Estómago anterior, EP) Estómago posterior, IA) Intestino Anterior, IP) Intestino Posterior. Tomado de diagnosis of shrimp diseases, FAO y Multimedia Asia Co. 1999.

### III.6.-Obtención de hemolinfa.

La hemolinfa fue extraída con una jeringa de 1ml de la región ventral entre el último par de pereiópodos y el primer par de pleópodos. Por cada volumen de hemolinfa se colocaron dos volúmenes de anticoagulante. Posteriormente se procesaron para la extracción y amplificación de ADN.

### **III.7. Análisis Histológico.**

Esta técnica se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Lightner (1996) (Anexo B), en el cual los tejidos son deshidratados e incluidos en parafina para realizar cortes al micrótopo de tejido de 3 a 5 $\mu$  de grosor, los cuales se colocan en portaobjetos para ser teñidos con la técnica Hematoxilina de Harris y Eosina (H&E) y observados en un microscopio compuesto, adaptado con una cámara digital para la obtención de imágenes (Anexo C).

#### **III.7.1. Observación de laminillas.**

Se observaron al microscopio compuesto los cortes teñidos (H&E) de todos los tiempos post-infección, así como los grupos control para detectar las lesiones provocados por el WSSV. Las muestras fueron consideradas positivas cuando se observaron cuerpos de Cowdry o cuerpos de inclusión en los tejidos examinados (Tabla 2). Posterior a esto se eligieron los cortes infectados (todos los tiempos pos-infección) y del grupo control para ser analizados por medio de la técnica de Hibridación *in situ*.

### **III.8. Extracción de ADN.**

La extracción de ADN geonómico se realizó mediante el juego de reactivos de Gene Clean (BioQ Inc., 101) (Anexo D).

### **III.9. Reacción para PCR.**

Para realizar la mezcla de reacción, se utilizaron perlas Ready-to-go (Amersham Biosciences®), compuestas por estabilizadores, BSA, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, y 2.5 unidades de PuReTaq ADN polimerasa y buffer. Se adicionaron 21 $\mu$ l de agua estéril a cada perla ready-to-go y 2  $\mu$ l de los iniciadores específicos; posteriormente se tomaron 11.5  $\mu$ l del reactivo premezcla y se agregó finalmente a cada una de ellas 1 $\mu$ l de ADN, para un volumen final de 12.5  $\mu$ l de reacción.



**Tabla 2.** Grados de severidad de infección y cambios histopatológicos provocados por WSSV (Lightner, 1996).

Grado de Severidad de la infección	Cambios celulares
0	<b>No infectado.</b> No se observa cambio histopatológico característico del WSSV. Células con apariencia normal.
1	<b>Infección muy Ligera.</b> Inicio de la infección viral. Gran cantidad de células normales, sin embargo comienzan a aparecer los primeros cambios histopatológicos como hipertrofia nuclear, fragmentación nuclear con cromatina condensada o degeneración celular esparcida (cariorrexis) y retracción nuclear con cromatina condensada (picnosis)
2	<b>Infección Moderada.</b> Etapa observable de la infección viral. Células con cariorrexis y picnosis moderada; células con inclusiones intranucleares eosinofílicas con cromatina marginada rodeadas de citoplasma transparente (células tipo Cowdry A).
3	<b>Infección Alta.</b> Etapa media de infección viral. Células son disolución de núcleo (cariolisis), células tipo Cowdry tipo A en un proceso de agrandamiento de las inclusiones intranucleares eosinofílicas con cromatina marginada hasta que finalmente el núcleo ocupa completamente el citoplasma. Las inclusiones nucleares se desarrollan dentro de cuerpos basofílicos tenues, las cuales no son muy evidentes en esta etapa. Puede existir degeneración y desintegración en los tejidos.
4	<b>Infección Severa.</b> Etapa avanzada de la infección viral. Invasión generalizada de los tejidos infectados, grandes cuerpos de inclusión basofílicos prominentes y en menor grado cariolisis y necrosis celular. Degeneración masiva y desintegración de los tejidos.

### III.10. Amplificación de ADN.

El ADN aislado se amplificó con un par iniciadores específicos para WSSV del Kit DiagXotics ® Inc., los cuales amplifican una región conservada del virus de 401 pb que se ubica dentro de la secuencia blanco descrita por Lo *et al.* (1997); este kit, también cuenta con un par de iniciadores que amplifican un segmento de 603 pb de una región del ADN del camarón, los cuales funcionan como control interno. La amplificación se realizó en el termociclador Techne Inc. modelo TC-312 y el protocolo que se siguió se describe en la tabla 3.

**Tabla 3.** Condiciones de amplificación para ADN de WSSV para el juego de iniciadores de DiagXotics ® Inc.

CONDICIONES DE REACCIÓN	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización	95° C	2 minutos
35 ciclos de:		
Desnaturalización	94° C	30 segundos
Alineación	60° C	30 segundos
Extensión	72° C	60 segundos
Extensión final	72° C	7 minutos

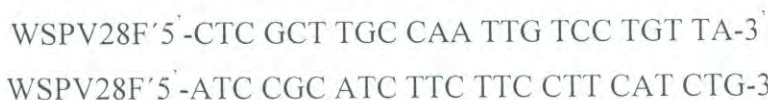
### III.11. Electroforesis de ADN.

El análisis de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 2% prefabricados (E-Gel, Invitrogen) con bromuro de etidio incluido. El tiempo de electroforesis fue de 15 minutos a 60-70 V y 30-40 ampers. Los geles fueron observados y fotografiados con un sistema de fotodocumentación (Kodak 1D Image Analysis Software).

### III.12. Hibridación *in situ*.

Los cortes de tejido fueron montados y procesados en portaobjetos para hibridación (Superfrost\* Plus Micro Slides). Para detectar la presencia de WSSV se elaboró una sonda específica con un par de iniciadores que amplifican el gen VP28, el cual codifica para una de

las proteínas de la cápside de WSSV; el producto esperado de amplificación es de 461 pb. Los iniciadores utilizados presentan las siguientes secuencias:



Los productos de PCR fueron, marcados con un kit comercial DIG-HIGH PRIMER (Boehringer Mannheim) (Anexo E) y finalmente la sonda fue cuantificada con el juego de reactivos comerciales DIG-Quantification Testips y DIG Control Teststrips (Anexo F).

El análisis de Hibridación *in situ* se realizó de acuerdo a Bell y Lightner (1988) y Lightner (1996) (Anexo G). Finalmente las laminillas fueron observadas al microscopio compuesto y se consideraron positivas a infección de WSSV aquellas que presentaran depósitos celulares de precipitado azul oscuro a negro característicos de la detección por la sonda. El grado de infección en los tejidos fue medido por el número de células con precipitado azul y la intensidad de la coloración según la escala de Chang *et al.* (1996) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Escala relativa para medir el grado de infección de WSSV por Hibridación *in situ*, mediante la intensidad de coloración e integridad celular.

Grado de infección	Descripción
-	Tejido intacto el cual no presenta células con núcleos pigmentados.
+	Tejido integro, con núcleos ligeramente azules o negros. Corresponde a etapas tempranas de infección.
++	Tejido integro, con núcleos hipertrofiados teñidos de negro.
+++	Tejido en el cual la membrana nuclear se ha desintegrado y la coloración azul intenso o negra se ha extendido hasta el citoplasma.
++++	Los tejidos son teñidos de color azul oscuro y negro y se muestran obvios cambios citopatológicos.

### **III.13. Amplificación de ADN por PCR tiempo real.**

Se utilizaron perlas Ready-to-go (Amersham Biosciences®); se adicionaron 21 $\mu$ l de agua estéril y 2 $\mu$ l de los iniciadores específicos; posteriormente se tomaron 10.5 $\mu$ l del reactivo premezcla en 2 tubos de 0.2 ml y se agregó 1 $\mu$ l de ADN a cada tubo; finalmente se adicionaron 1 $\mu$ l de SYBER® Green, llevando a un volumen final de 12.5 $\mu$ l de reacción. La amplificación se realizó en el termociclador Roto-Gene 3000, con el protocolo descrito anteriormente en la en la tabla 3.

## **IV. RESULTADOS.**

### **IV.1. Infección experimental.**

La infección forzada de los organismos vía oral tuvo una duración de 48 horas. Los organismos infectados y colectados del tiempo 0 a las 12 hpi, no mostraron ningún signo de la infección como letargia, disminución del apetito, coloración rojiza debido a la expansión de los cromatóforos, movimiento lento ni nado errático; sin embargo, a las 48 hpi los organismos comenzaron a presentar signos de letargia y nado errático. Ningún grupo tanto de camarones control, como infectados presentó mortalidades durante el curso de la infección.

### **IV.2. Análisis histológico y seguimiento de la infección viral.**

Los resultados de las observaciones histopatológicas y los daños que presentaron en cada uno de los tejidos, con la escala relativa del grado de severidad de acuerdo con Lightner (1996), fueron los siguientes: solo a las 48 hpi se notaron lesiones caracterizadas por daño 2 y 4, esto último en estómago y en hepatopáncreas no se observó ningún daño celular. A las 6 y 12 horas los tejidos solo presentaron grados de infección 1 y 2 (Tabla 5).

Los tejidos de *Penaeus vannamei* no infectados con WSSV (grupo control), presentaron células normales con citoplasma esparcido, núcleo claramente visible y gránulos de cromatina, por lo que no presentaron ningún daño en células (Fig. 3).

Los organismos infectados a las 0, 1, 2, y 4 hpi no presentan ningún daño histológico como cuerpos de Cowdry, característicos de una infección temprana de WSSV, ni células picnóticas, con cariólisis o cariorrexis. (Fig.4).

Los tejidos analizados a las 6 hpi, presentaron una gran cantidad de células normales; sin embargo comienzan ser visibles los primeros cambios histopatológicos en epitelio estomacal anterior, posterior y branquias; como son, células con cromatina condensada (picnóticas) y cariorrexis; fue posible observar signos de melanización en algunos túbulos del hepatopáncreas. Por otra parte los otros órganos blancos analizados no presentaron cambios celulares (Fig. 5).

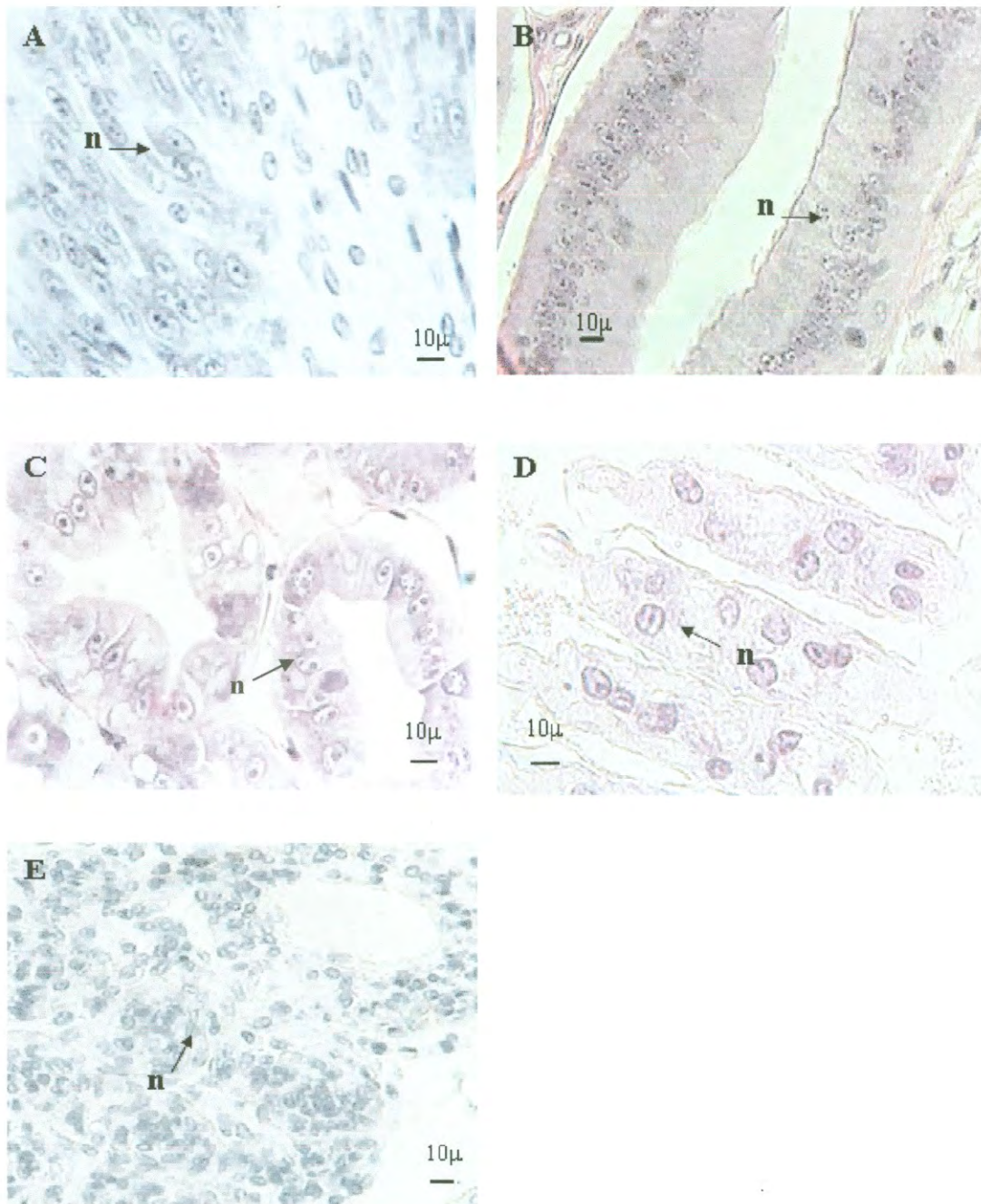
A las 12 hpi el epitelio estomacal posterior presentó daño celular con posibles células tipo Cowdry, además de células picnóticas, y núcleos hipertrofiados (Fig. 6). En las branquias, se observó un incremento en la presencia de células picnóticas e hipertrofiadas, pero no se lograron observar células tipo Cowdry.

