



UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

“DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL WSSV
DE CAMARONES PREJUVENILES *Penaeus vannamei*
MEDIANTE β -1-3-GLUCANO Y/O PREEXPUESTOS AL
VIRUS DURANTE CAÍDAS DE TEMPERATURA.”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

Y AISI YOMARA DE LA CRUZ GONZÁLEZ

LA LIBERTAD – ECUADOR

2006

UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

“DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL WSSV
DE CAMARONES PREJUVENILES *Penaeus vannamei*
MEDIANTE β -1-3-GLUCANO Y/O PREEXPUESTOS AL
VIRUS DURANTE CAÍDAS DE TEMPERATURA”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

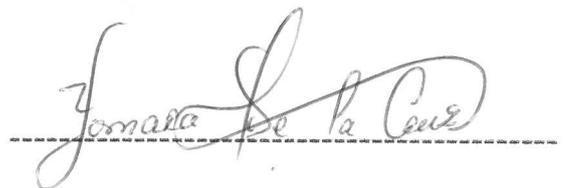
YAISÍ YOMARA DE LA CRUZ GONZÁLEZ

LA LIBERTAD – ECUADOR

2006

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad para los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente y el patrimonio intelectual de la misma, al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM y a la Universidad Estatal Península de Santa Elena, UPSE.

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style, positioned above a horizontal dashed line. The signature appears to read 'Yomara De la Cruz'.

Yaisi Yomara De la Cruz González

C.I.: 091725473-2

DEDICATORIA

Dedico esta Tesis, fruto de mi esfuerzo y sacrificios con todo cariño, amor filial y gratitud para los seres que más quiero en esta vida, mis padres. Sr. Carlos De la Cruz Clemente y Sra. Carmen González Gil que con amor me guiaron por el sendero de la superación

A Dios por permitirme cristalizar mi anhelo.

Este título, es solamente uno de los tantos peldaños que en la vida estudiantil se presentan. Solo la constancia hace que lleguemos a la meta anhelada.

Os agradezco padres, vuestro gran amor y apoyo recibido en todo instante, en el cual ha dado su fruto esperado, DIOS mediante haber cumplido mi anhelo; SER BIÓLOGO MARINO DE ESTA PRESTIGIOSA INSTITUCIÓN.

Yomara

AGRADECIMIENTO

El agradecimiento infinito a Dios, ser supremo que siempre me da luz y valentía para culminar mis metas, por ayudarme a culminar ésta etapa de mi vida.

A mis padres Carlos De la Cruz Clemente y Carmen González Gil por haberme inculcado siempre en mí los deseos de superación y porque siempre han estado junto a mí para ayudarme a seguir adelante y quienes con su amor y confianza pusieron ésta obra en mis manos.

A mis hermanos Janina y Carlos, por estar siempre presentes y porque siempre confiaron en mi capacidad.

A Fernando, por su paciencia, amor y comprensión que me ha brindado al entender que éste paso era muy importante para mí.

A las autoridades y personal Académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena UPSE, Rector Ab. Xavier Tómalá M., Vice-rector Académico Ec. George Clemente, al Decano de la Facultad Ciencias del Mar Ing Gonzalo Tamayo y personal de la UPSE por liderar el proceso de formación profesional.

El autor agradece a la institución que permitió hacer posible la presente tesis Fundación CENAIM-ESPOL por la coordinación, financiamiento brindado y por el uso de las instalaciones y laboratorios de análisis. A su Director Dr. Jorge Calderón por incentivar a la investigación y hacer mérito al esfuerzo y dedicación.

Al Biólogo Galo Valarezo, Tutor de tesis asignado de la Facultad de Ciencias del Mar. porque con sus ideas profesionales orientó nuestro trabajo.

Mis sinceros agradecimiento a Jenny Rodríguez PH. D, Tutor de tesis del CENAIM por la confianza depositada en mí persona cuando aceptó dirigirme para la realización de ésta tesis, quien me ofreció su experiencia y talento, por darme la oportunidad de conocer y explorar el apasionante campo de la inmunología, gracias por transmitirme su paciencia, comprensión y espíritu de investigador. Su guía fue acertada y oportuna siempre. Digno ejemplo como investigadora. Muchas gracias por su ayuda en la redacción de este documento.

A Enrique Blacio Ms. C. coordinador de asuntos estudiantiles en CENAIM, por ayudarnos en todo momento que necesitamos de él.

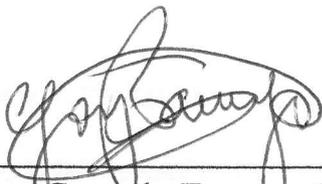
Así mismo se hace extensivo el agradecimiento a las personas que colaboraron con ideas, trabajos científicos, sugerencias y correcciones a los escritos de ésta tesis, entre ellos a la Blga. Irma Betancourt por los análisis de PCR de las muestras, al Blgo.