En intestino, órgano linfoide, tejido hematopoyético y hepatopáncreas, no se observa aparentemente ningún daño celular (Fig. 6).

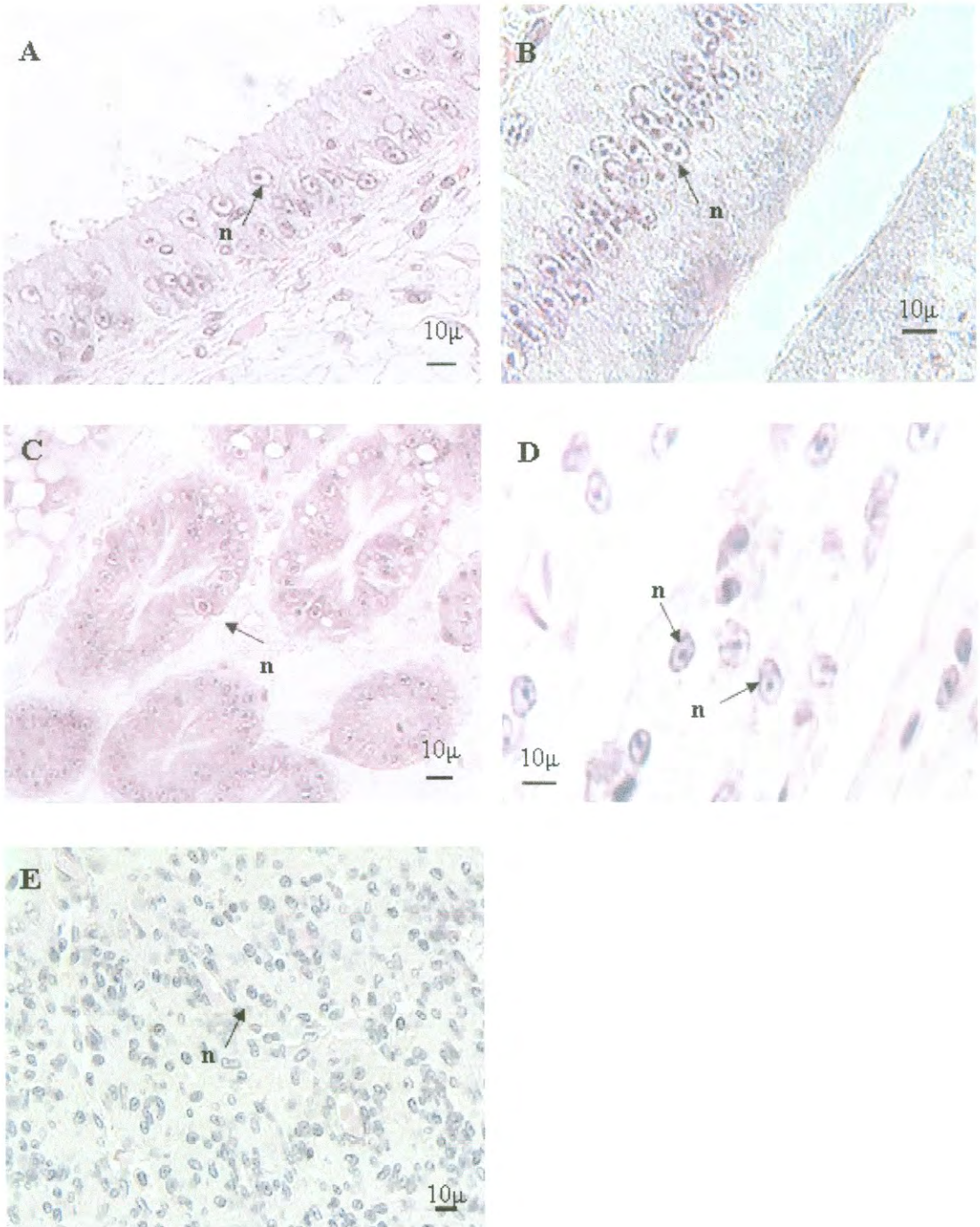
Después de 48 horas pos-infección, el epitelio estomacal anterior y posterior presentó un fuerte daño celular característico de una infección viral avanzada, con núcleos hipertrofiados con cuerpos de inclusión basofílicos y células tipo Cowdry. De la misma forma se observaron estas características en las branquias (Fig. 7). El epitelio intestinal presentó cuerpos de inclusión, células tipo Cowdry y algunas células con cariorrexis y en el órgano linfoide fueron visibles los daños provocados por el virus mostrando daños característicos de la infección.

**Tabla 5.-** Detección y grado de severidad provocada por WSSV por la técnica histológica (H&E), en tejidos de *Penaeus vannamei* infectados experimentalmente a diferentes tiempos post-infección.

Tejido	Control	0 hrs	1 hrs	2 hrs	4 hrs	6 hrs	12 hrs	48 hrs
Estómago	0	0	0	0	0	1	2	4
Intestino	0	0	0	0	0	0	0	3
Branquias	0	0	0	0	0	0	1	3
Órgano Linfoide	0	0	0	0	0	0	0	3
Hepatopáncreas	0	0	0	0	0	0	0	0

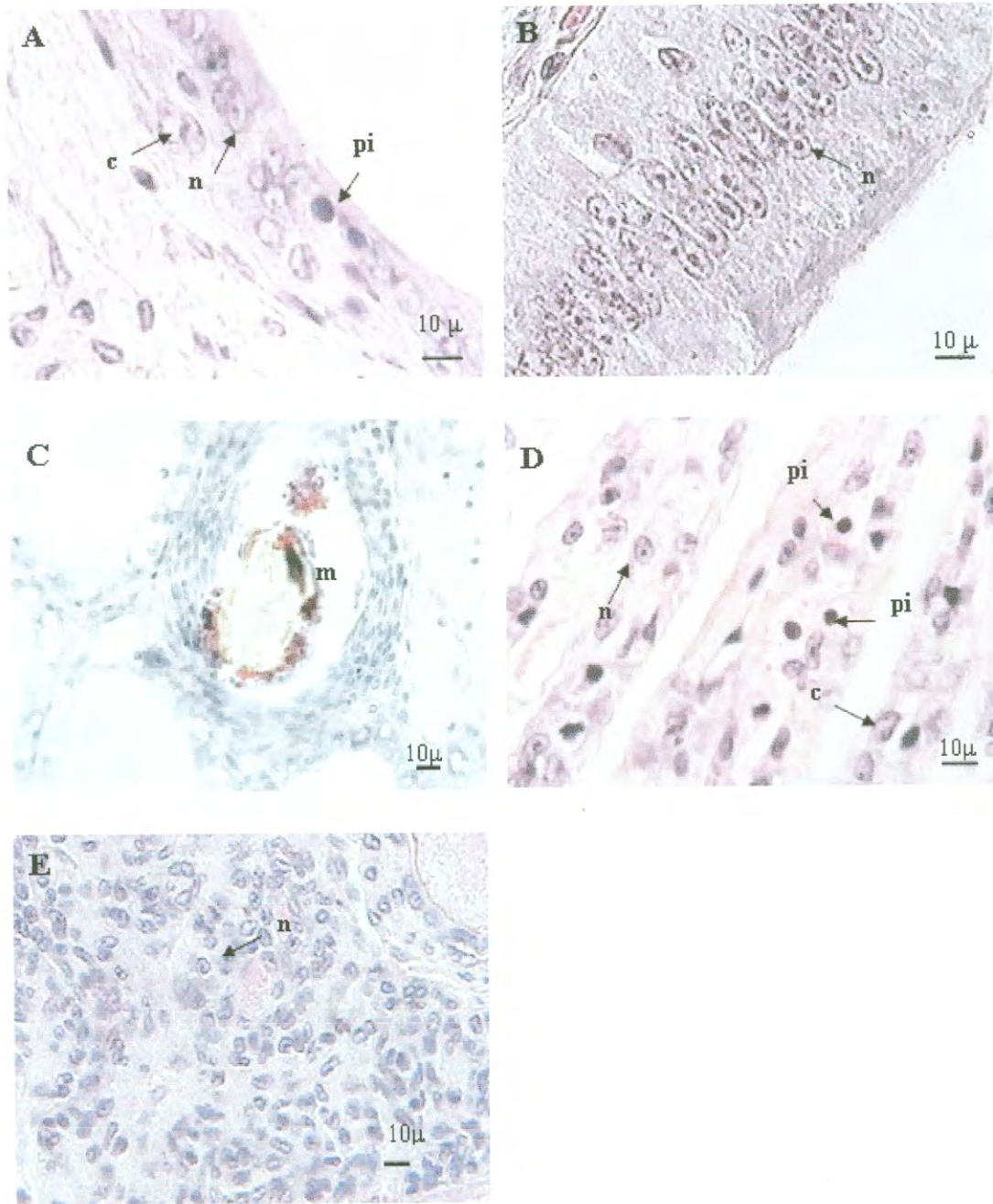


**Fig. 3.** Cortes histológicos a 5  $\mu$  de tejidos de *Penaeus vannamei* de camarones sanos del grupo control (H&E). A) Epitelio estomacal, B) Epitelio intestinal, C) Hepatopáncreas, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células normales (n).

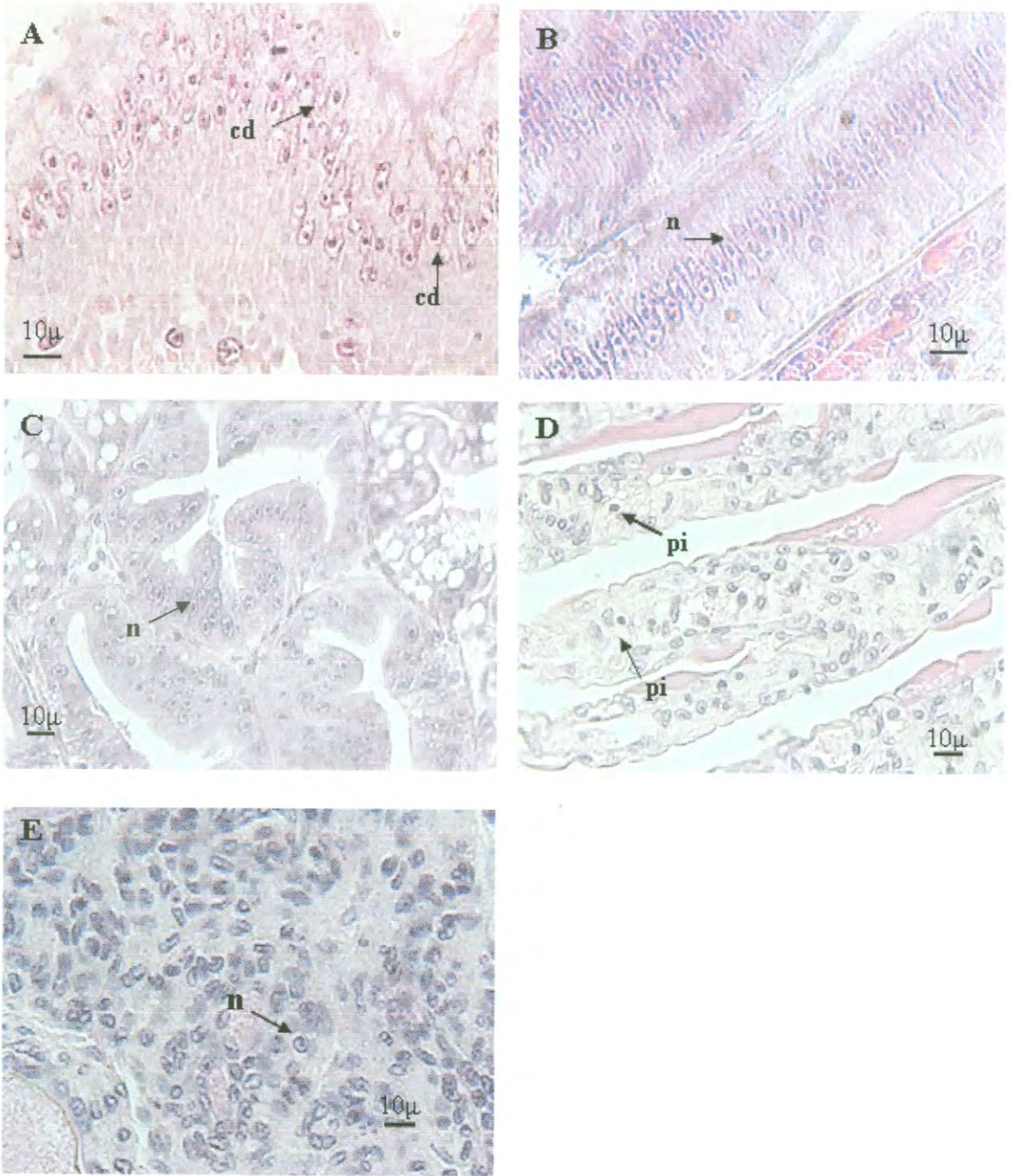


**Fig. 4.** Cortes histológicas a 5 µ de tejidos de *Penaeus vannamei* infectados con WSSV a tiempo 0, 1, 2, y 4 hpi (H&E). A) Epitelio estomacal, B) Epitelio intestinal, C) Hepatopáncreas, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células normales (n).

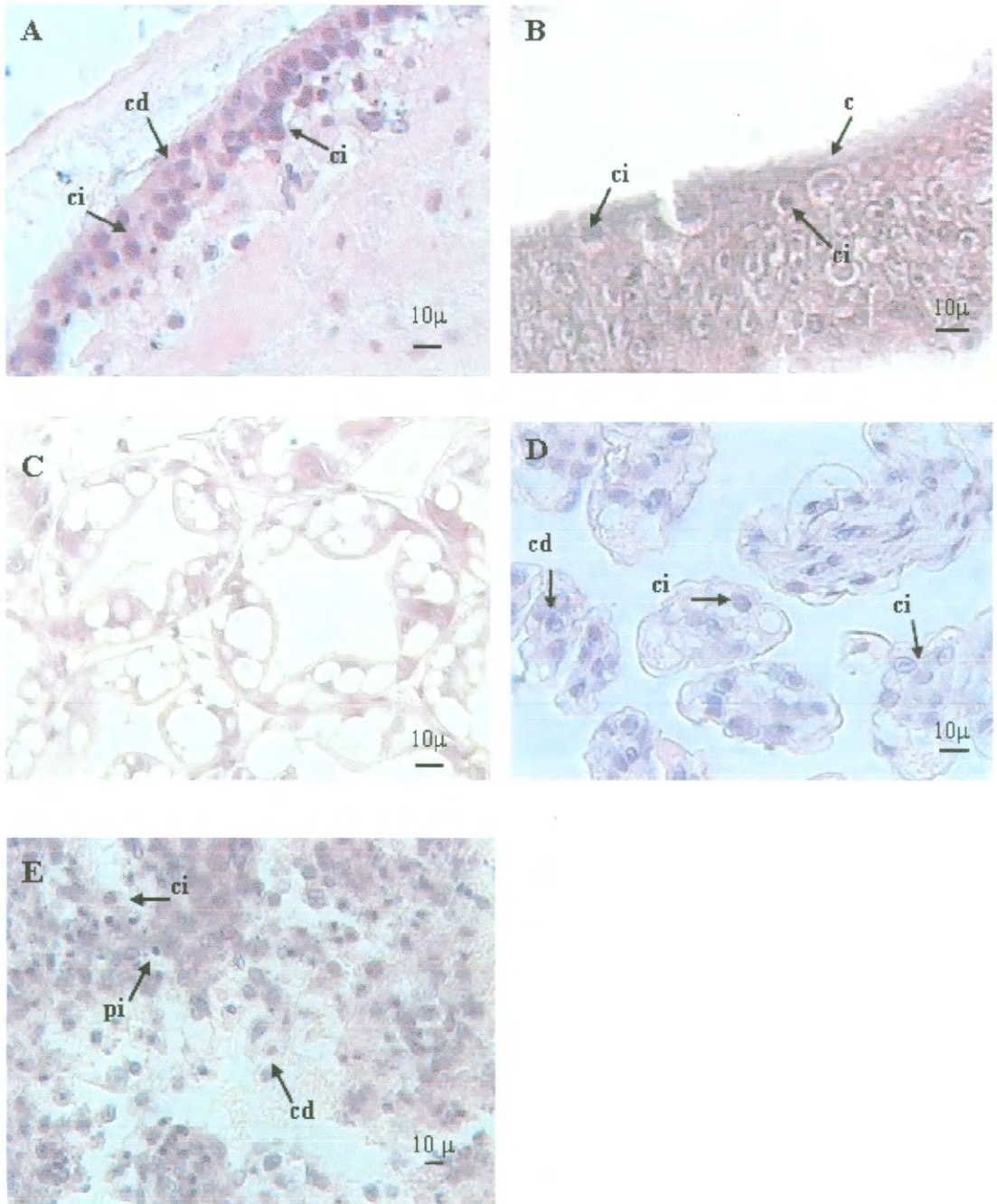




**Fig. 5.** Cortes histológicos a 5  $\mu$  de tejidos de *Penaeus vannamei* infectados con WSSV a 6 hpi (H&E). A) Epitelio estomacal, B) Epitelio intestinal, C) Hepatopáncreas, C) Epitelio intestinal, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células picnóticas (**pi**), Células normales (**n**), melanización (**m**), cariorrexis (**c**).



**Fig. 6.** Cortes histológicos a 5  $\mu$  de tejidos de *Penaeus vannamei* infectados con WSSV a 12 hpi (H&E). A) Epitelio estomacal, B) Epitelio intestinal, C) Hepatopáncreas, C) Epitelio intestinal, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células picnóticas (**pi**), Células normales (**n**), Hipertrofia nuclear tipo Cowdry (**cd**).

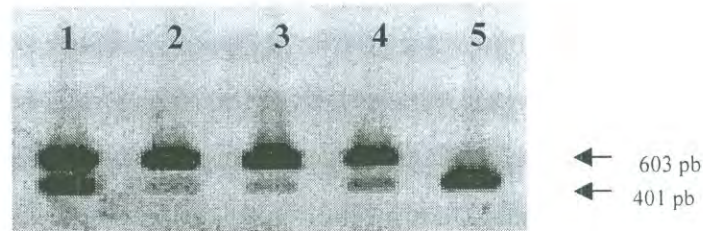


**Fig. 7.** Cortes histológicas a 5  $\mu$  de tejidos de *Penaeus vannamei* infectados con WSSV a 48 hpi. (H&E). ) Epitelio estomacal, B) Epitelio intestinal, C) Hepatopáncreas, C) Epitelio intestinal, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Hipertrofia nuclear tipo Cowdry (**cd**), cuerpos de inclusión intranuclear basofílicos(**ci**), células picnóticas (**pi**), cariorrexis (**c**).

### VI.3. Análisis de PCR.

#### VI.3.1 Reactivación del inóculo para la infección experimental.

Los cuatro organismos infectados vía intramuscular, revelaron por análisis de PCR la presencia de WSSV (Fig. 8). Todos los organismos después de las 30 hpi presentaron signos de la enfermedad, como nado errático y letargia; posteriormente después de las 42 hpi comenzaron a morir hasta el transcurso de las 60 hpi.



**Fig. 8.** Detección de WSSV por PCR en pleópodos de *Penaeus vannamei*, infectados intramuscularmente. 1- 4) camarones infectados, 5) control positivo de WSSV.

#### VI.3.2 Seguimiento de la infección.

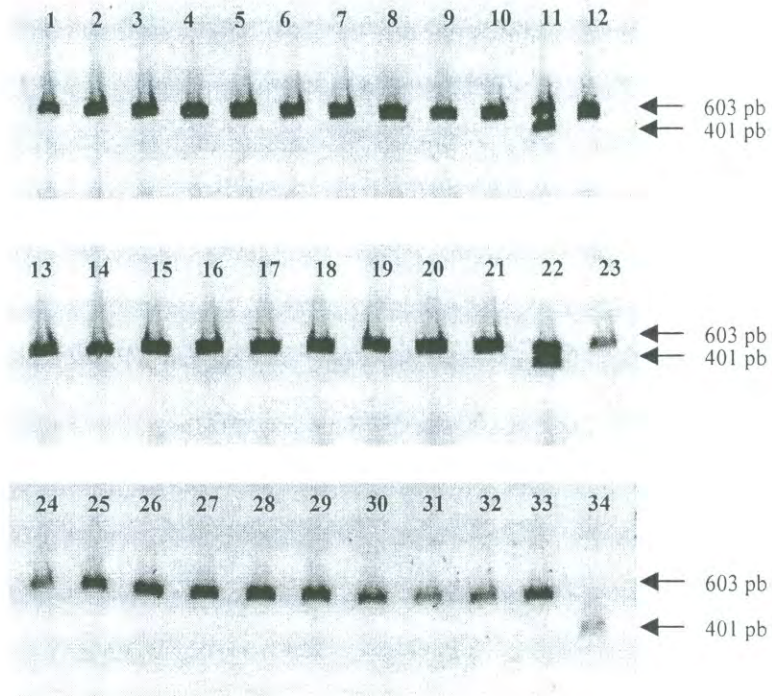
Los organismos del grupo control no mostraron amplificación del fragmento de WSSV para todos los tiempos post-infección y en todos los tejidos analizados (Tabla 6 y Fig. 9).

La amplificación del fragmento de 401 pb del ADN de WSSV se observó en el estómago anterior a las 4, 6, 12 y 48 hpi así como el estómago posterior desde las 2, 4, 6, 12 y 48 hpi, con baja intensidad de las bandas amplificadas para los tiempos 2, 4, y 6 hpi en ambas regiones del estómago. Sin embargo, para el estómago posterior se observó un incremento en la intensidad de amplificación a las 12 hpi y 48 hpi (Tabla 6 y Fig. 10). Para el intestino anterior y posterior no se detectó WSSV en las primeras horas post-infección, solo mostró resultados positivos a las 12 y las 48 hpi, al igual que el estómago, se observó ligeramente la presencia del virus a las 12 hpi, lo cual se incremento a las 48 hpi. (Tabla 6 y Fig. 10).

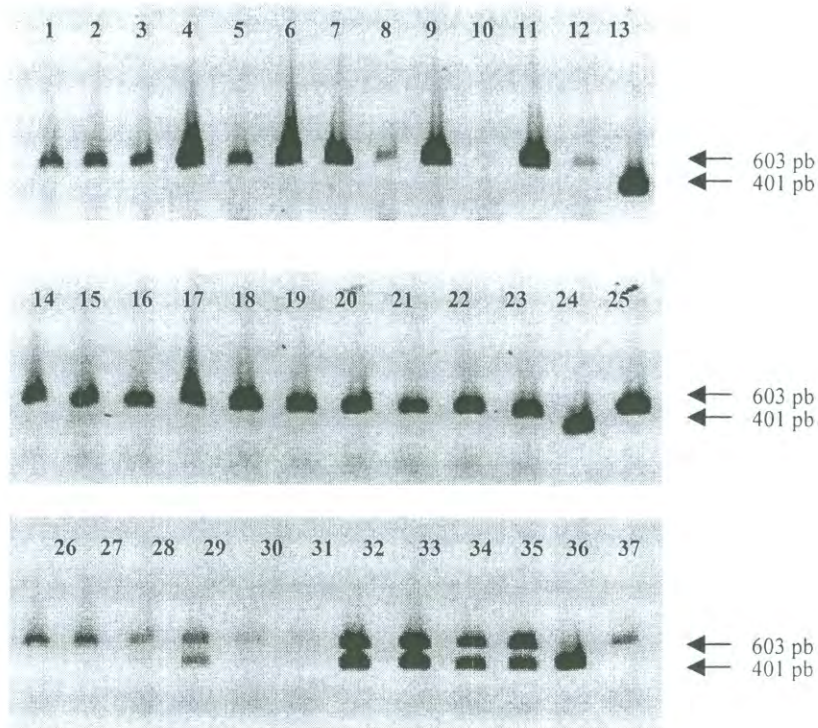
En la hemolinfa de los organismos infectados, se detectó la presencia de WSSV a partir de las 6 hpi, y subsecuentemente a las 12 y 48 hpi (Tabla 6 y Fig. 11).

**Tabla 6.-** Presencia de WSSV a lo largo del tracto digestivo y en hemolinfa de *Penaeus vannamei*. ND: no detectado, D: detectado.

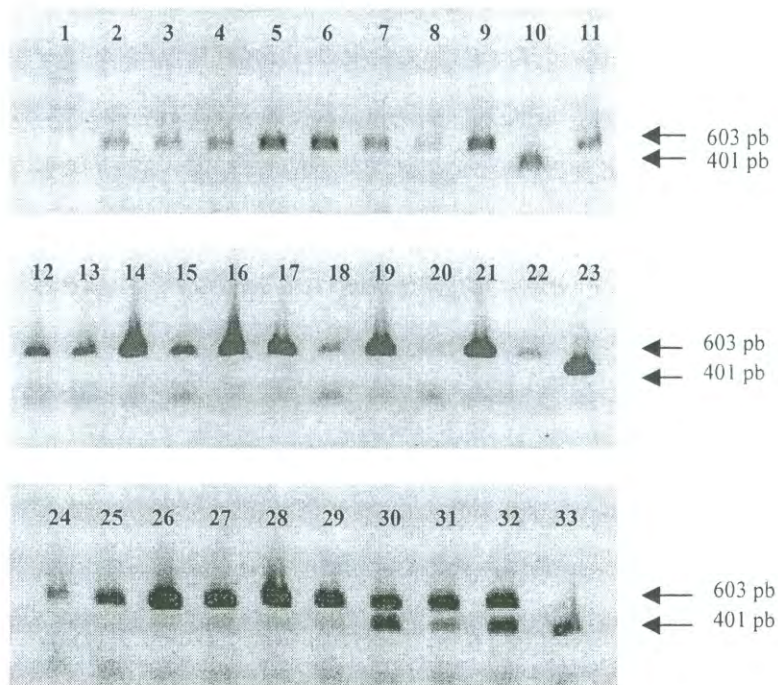
<b>Tejido</b>	<b>Control</b>	<b>0 hpi</b>	<b>1 hpi</b>	<b>2 hpi</b>	<b>4 hpi</b>	<b>6 hpi</b>	<b>12 hpi</b>	<b>48 hpi</b>
Estomago anterior	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D
Estomago posterior	ND	ND	ND	D	D	D	D	D
Intestino anterior	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D
Intestino posterior	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D
Hemolinfa	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D



**Fig. 9.** Productos de PCR para WSSV en tracto digestivo de organismos no infectados con WSSV (Grupo Control): 1) Estómago anterior 0 hpi, 2) Estómago posterior 0 hpi, 3) Intestino anterior 0 hpi, 4) Intestino posterior 0 hpi, 5) Estómago anterior 1 hpi, 6) Estómago posterior 1 hpi, 7) Intestino anterior 1 hpi, 8) Intestino posterior 1 hpi, 9) Estómago anterior 2 hpi, 10) Estómago posterior 2 hpi, 11) Control positivo, 12) Control negativo, 13) Intestino anterior 2 hpi, 14) Intestino posterior 2 hpi, 15) Estómago anterior 4 hpi, 16) Estómago posterior 4 hpi, 17) Intestino anterior 4 hpi, 18) Intestino posterior 4 hpi, 19) Estómago anterior 6 hpi, 20) Estómago posterior 6 hpi, 21) Intestino anterior 6 hpi, 22) Control positivo, 23) Control negativo, 24) Intestino posterior 6 hpi, 25) Estómago anterior 12 hpi, 26) Estómago posterior 12 hpi, 27) Intestino anterior 12 hpi, 28) Intestino posterior 12 hpi, 29) Estómago anterior 48 hpi, 30) Estómago posterior 48 hpi, 31) Intestino anterior 48 hpi, 32) Intestino posterior 48 hpi, 33) Intestino anterior 48 hpi, 34) Control positivo.