Fabricio Echeverría por su ayuda en los análisis estadísticos, a José Melena Ph. D. por su ayuda desinteresada, consejos y opiniones, a Tlga. Fanny Panchana por su ayuda en los análisis de histología.

A mis compañeros de pre-grado Jorge, Maritza, Yessenia, Martha, Francisco, Marcelo, José Luís y Alfonso, por hacer la vida más agradable en el CENAIM, por su continuo aporte y sentido de lealtad incondicional, todos ustedes pasaron a formar parte de mi familia.

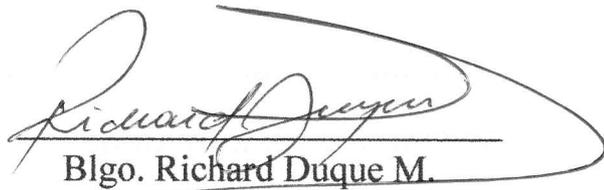
Por último, a todo el personal del CENAIM que de una forma u otra colaboraron y compartieron conmigo durante la realización de ésta tesis, muchas gracias y hasta siempre.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



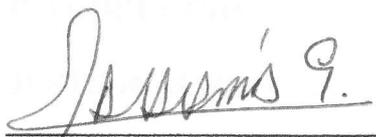
Ing. Gonzalo Tamayo C.

Decano de Facultad
Ciencias del Mar



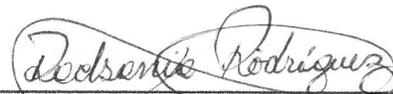
Blgo. Richard Duque M.

Director de Escuela de
Biología Marina



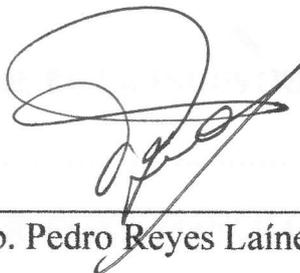
Blga. Erika A. Salavarría.

Tutor de Tesis



Blga. Dadsania Rodríguez M.

Profesor de Área



Ab. Pedro Reyes Láinez

Secretario General-Procurador

ÍNDICE GENERAL

	Págs.
ÍNDICE GENERAL	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XIV
ÍNDICE DE TABLAS	XVI
GLOSARIO	XVII
ABREVIATURAS	XXVI
RESUMEN	XXIX
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
HIPÓTESIS	6
1. INCIDENCIA DE LOS VIRUS EN LA INDUSTRIA DEL	
 CAMARÓN.....	7
1.1. EL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA (WSSV: WHITE	
SPOT SYNDROME VIRUS)	12
1.1.1. Generalidades sobre el WSSV	12
1.1.2. Signos Clínicos	15
1.1.3. Vías de transmisión y propagación del virus	16

1.1.4. Técnicas de detección del virus de WSSV	17
1.1.4.1. Observación de Signos Externos	17
1.1.4.2. Tinción Rápida de Branquias	17
1.1.4.3. Histología	18
1.1.4.4. Reacción de polimerización en cadena (PCR)	18
1.2. SISTEMA INMUNE	19
1.2.1. Respuesta Inmune de los Crustáceos	20
1.2.2. Inmunoestimulantes	26
1.2.3. Inmunoestimulación	28
1.3. TIPOS DE CULTIVO DE CAMARÓN	32
1.3.1. Cultivo Extensivo	34
1.3.2. Cultivo Semi-extensivo	35
1.3.3. Cultivo intensivo	37
1.4. INVERNADEROS, UNA ALTERNATIVA DE INTENSIFICACIÓN	38
2. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL WSSV DE CAMARONES PREJUVENILES <i>Penaeus vannamei</i> MEDIANTE β -1,3-GLUCANO Y PREEXPUESTOS AL VIRUS DURANTE CAÍDAS DE TEMPERATURAS	44

2.1. BIOENSAYO I. EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS CAMARONES PREJUVENILES <i>Penaeus vannamei</i> CULTIVADOS EN INVERNADEROS ANTE CAÍDAS DE TEMPERATURAS	44
2.1.1. Diseño Experimental	45
2.1.2. Manejo del Experimento	45
2.1.3. Técnicas para la detección del virus de la Mancha Blanca (WSSV) ..	
.....	48
2.1.3.1. PCR	48
2.1.3.1.1. Extracción de ADN genómico por CTAB	49
2.1.3.2. Histología	49
2.1.3.2.1. Fijación o Preservación	49
2.1.3.2.2. Deshidratación, desparafinado y Tinción	51
2.1.4. Análisis Histológico	52
2.2. BIOENSAYO II. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS INMUNOESTIMULANTES Y/O LA PREEXPOSICIÓN CON ANTÍGENOS VIRALES SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE POSTLARVAS <i>P. vannamei</i> DESAFIADOS A WSSV	53
2.2.1. Diseño Experimental	53
2.2.2. Manejo del Experimento	54
2.2.2.1. Preparación de WSSV Inactivada	54
2.2.2.2. Preparación de WSSV Activo	55
2.2.2.2.1. Preparación del Inóculo Viral	55