**Fig. 10.** Productos de PCR en camarones infectados con WSSV en tracto digestivo: 1) Estómago anterior 0 hpi, 2) Estómago posterior 0 hpi, 3) Intestino anterior 0 hpi, 4) Intestino posterior 0 hpi, 5) Estómago anterior 1 hpi, 6) Estómago posterior 1 hpi, 7) Intestino anterior 1 hpi, 8) Intestino posterior 1 hpi, 9) Estómago anterior 2 hpi, 10) Estómago posterior 2 hpi, 11) Intestino anterior 1 hpi, 12) Intestino Posterior 1hpi, 13) Control positivo, 14) Estómago anterior 2 hpi, 15) Estómago posterior 2hpi, 16) Intestino anterior 2 hpi, 17) Intestino posterior 2hpi, 18) Estómago anterior 4 hpi, 19) Estómago posterior 4 hpi, 20) Intestino anterior 4 hpi, 21) Intestino posterior 4 hpi, 22) Estómago anterior 6 hpi, 23) Estómago posterior 6 hpi, 24) Control positivo 25) Control negativo, 26) Intestino anterior 6 hpi, 27) Intestino posterior 6 hpi, 28) Estómago anterior 12 hpi, 29) Estómago posterior 12 hpi, 30) Intestino anterior 12 hpi, 31) Intestino posterior 12 hpi, 32) Estómago anterior 48 hpi, 33) Estómago posterior 48 hpi, 34) Intestino anterior 48 hpi, 35) Intestino posterior 48 hpi, 36) Control positivo, 37) Control negativo.



**Fig. 11.** Detección de WSSV por PCR en hemolinfa de *P. vannamei* a diferentes tiempos post-infección: 1) Marcador de peso molecular, 2) Control 0 hpi., 3) Control 1 hpi, 4) Control 2 hpi, 5) Control 4 hpi, 6) Control 6 hpi, 7) Control 12 hpi, 8) Control 48 hpi. 9) 0 hpi., 10) Control positivo, 11) Control negativo, 12-13) 0 hpi., 14-16) 1 hpi., 17-19) 2 hpi., 20-22) 4 hpi., 23) Control positivo, 24-26) 6 hpi, 27-29) 12 hpi, 30-32) 48 hpi, 33) Control positivo.



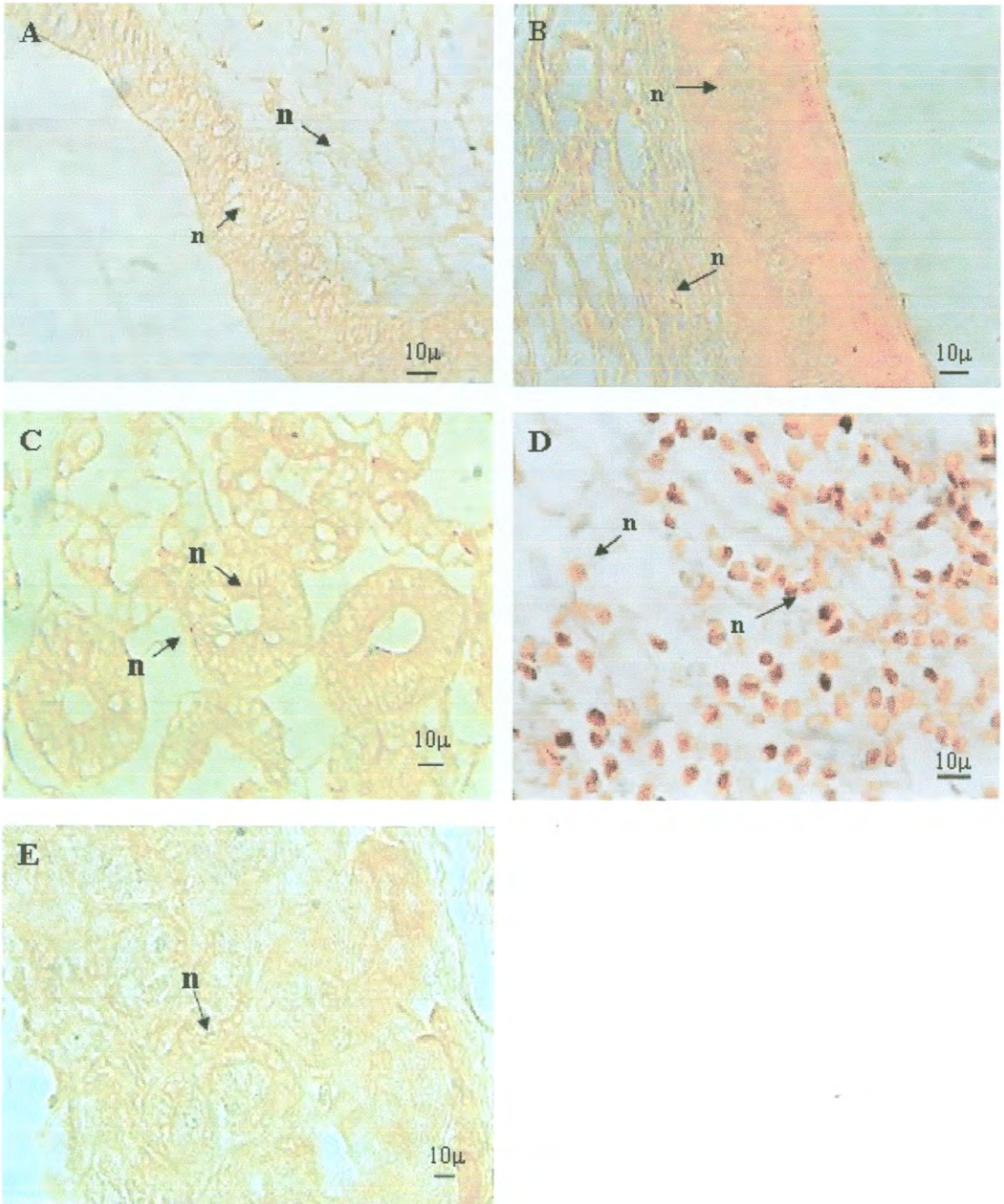
#### **IV.4. Análisis de Hibridación *in situ*.**

##### **IV.4.1 Seguimiento de la replicación viral.**

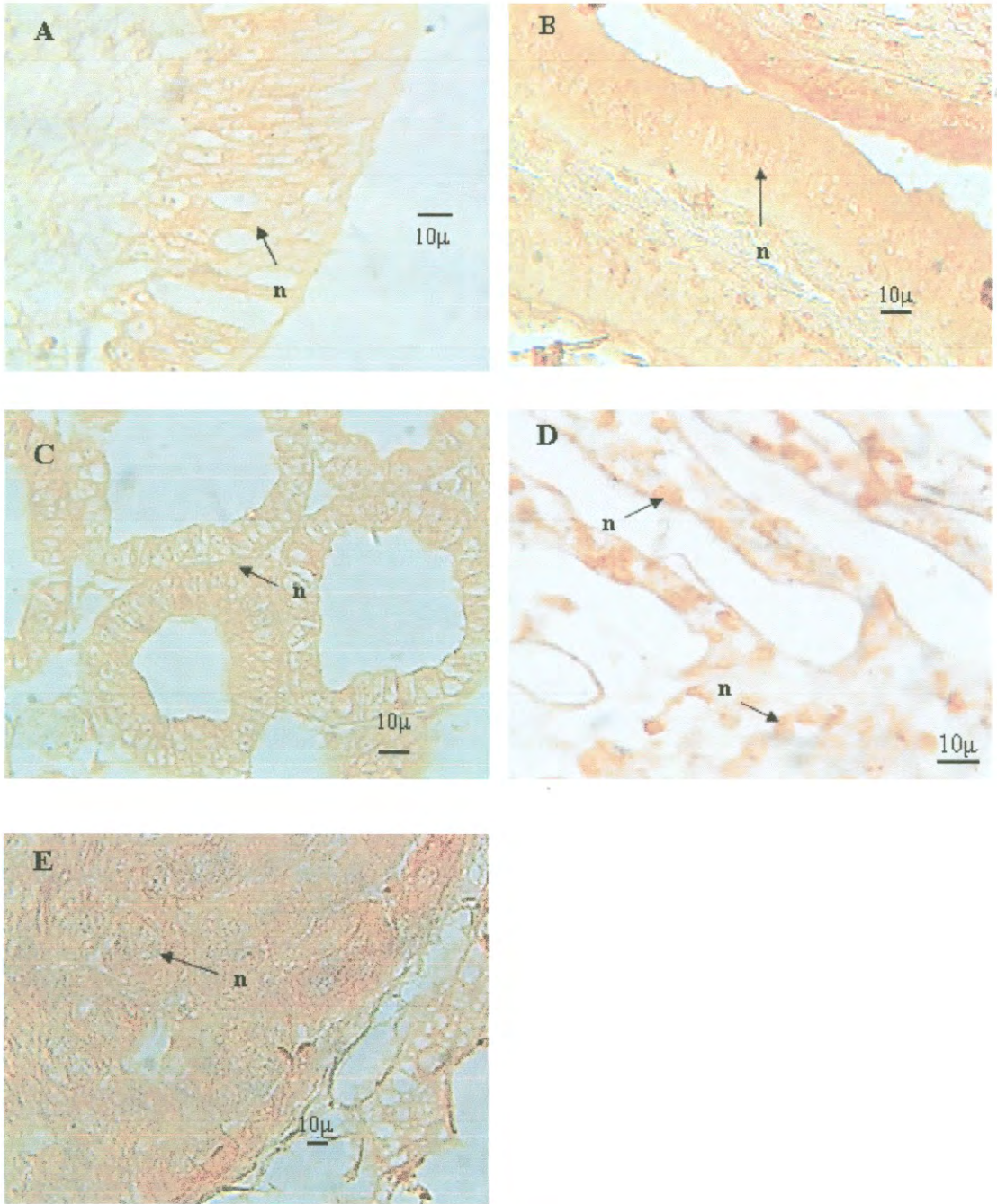
Se observaron reacciones negativas en los tejidos del grupo control para todos los tiempos analizados (Fig. 12). En organismos infectados, no se observaron reacciones positivas en los órganos blancos analizados para los tiempos de 0, 1, 2 y 4 hpi, y no se detectó infección en los núcleos de las células (Fig.13). Para el tiempo de las 6 hpi se logró detectar algunas células del epitelio intestinal anterior y posterior positivas a WSSV; los núcleos de estas células presentaron niveles muy bajos de reacción de la sonda lo que indicó etapas tempranas de replicación viral (Fig. 14). En cuanto al intestino, branquias, órgano linfoide, y hepatopáncreas, no presentó una reacción positiva a las 6 hpi (Fig. 14, Tabla 7).

Transcurridas las 12 hpi, el número de células positivas, al igual que la intensidad del precipitado azul, incrementó principalmente en el epitelio estomacal posterior. El epitelio estomacal anterior mostró un menor incremento de infección. En las branquias el ADN viral fue encontrado a las 12 hpi, con un bajo grado de infección; por el contrario el intestino, órgano linfoide y hepatopáncreas, no mostraron presencia de ADN viral (Fig. 15, Tabla 7).

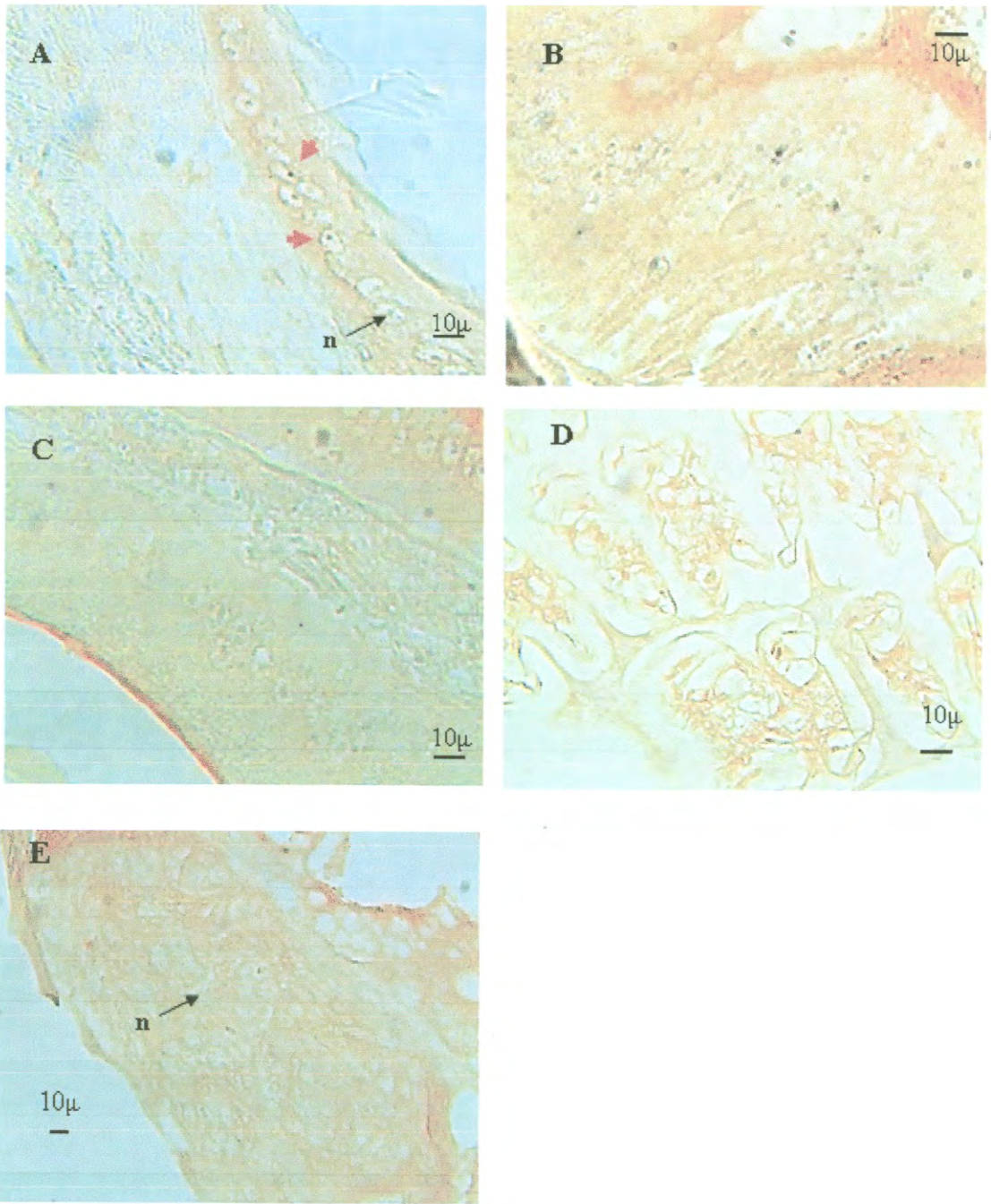
Después de 48 hpi el epitelio estomacal anterior presentó un grado severo de infección, observándose células intensamente teñidas y notables cambios citológicos. En este tiempo ya fue posible observar ADN viral en todos los tejidos analizados, lo que demostró en algunos casos grado desintegración de la membrana nuclear y células perfectamente teñidas (Fig. 16, Tabla 6). El hepatopáncreas presentó bajos niveles de infección viral siendo esto evidente hasta las 48 hpi (Fig. 16, Tabla 7).



**Fig.12.** Detección por Hibridación *in situ* de WSSV en tejidos de 5µ de *Penaeus vannamei* no infectados. A) Epitelio estomacal anterior, B) Epitelio estomacal posterior, C) Hepatopáncreas, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células normales (n).



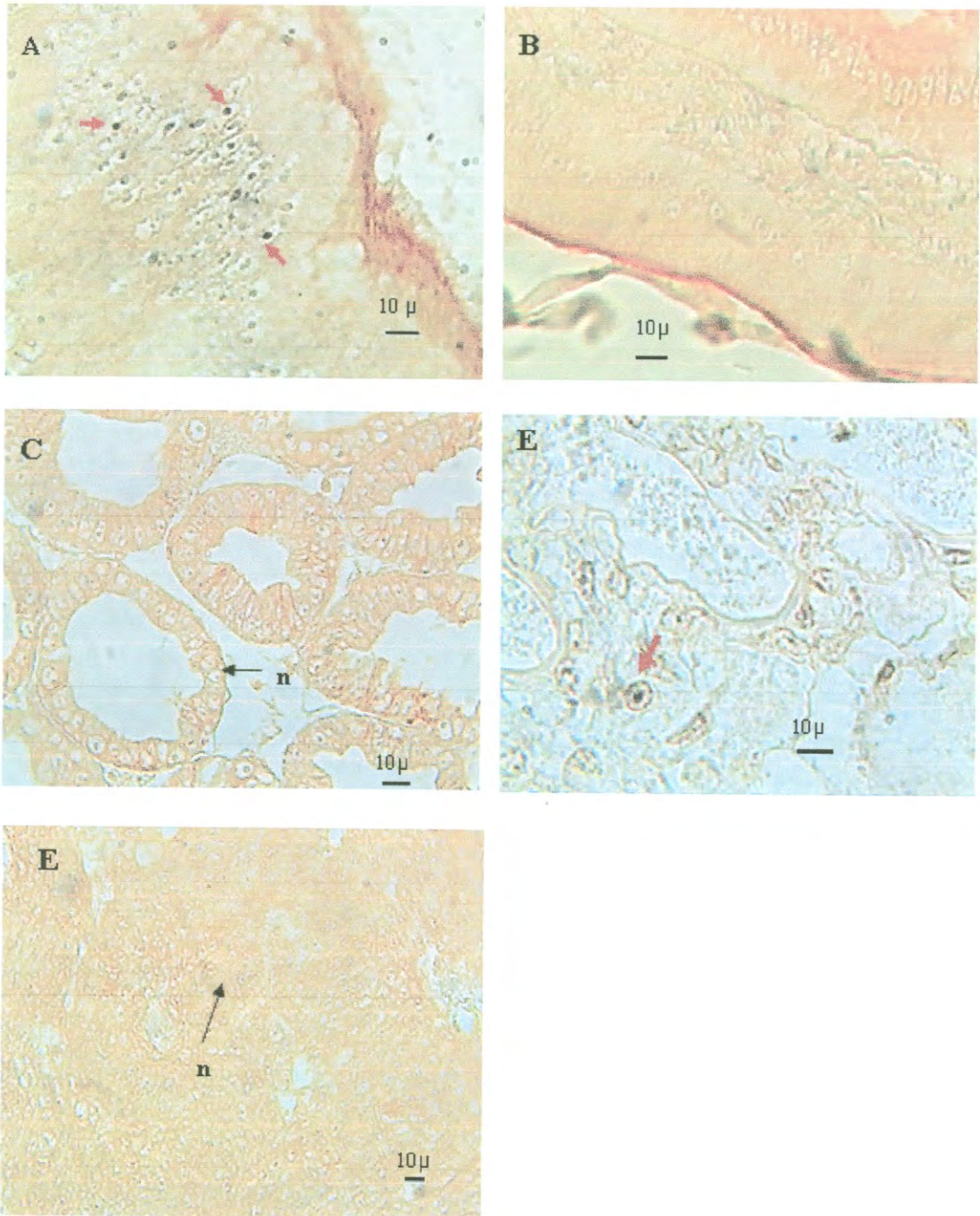
**Fig. 13.** Detección por Hibridación *in situ* de WSSV en tejidos de 5μ de *Penaeus vannamei* infectados experimentalmente a 0, 1, 2, y 4 hpi, A) Epitelio estomacal anterior, B) intestino, C) Hepatopáncreas, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células normales (n).



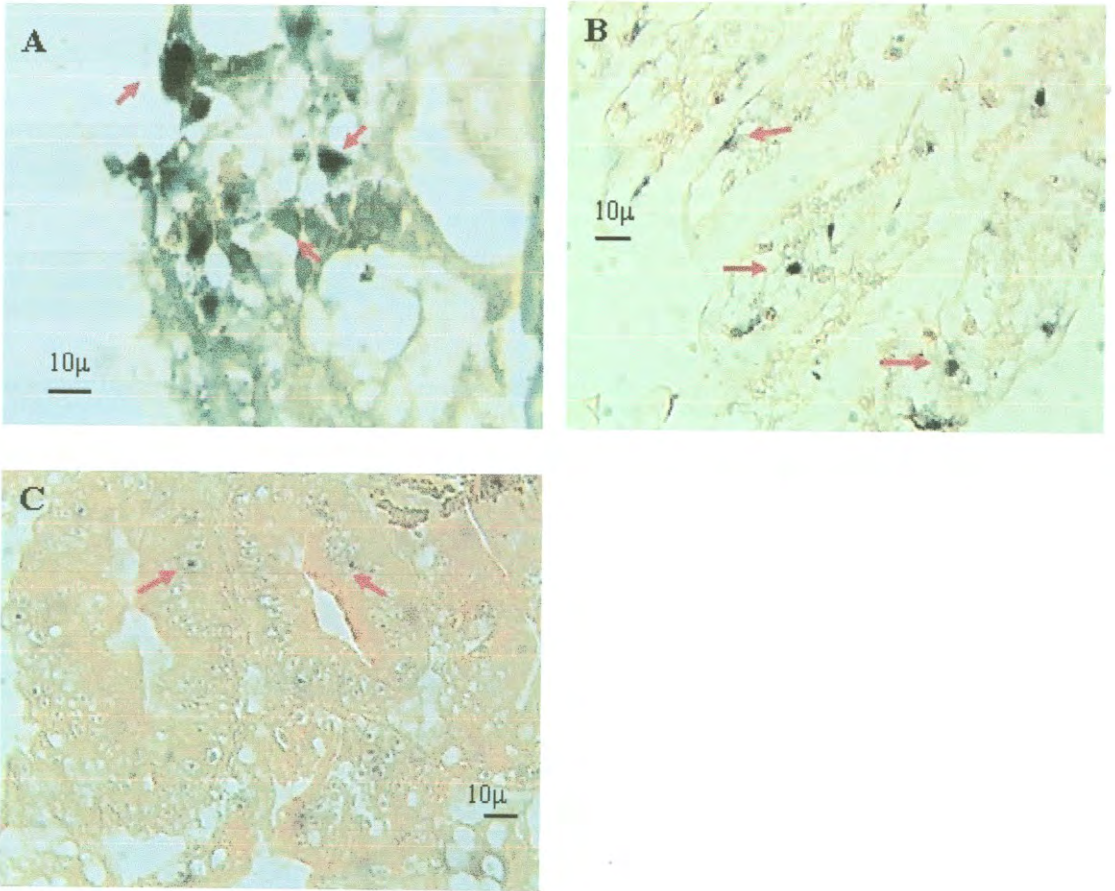
**Fig. 14.** Detección por Hibridación *in situ* de WSSV en tejidos de 5µ de *Penaeus vannamei* infectados experimentalmente después de 6 hpi. A) Epitelio estomacal anterior, B) Epitelio estomacal posterior, C) Intestino, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células positivas a WSSV ( flechas rojas), células normales (**n**).

**Tabla 7.-** Detección de WSSV por Hibridación *in situ*, en tejidos de *Penaeus vannamei* infectados experimentalmente a diferentes tiempos post-infección. (-) ausencia de precipitado negro o azul en las células, (+) ligera presencia de precipitado azul. (++) Incremento de precipitado, células intactas pero con hipertrofia celular, (+++) precipitado azul- negro células con desintegración en la membrana nuclear. (++++) intenso precipitado negro con obvios cambios citopatológicos.

Tejido	0 hrs	1 hrs	2 hr	4 hrs	6 hrs	12 hrs	48 hrs
Estómago	-	-	-	-	+	++	++++
Intestino	-	-	-	-	-	-	+++
Branquias	-	-	-	-	-	+	+++
Órgano Linfoide	-	-	-	-	-	-	+++
Hepatopáncreas	-	-	-	-	-	-	++



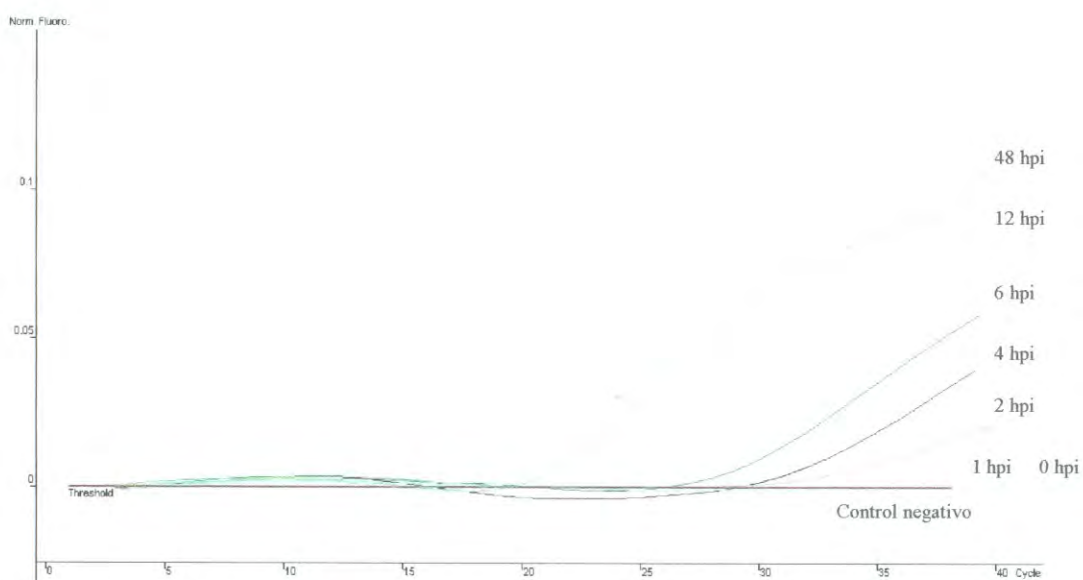
**Fig.15.** Detección por Hibridación *in situ* de WSSV en tejidos de 5 $\mu$  de *Penaeus vannamei* infectados experimentalmente después de 12 hpi. A) Epitelio estomacal anterior 100x, B) Intestino, C) Hepatopáncreas, D) Branquias, E) Órgano linfoide. 400X. Células positivas a WSSV (flechas gruesas), células normales (n).



**Fig.16.** Detección por Hibridación *in situ* de WSSV en tejidos de 5µ de *Penaeus vannamei* infectados experimentalmente después de 12 hpi. A) Epitelio estomacal anterior 100x, B) Branquias, D) Hepatopáncreas. 400X. Células positivas a WSSV (flechas gruesas).

#### IV.5. PCR tiempo Real.

En la figura 17, se presenta el incremento de ADN viral en epitelio estomacal a diferentes horas post-infección. En el control negativo y en tiempos de 0 y 1 hpi, no se observa la amplificación de ADN de WSSV; por el contrario a partir de las 2 hpi, se observa la amplificación de ADN viral, mostrando claros incrementos para las 4, 6, 12 y 48 hpi. El mayor incremento se detecta de las 6 a las 12 hpi.



**Fig. 17.** Amplificación de ADN viral en estómago de *Penaeus vannamei* a diferentes horas post-infección.



## V.- DISCUSIÓN.

Hablar del virus del síndrome de la mancha blanca siempre está asociado a grandes pérdidas económicas que ha provocado, desde sus primeros brotes en la industria camaronícola. Esta enfermedad es reportada hasta el momento como la más devastadora para camarones peneidos cultivados. Las mortalidades masivas de hasta el 100% en tan solo 3 ó 5 días; la gran diversidad de hospederos y órganos blanco de ataque viral, así como su extremada virulencia y rápida diseminación, son algunas de las principales características que han llevado a este patógeno a establecerse en la naturaleza y provocar en tan poco tiempo grandes epizootias a nivel mundial.

La alta virulencia de WSSV y su rápida diseminación dentro del organismo, han conducido al establecimiento y manejo de herramientas eficaces para diagnosticar la enfermedad en tiempos tempranos, antes de que el virus provoque daños celulares e invada los órganos blancos. En este trabajo se utilizaron técnicas como la histología convencional y técnicas moleculares como la PCR y la hibridación *in situ*, para detectar WSSV durante las primeras horas post-infección, las primeras células donde ocurrió replicación viral y el tiempo en el que este puede ser detectado. La detección se realizó en organismos inoculados vía oral con una cánula de venoclisis, lo cual permitió dar curso a la infección de manera controlada y simular una infección natural.

La técnica histopatológica se utiliza frecuentemente para el diagnóstico de WSSV y ha permitido visualizar los daños celulares ocasionados por el virus, la progresión de la enfermedad y el establecimiento en los principales órganos blanco (Yoganandhan *et al.*, 2003a; Pantoja y Lightner, 2003; Rodríguez *et al.*, 2003). Sin embargo, la detección se da en tiempos avanzados, cuando el virus ya a invadido varios órganos del camarón.

Las observaciones histopatológicas en este estudio revelaron la aparición de células con picnosis, cariorrexis e inclusiones eosinofílicas en desarrollo (Células tipo Cowdry A) así como cuerpos de inclusión intranucleares, en epitelio estomacal, branquias, intestino y órgano linfóide, reportados como órganos de origen ectodermal y mesodermal. Estos resultados concuerdan con otros autores que han trabajado con especies como *P. monodon* (Chang *et al.*, 1996; Karunasagar *et al.*, 1997; Kou *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1997, 1998); *P. indicus* (Yoganandhan *et al.*, 2003a) y *P. japonicus* (Chou *et al.*, 1995), en los cuales se han empleado varias vías de infección, la intramuscular, por inmersión y oral. Todos ellos coinciden que independientemente de la forma en que ingrese el virus al organismo, los

órganos afectados en diferentes especies de camarones, tienen el mismo origen embrionario.

El hepatopáncreas es el órgano en el cual es difícil detectar daño histológico: Los organismos infectados en el presente trabajo, no mostraron daños celulares característicos de la infección, como la formación de cuerpos de inclusión. No se tienen reportados hasta el momento la aparición de inclusiones celulares en el epitelio del hepatopáncreas (Chang *et al.*, 1996; Lightner *et al.*, 1998a; Sahul *et al.*, 2000; Yoganandhan *et al.*, 2003a). Sin embargo, fue posible detectar la presencia del virus por PCR y por hibridación *in situ* en este órgano. Yoganandhan *et al.* (2003a) mencionan que el virus solo es detectable en el hepatopáncreas una vez que el organismo está severamente infectado.

Existen diferencias en la susceptibilidad al virus en las diferentes especies de peneidos, lo que se ve reflejado en los tiempos en que el virus se replica en las células y provoca daños, en el tiempo que se desarrolló la enfermedad y por consiguiente las mortalidades provocadas. Esta susceptibilidad se ha relacionado con los distintos métodos de infección, estado fisiológico de los organismos, etapas de vida, estado nutricional y factores ambientales como temperatura y salinidad (Chou *et al.*, 1995; Lightner *et al.*, 1998b; Sonnenholzner *et al.*, 2002; Guevara-Torres, 2003; Uzueta-Bustamente *et al.*, 2004).

En este estudio no se observó mortalidad de los organismos infectados, debido a que se tomaron muestras a cortos tiempos post-infección, y en aquellos que se muestrearon a las 48 hpi, solo presentaron signos de la infección como letargia, y nado errático. Sin embargo los resultados revelaron que se pueden observar daños celulares desde las 6 hpi en el epitelio estomacal y en las branquias, consecutivamente a las 12 hpi de igual forma en el epitelio estomacal y en branquias y finalmente a las 48hpi, con excepción del hepatopáncreas los cambios celulares son claramente evidentes en el epitelio estomacal, branquias y en todos los tejidos analizados. Hasta el momento no se tienen registros de daños celulares mediante la técnica histológica para tiempos tempranos de 6 y 12 hpi en estómago y branquias. Estos resultados contrastan con lo observado por Yoganandhan *et al.*, (2003b) que por medio de una infección intramuscular en *P. indicus*, observaron histológicamente la presencia de cuerpos de inclusiones intranucleares en branquias, apéndices y tejido conectivo hasta las 36 hpi y en estómago a las 48 hpi.

Por otro lado Lightner *et al.* (1998); Sonnenholzner *et al.* (2002) y Ortiz-Ibarra *et al.* (2005) infectando oralmente con alimento contaminado de WSSV a *P. vannamei*; detectan histológicamente lesiones hasta las 36 horas post-infección en epitelio estomacal.

Se puede observar que existen diferencias en los estudios reportados y los de este trabajo; estas pueden ser atribuidas en primer lugar al método de infección. En el caso de las infecciones intramusculares, el virus se distribuye a través de la hemolinfa a los órganos blanco; y las branquias es uno de los principales órganos irrigados por hemolinfa donde el virus puede infectar antes que el epitelio estomacal (Durand *et al.*, 2003).

En el caso de las infecciones experimentales vía oral realizadas Lightner *et al.* (1998) y Sonnenholzner *et al.* (2002), la forma de entrada del virus al camarón es a través de alimento o tejido infectado, por lo que la cantidad de virus que entra al organismo dependerá de la cantidad de alimento que haya ingerido, lo que hace difícil estandarizar la cantidad de virus ingerida. Así, algunos camarones ingieren mayor cantidad de alimento que otros y por consiguiente diferentes cantidades de virus. Se ha determinado que el tiempo en que el virus puede provocar lesiones histopatológicas depende de la dosis viral que entre al camarón (Escobedo-Bonilla, 2006), lo cual puede explicar la diferencia en los tiempos encontrados en los trabajos previos. Por otra parte, es importante mencionar que el inóculo utilizado para las infecciones intramusculares, es preparado mediante concentración de virus; por lo que este inóculo contiene una mayor cantidad de extracto viral que en los tejidos o alimentos infectados para las inoculaciones vía oral (Durand *et al.*, 2003, Carbajal-Sánchez, 2005).

Ortiz-Ibarra *et al.* (2005) manejaron la misma forma de infección que en el presente trabajo; sin embargo, el tiempo en el que detectaron los primeros daños citológicos no coincidieron con lo aquí reportado. Ellos reportaron la aparición del primer daño citológico a las 36 hpi, y establecen como cuerpos de inclusión bien formados. No obstante, Lightner, (1996) estableció una escala relativa, en la cual planteó grados de severidad de la infección con los primeros daños histopatológicos provocados por WSSV como la presencia de células picnóticas, con cariorrexis e hipertrofia nuclear. Si bien estos son daños que también se han asociado a otros virus como YHV, la aparición de inclusiones intranucleares eosinófilas o cuerpos de Cowdry ya son considerados daño celular (Pantoja y Lightner 2003).

Aun cuando el análisis histológico permite hacer el seguimiento de la infección viral, hasta el momento no es considerada como una técnica altamente sensible que permita dar un diagnóstico acertado de la enfermedad; ya que otros patógenos provocan daños celulares que pueden llegarse a confundir en el diagnóstico; actualmente las herramientas moleculares más sensibles, como la PCR y la hibridación *in situ* permiten una detección más específica de la infección viral.

Los resultados de PCR detectaron al virus inicialmente en tejido estomacal (2 hpi), en segundo lugar en hemolinfa (6 hpi) y posteriormente en epitelio intestinal (12 hpi). Si bien, hasta el momento no se ha reportado la presencia de WSSV en epitelio estomacal en un tiempo temprano como lo es a las 2hpi; este resultado puede ser producto de el hecho que, al ingerir el camarón el inoculo vía oral, el paso del inoculo a la cavidad estomacal se hace de manera inmediata, de tal forma que las primeras células a las que el virus puede infectar, son las células estomacales, siendo las células primarias de replicación viral (Escobedo-Bonilla, 2006). Por tal motivo se logra detectar en este tiempo PCR en el epitelio estomacal para los camarones de *P. vannamei* de este trabajo.

En cuanto a infecciones vía oral Chang *et al.* (1996) no detectaron la presencia de WSSV por PCR, solo por hibridación *in situ*, lo que indicó que el virus inicialmente aparece en el estómago y branquias y en algunos camarones solo en estómago y no en las branquias. Por otro lado, en algunas secciones histológicas detectaron signos positivos en el lumen del estómago inmediatamente después de la inoculación sugiriendo la presencia inmediata del virus en la cavidad estomacal.

En contraste, estudios previos reportan la presencia de WSSV inicialmente en hemolinfa (Yoganandhan *et al.*, 2003a), pleópodos y branquias (Lo *et al.*, 1997; Kou *et al.*, 1998). Sin embargo, el seguimiento de la infección fue a través de inoculaciones intramusculares.

A las 12 hpi en intestino anterior/posterior se detectó ADN de WSSV por PCR. Se ha reportado que el intestino no es identificado como un órgano blanco del WSSV y existen pocos trabajos en donde se detecta la presencia del virus por PCR, en la región intestinal (Lo *et al.*, 1997). Existen trabajos con hibridación *in situ* que han registrado la presencia del virus en este órgano a partir de las 22 hpi, con grado mínimo de infección y a 64 hpi, cuando el organismo presentó un grado severo de infección (Chang *et al.*, 1996).

Es importante mencionar, que aún cuando se han realizado varios trabajos en donde se infecta vía oral a WSSV, como Chang *et al.* (1996), Lightner *et al.* (1998); Sonnenholzner *et al.* (2002), Ortíz-Ibarra *et al.* (2005) y Escobedo-Bonilla (2006); ninguno de ellos han monitoreado al virus por PCR a lo largo del tracto digestivo en diferentes horas post-infección.

Los resultados mostraron que la técnica de PCR, permite la detección de ADN viral en tiempos tempranos post-infección (2 y 4 hpi) en la región estomacal, aún cuando histológicamente no es posible apreciar lesiones celulares, sino hasta las 6 hpi, tiempo en el que se dan los primeros indicios de daño celular; lo cual se confirma con el análisis de PCR. De igual manera se puede observar para las 12 hpi. Por otra parte, en el caso del intestino, histológicamente no se detectaron lesiones hasta las 48 hpi; sin embargo, por PCR se detectó el virus a las 12 hpi.

En los cortes histológicos de cámara gástrica e intestino de camarón, se han observado restos de alimento en el lumen. Si se toma en consideración que la forma de inoculación de los organismos se realizó oralmente para simular el paso del alimento; se puede pensar en la posibilidad de que la amplificación de ADN viral a lo largo del tracto digestivo haya sido producto del inóculo infectado que se administró y no de los primeros indicios de replicación viral en las células. Sin embargo, los resultados de hibridación *in situ* mostraron que las primeras células de replicación viral son las del epitelio estomacal anterior y posterior a las 6 hpi seguidas por las células de las branquias a las 12 hpi. Cabe mencionar que el epitelio estomacal en este tiempo, tiene un incremento en el grado de infección; lo que se manifestó principalmente en la región del estomago posterior comparado con la región anterior.

En cuanto al epitelio intestinal, por hibridación *in situ* no se observaron inicios de replicación viral a las 12 hpi aún cuando la técnica de PCR detectó ligeramente, lo que indicó que el virus no había infectado aún estas células y solo se encontraba en el lumen intestinal. Por otro lado, a las 48 hpi, hubo un incremento claro del grado de infección en las células epiteliales del estomago así como en todos los órganos analizados. Las células epiteliales estomacales ya han sido reportadas como sitios de replicación primaria por Chang *et al.* (1996) y Escobedo-Bonilla (2006), lo cual coincide con el presente trabajo; sin embargo no coincide con lo reportado para las células branquiales.

Chang *et al.* (1996) identificaron en *Penaeus monodon* los primeros órganos blanco del WSSV con hibridación *in situ*. Sus resultados revelaron que el virus apareció inicialmente a las 16 hpi en el epitelio del estómago, branquias, epidermis cuticular y tejido conectivo del hepatopáncreas; por medio de una infección oral con una dieta infectada y músculo infectado de otros camarones. Ellos basan sus resultados en el argumento que aún cuando la infección fue vía oral, se esperaba encontrar solo células estomacales como primeros sitios de replicación, se pudo haber dado una infección por inmersión debido a que las partículas virales están junto con el músculo o la dieta artificial en el agua.

El trabajo de Chang *et al.* (1996) y el presente trabajo, manejó la misma vía de entrada del virus al organismo, pero la forma en que se realizó presentó variaciones, es por eso que se observan diferencias en los tiempos en que el ADN viral fue detectado en las células. Ya se ha mencionado que existen más variaciones en la cantidad de inóculo que pueda ingerir el organismo, además de la infección simultánea a las branquias al mismo tiempo que al estómago.

Por otro lado, Escobedo-Bonilla (2006) realizó una estandarización en los procedimientos de inoculación vía oral e intramuscular para WSSV; con técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y PCR. Él observó resultados muy semejantes a los obtenidos por Chang *et al.* (1996) en los organismos inoculados oralmente. Escobedo-Bonilla (2006), determinó los sitios de replicación, la dispersión de WSSV a los órganos blanco y observó que las células epiteliales del estómago anterior del tracto digestivo y branquias fueron sitios de replicación primaria a las 12 hpi, con una dosis viral alta. Sus resultados también indicaron que el WSSV una vez que se replica en los sitios primarios, el virus cruza lámina basal y alcanza la capa de tejido conectivo y/o sitios asociados a senos hemales, donde el virus es transportado a otros órganos blanco por circulación de la hemolinfa (Di Leonardo *et al.*, 2005). Sin embargo, el hecho de cómo el WSSV se replicó inicialmente también en branquias lo atribuye a 2 razones: 1) a través de inoculación pudo derramarse dentro de la cámara branquial o 2) al momento de la inoculación se lastimó al organismo causando fisuras en la cutícula y/o epitelio facilitando la entrada del virus.

Se ha manejado la dificultad de que el virus inicialmente infecte y se replique en las células del epitelio estomacal dada la barrera que puede representar la capa de quitina que recubre al estómago, lo que obstaculiza el reconocimiento de las células epiteliales con el virus (Corbel *et al.*, 2001). Estudios ya mencionados se han podido establecer que aunque

el estómago y las branquias están protegidos por una capa de quitina, no representa una manera 100% eficaz para prevenir infecciones. La razón de esto puede deberse a la falta de una capa epicuticular, ausencia de calcificación y la presencia de numerosos poros y canales (Escobedo-Bonilla, 2006). Por otro lado, Di Leonardo *et al.* (2005), comparando rutas de infección para WSSV en *Marsupenaeus* y *Palaemon*, planteó la posibilidad de que WSSV penetre a las células epiteliales para desarrollar una infección primaria siguiendo el mecanismo descrito para otros baculovirus en insectos (Gutiérrez y López-Ferber, 2004); donde se ha observado la presencia y actividad de enzimas proteolíticas en las envolturas de los virus que les permite cruzar la lamina basal (Lanier *et al.*, 1996).

Sin embargo los resultados de este trabajo indicaron el virus al ingresar oralmente a los camarones, las primeras células que infecta son las células del epitelio estomacal (2-4 hpi) en donde se replica rápidamente (6 hpi), y continua su infección siguiendo posiblemente en modelo descrito para otros baculovirus en insectos por Di Leonardo *et al.* (2005) y Escobedo-Bonilla, (2006). Posteriormente, el virus una vez en la hemolinfa (6 hpi) se dispersa vía circulación a branquias (12 hpi) y finalmente a otros órganos de origen ectodermal y mesodermal (48 hpi), hasta finalmente invadir al organismo y provocar la muerte.

Por otra parte, el análisis de PCR tiempo real confirma lo observado con PCR normal; donde claramente se observa como en tiempos de 0 y una hora post-infección, el virus no esta presente en las células del epitelio estomacal, sino hasta las dos hpi, donde se observan el primer incremento de ADN viral; indicando ya la infección de las células estomacales para este tiempo. A las 4 hpi también es evidente el incremento de ADN, manifestando el mismo comportamiento para las 6, 12, y 48 hpi. Este incremento de ADN viral, producto de la replicación viral, es detectado a las 6 hpi por hibridación *in situ*, siendo más evidente a partir de las 12 hpi, lo cual se comprueba con lo observado con PCR tiempo real, detectándose el mayor incremento viral de las 6 a las 12 hpi.

Finalmente las técnicas utilizadas en este trabajo nos revelan que es posible detectar los primeros daños de WSSV en tiempos tempranos de infección. Siendo las técnicas de PCR las de mayor sensibilidad, se de detectó el virus en estómago en tiempos tan tempranos como las 2, 4, y 6 horas post-infección; seguida por la hibridación *in situ* que muestra los primeros sitios de replicación viral hasta las 6 hpi y finalmente la histología (H&E) que da indicios de daños a las 6 hpi. Sin embargo, los resultados histológicos son

muy generales y subjetivos dada la poca especificidad y nos presenta un resultado presuntivo que sirve como base para la aplicación de las otras técnicas.



## VI.- CONCLUSIONES.

- El virus del síndrome de la mancha blanca al ser inoculado en *P. vannamei* oralmente, las primeras células que se infectan son las células del epitelio estomacal (2-4 hpi) en donde se replica rápidamente (6 hpi), y continua su infección siguiendo posiblemente el modelo descrito para otros baculovirus en insectos. Posteriormente, el virus una vez en la hemolinfa (6 hpi) se dispersa vía circulación a branquias (12 hpi) y otros órganos de origen ectodermal y mesodermal (48 hpi), hasta finalmente invadir al organismo y provocar la muerte.
- Los resultados de PCR tiempo real comprobaron las observaciones de PCR e hibridación *in situ*; mostrando un claro incremento del ADN viral presente en estomago a partir de las 2, 4, 6, 12 y 48 hpi.
- Es posible detectar los primeros daños de WSSV en tiempos tempranos de infección, y de acuerdo a la sensibilidad de las técnicas utilizadas se manifiestan a diferentes tiempos post-infección. Siendo las técnicas de PCR las de mayor sensibilidad, fue posible detectar el virus en el estómago en tiempos como las 2, 4, y 6 horas post-infección; seguida por la hibridación *in situ* que mostró los primeros sitios de replicación viral a las 6 hpi y finalmente la histología (H&E), como una técnica de poca sensibilidad y especificidad reveló indicios de daños a las 6 hpi, y la formación de los primeros cuerpos de Cowdry a las 12 hpi. Sin embargo, aún cuando los resultados histológicos son muy generales, son un buen punto de partida para la detección de anomalías celulares.

## VII.- RECOMENDACIONES.

- Hacer el seguimiento de la infección en tiempos de las 12 a las 48 hpi, para poder completar toda la ruta de infección de WSSV en *P. vannamei*; desde la replicación en las células del epitelio estomacal, hemolinfa y branquias, hasta invadir todos los órganos blanco.
- Siendo la vía oral la forma mas probable de infección en los sistemas de cultivo, es recomendable para un diagnostico temprano de la infección, hacer la detección de WSSV en estomago, antes que en branquias y en pleópodos.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Álvarez, R. 2003. Detection of *Baculovirus penaei* and Cases of Vibriosis in *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* on a Farm on the West Coast of Venezuela. *Revista Científica FCV*, (8)4: 255-262.
- Bell, T.A. y D.V. Lightner. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Soc., Botton Rouge, USA. 140 p.
- Bonami, J.R. 1997. The crustacean viral diseases: recent developments. *Bulletin European Association Fish Pathology*, 17 (6): 1-3.
- Brodwy, C.L., D. Holloway Jr., C.O. King, A.D. Stokes, Stokes, J.S. Hopkinsa y P.A. Sandifer. 1998. IHHNV virus and water exchanger rate. *Journal of Crustaceans Biology*, 13: 87-94.
- Bruce, L.D., R.M. Redman, D.V. Lightner, y J.R. Bonami. 1993. Application of gene probes to detect penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*, 17: 215-221.
- Bruce, L.D., R.M. Redman, D.V. Lightner, y J.R. Bonami. 1994. Application of gene probes to determine target organs of a penaeid shrimp baculovirus using *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*, 17: 215-221.
- Cai, S., J. Huang, C. Wang, X. Song, X. Sun, J. Yu, Y. Zhang, y C. Yang. 1995. Epidermiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. *Journal of Fish Diseases*, 19: 112-117.
- Carbajal-Sanchez, I.S. 2005. Infección experimental de juveniles de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) con el Virus del Síndrome de la mancha Blanca (WSSV) a diferentes salinidades de cultivo. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. 77 pp.
- Carvajal, P. 2006. Acuicultura Latinoamericana: el poder de un gigante. IntraFish Media, Chile. 78 pp
- Chang, P.S., C.F. Lo, Y.C. Wang y G. H. Kou. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in experimental infected wild shrimp, crabs and lobsters by *in situ* hybridation. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27: 131-139.
- Chang, P.S., H.C. Chen y Y.C. Wang. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in experimentally infected wild shrimps, crabs and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture*, 164: 23-43.
- Chou, H.Y., C.Y. Huang, Y.C. Wang, H.C. Chiang, y C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23: 165-173.

- Chou, H.Y., C.Y. Huang., C.F. Lo, y G.H. Kou, 1998. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. *Aquaculture*, 164: 263-276.
- 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.
- De la Rosa-Vélez, J. y J.R. Bonami. 2002. Herramientas moleculares: una estrategia para la prevención de epizootias virales en cultivos de camarón. En Martínez-Córdova, L.R. (Ed) Camaronicultura. Avances y Tendencias. AGT Editor. S.A. México, D.F. 261-280 pp.
- De la Rosa-Vélez, J. y J.R. Bonami. 2006. Detección molecular de enfermedades virales que afectan el desarrollo del cultivo de camarón. *Hidrobiología*, 16(3): 275-293.
- Di Leonardo, V.A., V. Bonnichon, P. Parrinello, N. Roch, J.R. Bonami. 2005. Comparative WSSV infection routes in the shrimp genera *Marsupenaeus* and *Palemon*. *Journal of Fish Diseases* 28: 565-569.
- Durand, S.V., D.V. Lightner, L.M. Nunan, R.M. Redman, J. Mari y J.R. Bonami. 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus WSBV of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27: 59-66.
- Durand, S.V., K.F.J. Tang y D.V. Lightner. 2003. Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *Journal of Aquatic Organisms*, 27: 59-66.
- Durand, S., D.V. Lightner, R.M. Redman y J.R. Bonami. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 29: 205- 211.
- Escobedo-Bonilla, C.M. 2006. Development in use of standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for studies on pathogenesis and control. Tesis Doctoral. Department of virology, Parasitology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine Ghent, University. 202 p.
- FAO. 2002. Estadísticas de la producción de camarón. Ciencia y desarrollo XVII. (106) 83-95.
- FAO. 2004. Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina. FAO. Reporte técnico de Pesca. No. 450. Publ. FAO, Roma, Italia. 79 pp.
- Figueras-Gil, E. 2000. Problemática actual de los patógenos que inciden en los sistemas acuícolas. pp. 185-203. En: Memorias del III Simposium Internacional de Acuicultura. Culiacán, Sinaloa, México del 5 al 7 de octubre. 382 p.

- Flegel, T.W. 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. In: NRIA International Workshop, New Approaches to Viral Diseases of Aquatic Animal. National Research Institute, Qingdao, P.R. China.
- Flegel, T.W. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*, 258: 1–33.
- Galavíz-Silva L. 1999. Métodos de diagnóstico de WSBV-PCR. In: Memorias del Seminario sobre Patología y Bioseguridad en Camaronicultura. Purina Agribrands. Mazatlán, México. 8–33 pp
- Galavíz-Silva L., Z.J. Molina-Garza., J.M. Alcocer-González, J.L. Rosales-Encinas. y C. Ibarra-Gámez. 2004. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. *Aquaculture*, 242: 53–68.
- Guevara-Torres, 2003. Susceptibilidad de juveniles de *Penaeus vannamei* al virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) relacionada con la edad (3 y 4 meses), el estadio de muda y temperatura (27 y 33°C). Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. 79 p.
- González-Rocha, J. 2000. Manejo de recursos naturales. Oficina Regional de la FAO para la América Latina y el Caribe. 125-131 pp.
- Gutiérrez, S. y M. Lopez-Ferber. 2004 Les stratégies des baculovirus pour franchir l'intestin des insectes. *Virologie* 8: 311–321.
- Heino, P y V. Hukkanen. 1992. 316-322p. Virus Detection in Biopsy Specimens. C. Kessler. Ed. Nonradiative Labeling and Detection of Biomolecules. Springer Laboratory. 427pp.
- Karunasagar, I., S. K. Otta y I. Karunasagar. 1997. Histological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. *Aquaculture*, 153: 9-13.
- Kou G.H., S.E. Peng, Y.L. Chiu y C. F. Lo. 1998. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Just, M. V., J. Bonami, T. W. Flegel, G. Kou, D. Lightner, C. Lo, P. Loh y P. J. Walker. 2002. *Nimaviridae* a new virus family infecting aquatic invertebrates. Resumen. XII th International Congress of Virology. Paris.
- Lightner, D.V. 1996. The penaeid shrimp viruses IHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Review Scientific and Technical*. Office International Epizooties, 15: 579-601.

- Lightner, D.V. 1998. Handbook of normal penaeid shrimp histology. The world Aquaculture Society. Baton rouge, Louisiana. 114 pp.
- Lightner, D.V., R.M. Redman, B.T. Poulos, L.M. Nunan, J.L. Mari y K.W. Hasson. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by international movement of live shrimp for aquaculture and frozen shrimp for commodity markets. Review Scientific and Technical, Office International Epizooties, 16: 146-160.
- Lightner, D.V. y R.M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture, 164: 201-220.
- Lightner, D.V., K.W. Hasson, B.L. White, y R.M. Redman. 1998a. Experimental infection of Western hemisphere penaeid shrimp with asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. Aquatic Animal Health 10, 271-281.
- Lightner, D. V., K. W. Hasson, B. L. White y R. M. Redman. 1998b. Experimental infection of Western Hemisphere Penaeid Shrimp with Asian White Spot Syndrome Virus and Asian Yellow Head Virus. Journal of Aquatic Animal Health, 10: 271-281.
- Lanier L.M., J.M. Sloack J.M. y L.E. Volkman. 1996. Actin binding and proteolysis by the baculovirus AcMNPV: the role of virion-associated V-CATH. Virology 2: 285-295.
- Lo, C.F., C.H. Ho, C.H. Chen, Y.L. Liu, P.Y. Yeh, S.F. Peng, H.C. Hus, C.F. Chang, M.S. Su, C.H. Wang y G.H. Kou. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. Diseases of Aquatic Organisms, 30: 53-72.
- Lo, C.F., S.E. Peng y C.H. Kou. 1998. PCR Screening for White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus monodon* Brooders: a General Effort to combat shrimp WSS. syndrome virus. Diseases of Aquatic Organisms, 35: 63-69.
- Mari, J., J.R. Bonami y D.V. Lightner. 1993. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps: Diagnosis of the disease using a specific probe. Journal of General Virology, 74: 2637-2643.
- Mari, J., D.V. Lightner, B.T. Poulos y J.R. Bonami. 1995. Partial cloning of the genome of an unusual shrimp parvovirus (HPV): Use of gene probes in disease diagnosis. Diseases of Aquatic Organisms, 22: 129-134.
- Mendez-Payan, J.C. 2003. Presencia y prevalencia de algunos agentes virales en granjas camaronícolas de Nayarit y Sinaloa, evaluadas mediante técnicas de biología molecular. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Departamento de

Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. 56 p.

- Montoya-Rodríguez, A. y S. López-Félix. 2000. Estandarización de Técnicas Moleculares para la Detección de Patógenos en Organismos Acuáticos. Pp. 263-279. En: Memorias del III Simposium Internacional de Acuicultura. Mazatlán, Sin. Méx., del 5 al 7 de octubre. 382 pp.
- Nadala Jr., E.C.B, L.M. Tapay, S. Cao, y P.C. Loh, 1997. Detection of yellow head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the Western blot technique. *Journal of Virology*, 69: 39–44.
- Ortiz-Ibarra, F., M. L. Unzueta-Bustamate y A.R. Ochoa-Meza. 2005. Evaluación preliminar del primer daño citológico provocado por WSSV en *Litopenaeus vannamei* al ser inoculado oralmente. Segundo Foro Internacional de Acuicultura. Hermosillo, Sonora. Noviembre del 2005.
- Pantoja C.R., y D.V. Lightner. 2003. Similarity between the histopathology of White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Syndrome Virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. *Aquaculture*, 218: 47-54.
- Poulos, B. T., J. Mari, J.R. Bonami, R.M. Redman, y D.V. Lightner. 1994. Use of non-radioactively labeled DNA probes for the detection of a baculovirus from *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization on fixed tissue. *Journal of Virology Methods*, 49: 187–194.
- 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 vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *Journal of Fish Diseases*, 26: 439-450.
- SAGARPA, 2003. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. 400 p.
- Sahul-Hameed, A.S., K. Yoganandhan, S. Sathish, M. Rasheed, V. Murugan y J. Kunthala. 2001. White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture*, 201: 179-186.
- Sahul-Hameed, A.S., M. Xavier-Charles y M. Anilkumar, M. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 183: 207–213.
- Sonnenholzner, S.J., F. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría, y J. Calderón. 2002. Supervivencia y respuesta immune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. *Boletín El Mundo Acuícola* 8(1): 50-56.
- Tang, F.J., D.V. Lightner. 1999. A yellow head gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*, 35:165– 173

- Tan, L.T., S. Soon., K.L. Lee. M. Shariff., M.D. Hassan y A.R. Omar. 2001. Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *P. monodon* (Fabricius) using competitive polymerase chain. *Journal of Fish Diseases*, 24: 315-323.
- 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.
- Uzueta-Bustamente, M., R. Silveira-Cofficny, A. Prieto, G. Aguirre-Guzmán y R. Vázquez-Juárez. 2004. Susceptibilidad de *Litopenaeus shcmitti* y *Cherax quadricarinatus* al virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). *Ciencias Marinas*. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, México. 30: 537-545.
- Van Hulten, M.C.W., M. Tsai, C.F. Lo, J.H. Kou y J.M. Vlak. 2000. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *Journal of General Virology*. 81: 307-316.
- Van Hulten, M.C.W., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, H. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst y J.M. Vlak. 2001. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence. *Virology*, 286: 7-22.
- Vega-Pérez, C. 2003. Detección de la presencia de los agentes patógenos el síndrome de la mancha blanca (WSSV), síndrome de Taura (TSV) y virus de cabeza amarilla (YHV), mediante técnicas moleculares, en granjas camaronícolas de la zona Noreste de México. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. 56 p.
- Vijayan, K.K., C.P. Balasubramanian, K.P. Jithendran, S.V. Alavandi y T.C. Santiago. 2003. Histopathology of Y-organ in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*, experimentally infected with white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 221: 97-91.
- Wang, C.H., C.F. Lo, C.M. Leu, P.Y. Yeh, H.Y. Chou, M.C. Tung, C.F. Chang, M.S. Su, y G.H. Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23: 239-242.
- Wang, Y.G., K.L. Lee, M. Najiah, M. Shariff y M.D. Hassan. 2000. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 41: 9-18.
- 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.

- Wongteerasupaya, C., J.E. Vickers, S. Sriurairatana, G.L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul y T.W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21, 69–77.
- Yoganandhan, K., S. Sathish, V. Murugan, R.B. Narayanan y A.S. Saúl Hameed. 2003a. Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques. *Aquaculture*, 215: 21-29.
- Yoganandhan, K., S. Thirupathi y A.S. Saúl Hameed. 2003b. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 221: 1-11.
- Zarain-Herzberg, M., F. Acencio-Valle. 2001. Taura Síndrome in México: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, 193: 1-9.

## IX. ANEXOS.

### A. Solución Davidson (1 L):

330 ml	Alcohol etílico al 95%
220 ml	Formalina al 100% (preparada con una solución acuosa saturada de gas de folmaldehído a 37%)
115 ml	Ácido acético glacial
335 ml	Agua (preferentemente destilada)

Almacenar a temperatura ambiente.

### B. Extracción de ADN.

- 1.- Tomar 100 mg aproximadamente de tejido y se colocar en un tubo de 1.5 ml con 250  $\mu$ l de amortiguador de lisis.
- 2.- Macerar con un pistilo y se centrifugar a 1200 rpm durante 10 min.
- 3.- Tomar 50  $\mu$ l del sobrenadante y se colocarlos en un microtubo de 1.7 ml, con 150  $\mu$ l de matriz (GeneClean Glassmilk, cat. # 1101-601, Bio101, inc.
- 4.- Homogenizar en el vortex y se centrifugar a 1200 rpm durante 1 min. y posteriormente se eliminar el sobrenadante.
- 5.- Agregar 100  $\mu$ l de solución de lavado (Gene Clean Spin New Wash, cat # 1101-602) y resuspender la matriz.
- 6.- Homogenizar en el vortex y se centrifugar a 1200 rpm durante 1min. posteriormente eliminar el sobrenadante.
- 7.- Agregar 100  $\mu$ l de solución de lavado (Gene Clean Spin New Wash, cat # 1101-602) y resuspender la matriz.
- 8.- Homogenizar en el vortex, centrifugar a 1200 rpm durante 1 min. y se eliminar el sobrenadante.
- 9.- Secar el pellet durante 10 min. a temperatura ambiente.
- 10.- Agregar 30  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, homogenizar en el vortex y centrifugar a 1200 rpm durante 1min.
- 11.- Finalmente recuperar el sobrenadante (con el ADN) y guardar en congelación hasta su uso.

### C. Rutina de deshidratación de tejidos del camarón.

Horas agua	Solución	Cantidad (ml) de	
		Etanol al 95%	destilada (ml)
1	70% etanol	700	300
1	70% etanol	700	300
1	80% etanol	800	200
1	80% etanol	800	200
1	95% etanol	950	50
1	95% etanol	950	50
1	100% etanol	1000	---
1	100% etanol	1000	---
1	Xileno I	---	---
1	Xileno II	---	---
1	Parafina de 55-57°C	---	---
1	Parafina de 55-57°C	---	---

### D. Proceso de tinción Hematoxilina de Harris y Eosina. (Lightner, 1996).

PROCESO DE TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA		
CAJAS	REACTIVOS	TIEMPO (min)
1	Xileno I	5
2	Xileno II	5
3	Etanol:Xileno (1:1)	1
4	Alcohol 100%	1
5	Alcohol 100%	1
6	Alcohol 95%	1
7	Alcohol 95%	1
8	Agua corriente	10
9	Hematoxilina	1-8
10	Agua corriente	20
11	Alcohol ácido	10 sumergidas
12	Agua amoniacal	10 sumergidas
13	Agua corriente	20
14	Eosina	1-3
15	Alcohol 95%	2
16	Alcohol 95%	2
17	Alcohol 100%	3
18	Alcohol 100%	3
19	Etanol:Xileno (1:1)	1
20	Xileno I	2
21	Xileno II	2
22	Obtención de preparación permanente en resina	

### E. Protocolo DIG-High prime para marcar sondas genómicas (BoehringerMannheim GMBH) .

- 1.- Obtención del producto positivo por PRC.
- 2.- Agregar 1µg de ADN y aforar a 16 µl con agua destilada y estéril.
- 3.- Desnaturalizar el ADN a 100° C por 10 minutos.
- 4.- Incubar rápidamente en hielo durante 10 minutos.
- 5.- Incubar la reacción por un período de 20 horas a 37° C.
- 6.- Detener la reacción incubando a 65° C durante 10 minutos y almacenar a -20° C.

### F. Protocolo de cuantificación de ADN de DIG Quantification Teststrips Cat. No. 1669958 y DIG Control Teststrips Cat. 166966 (Boehringer Mannheim GMBH).

- 1.- Preparar una serie de diluciones de la sonda.
- 2.- diluir 1 µl de la sonda marcada en 39 µl de agua (concentración final aproximada de 1µg/µl) y a partir de esta, preparar las siguientes diluciones:

Dilución	Sonda/agua	Concentración final
1.- 1:3.3	10 µg/23µl	300 pg/µl (A)
2.- 1:10	5 µg/45 µl	100 pg/µl (B)
3.- Dilución de A 1:10	5 µg(A)/45 µl	30 pg/µl (C)
4.- Dilución de B 1:10	5 µg(B)/45 µl	10 pg/µl (D)
5.- Dilución de C 1:10	5 µg(C)/45µl	3 pg/µl (E)

- 3.- Cargar 1 µl de cada una de las cinco diluciones en los cuadros marcados del DIG quantification teststrip; dejar secar aproximadamente por 2 minutos y revelar en los siguientes viales:

Vial 1.- Añadir 2.0 ml de solución Bloqueadora (Amortiguador II).

Vial 2.- Adicionar 2.0 ml de la solución de anticuerpos.

Vial 3.- Adicionar 2.0 ml de Amortiguador I.

Vial 4.- Agregar 2.0 ml de Amortiguador III.

Vial 5.- Añadir 2.0 ml de la solución de detección.

- 4.- Para cuantificar, depositar en los siguientes viales el DIG quantification teststrip y DIG Control Teststrip.

Vial	Objetivo de las Soluciones	Tiempo
1	Bloqueadora	2 minutos
2	Unión de anticuerpos	3 minutos
1	Bloqueadora	1 minuto
3	Lavado	1 minuto
4	Equilibración	1 minuto
5	Detección	5-30 minutos en la oscuridad

- 5.- Para la reacción de coloración después de 30 minutos máximo con un lavado de agua destilada.
- 6.- Realizar la comparación por color del DIG quantification teststrip y DIG Control Teststrip del ADN marcado para cada  $\mu\text{l}$  de sonda, analizar cuales coinciden en la intensidad de coloración, multiplicar por el factor que le corresponda al DIG quantification teststrip.

### G. Procedimiento de Hibridación *in situ*.

- 1.- Desparafinar los tejidos, colocando las laminillas en el horno a  $60^{\circ}\text{C}$  durante una hora.
- 3.- Rehidratar el tejido de acuerdo a los siguientes pasos:

<b>Xileno</b>	2x	5 min.
<b>Alcohol absoluto</b>	2x	1 min.
<b>Alcohol al 95%</b>	2x	2 min.
<b>Alcohol al 80%</b>	2x	2min.
<b>Alcohol al 50%</b>	1x	2 min.
<b>Agua destilada</b>	6 enjuagada	No dejar secar las laminillas
<b>TNE X</b>	1x	5 min.

- 4.- Preparar de proteinasa K (PK),  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$  en TNE 1x. Colocar un mililitro de la solución de proteinasa sobre el tejido e incubar en una cámara húmeda, durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- 5.- Adicionar 1 ml de Formaldehído al 4% (frío) en cada portaobjetos, por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 6.- Lavar los portaobjetos con 1 ml de SSC 2X durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Adicionar al tejido  $500\ \mu\text{l}$  de amortiguador de hibridación e incubar en la cámara húmeda 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- 8.- Justo antes de utilizar, poner a hervir la sonda marcada con DIG ( $40\text{ng}/\text{ml}$ ) durante 10 min. Inmediatamente después colocarla en hielo.
- 9.- Diluir la sonda ( $40\text{ng}/\text{ml}$ ) en la solución de hibridación y colocar  $500\ \mu\text{l}$  de la solución sobre el tejido ( $0.25\ \mu\text{l}$  por cada laminilla).
- 10.- Adicionar al tejido,  $500\ \text{ml}$  de la solución anterior, y colocar los portaobjetos en un baño maría hirviendo, durante 6 minutos (la temperatura del portaobjetos debe ser de  $95^{\circ}\text{C}$ . Inmediatamente después, colocar las laminillas sobre hielo durante 5 min.
- 11.- Incubar los portaobjetos durante 16 horas a  $42^{\circ}\text{C}$ , en la cámara húmeda.
- 12.- Lavar los porta-objetos con  $500\ \mu\text{l}$  de cada uno de los siguientes amortiguadores a TA.

<b>SSC 2X</b>	5 min.	2 veces
<b>SSC 1X</b>	5 min.	2 veces
<b>SSC 0.5X</b>	5 min.	2 veces
<b>SSC 0.1X</b>	5 min.	2 veces
<b>Buffer I, 1X</b>	5 min.	1 vez

- 13.- Preparar un mililitro de amortiguador II (amortiguador de bloqueo) por cada portaobjetos. Enfriar la solución de bloqueo a temperatura ambiente antes de utilizarla. Agregar a cada portaobjetos 500 µl de la solución de bloqueo sobre el tejido, e incubar a 37° C por 15 minutos.
- 14.- Hacer una dilución fresca (1:1000) del anti-DIG fosfatasa alcalina en el amortiguador II (0.25 µl de anti-DIG-FA/500µl de amortiguador II). Colocar en cada portaobjetos 500µl del anti-DIG-FA diluido e incubar de 30-45 minutos a 37° C en una cámara húmeda.
- 15.- Lavar las laminillas con amortiguador I por 5 minutos a TA, dos veces
- 16.-Equilibrar los portaobjetos en amortiguador III, durante 5 minutos a TA, dos veces.
- 17.- Preparar la solución de desarrollo antes de iniciar este paso (10 µl de NTB/BCIP por cada 500 ml de solución de desarrollo. Utilizar 500ml de la solución de desarrollo por cada portaobjetos e incubar a TA en la cámara húmeda, en la oscuridad, de dos a 3 horas hasta toda la noche. Monitorear la reacción en el control positivo desde la primera hora de incubación por medio de objetivo de 10X, observar precipitado oscuro sobre tejidos adecuados. (Parar la reacción cuando sea óptima en el control positivo. Un tinte azulado sobre todo el tejido es señal de sobre desarrollo).
- 18.-. Realizar un lavado con el amortiguador IV por 15 minutos a TA (realizar hasta que se elimine todo el precipitado).
- 19.- Enjuagar con agua destilada.
- 20.- Contrateñir y deshidratar los tejidos a TA, de acuerdo a los siguientes pasos:

<b>Café de Bismarck Y</b>	3 min.	1 vez
<b>Agua deionizada</b>	1 min.	1 vez
<b>Etanol 80%</b>	1 min.	2 veces
<b>Alcohol 95%</b>	1 min.	2 veces
<b>Alcohol absoluto</b>	1 min.	2 veces
<b>Xileno</b>	5 min.	2 veces

- 21.- Montar las laminillas con cubreobjetos y entellan, y dejar secar.
- 22.- Realizar las observaciones, bajo campo de luz brillante.