2.2.2.2.2. Pruebas de infecciones	55
2.2.3. Exposición al WSSV Activo	56
2.2.4. Inmunestimulación	57
2.2.4.1. Dietas	57
2.2.5. Desafío con el WSSV y evaluación de la supervivencia	57
2.2.5.1. Primer bioensayo	58
2.2.5.1.1. Diseño experimental	58
2.2.5.1.2. Manejo del Experimento	59
2.2.5.2. Segundo Bioensayo	60
2.2.5.2.1. Diseño experimental	60
2.2.5.2.2. Manejo del Experimento	60
3. EFECTOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL WSSV DE CAMARONES PREJUVENILES <i>Penaeus vannamei</i> MEDIANTE β-1,3- GLUCANO Y PREEXPUESTOS AL VIRUS DURANTE CAÍDAS DE TEMPERATURAS	62
3.1. ENSAYO I	62
3.1.1. Condiciones del Medio	62
3.1.2. Análisis de la Supervivencia	62
3.1.3. Prevalencia Inicial y Final de la Población de Estudio	63
3.1.4. Índice Histológico de WSD	63
3.1.5. Análisis Microbiológico	68

3.1.6. Análisis de Pesos Finales	68
3.2. ENSAYO II.	69
3.2.1. Análisis de la Supervivencia	69
3.2.1.1. SPF vs WSSV Inactivo	69
3.2.1.2. SPF + Glucano vs WSSV Inactivo + Glucano	70
3.2.2. Análisis histopatológico en la población infectada por WSSV	71
3.2.3. Signos externos en la población infectada por WSSV	73

CONCLUSIONES

DISCUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pag.
Figura 1.	Enfermedades infecciosas presentes durante anomalías térmicas negativas en el mar 10
Figura 2.	Principales provincias productoras de camarón en el Ecuador 11
Figura 3.	Agente Causante del Virus de la Mancha Blanca 14
Figura 4.	Signos Externos Típicos de camarón infectado con WSSV 16
Figura 5.	Ciclo de Producción del Camarón en Acuicultura 33
Figura 6.	Invernaderos de cultivos de camarón 42
Figura 7.	Unidades Experimentales provistas de sistema de Diseño Air- lift 46
Figura 8.	Calentadores de barra 47
Figura 9.	Histología: Proceso de Fijación y preservación del camarón 50
Figura 10.	Recipientes de vidrio de 4 L. (unidades experimentales) 58
Figura 11.	Microfotografías de órganos y tejidos del camarón <i>L. vannamei</i> de coloración Rosados 64

Figura 12.	Microfotografías de órganos y tejidos del camarón <i>L. vannamei</i> de coloración Azul	65
Figura 13.	Indice Histológico de WSD de animales Rosados y Azules del tratamiento de temperatura 33 °C	66
Figura 14.	Microfotografía de Epitelio cuticular del estómago del camarón <i>L. vannamei</i> , barra 30 µm	67
Figura 15.	Promedio de pesos de animales de los 3 tratamientos luego de 21 días de cultivo y peso inicial	68
Figura 16.	Curva de supervivencia de post-larvas de <i>L. Vannamei</i> de 2 tratamientos (SPF y WSSV Inactivo) infectados con WSSV	70
Figura 17.	Curva de supervivencia en post-larvas de <i>L. Vannamei</i> infectadas con WSSV de 2 tratamientos (SPF vs WSSV Inactivo e inmunoestimulados con β-1,3-glucano)	71
Figura 18.	Indice Histológico WSSV de animales sobrevivientes de 6 tratamientos luego de ser infectados experimentalmente. Cada punto es un promedio de 5 camarones	72

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Tabla # 1	Criadero de camarón 8
Tabla # 2	Comparación de los tres principales tipos de producción de camarón de cultivo 34
Tabla # 3	Diseño completamente aleatorio del Bioensayo I 45
Tabla # 4	Proceso de deshidratación de muestras para histología 51
Tabla # 5	Proceso de desparafinado de muestras para histología 51
Tabla # 6	Proceso de tinción de placas con Hematoxilina y Eosina 52
Tabla # 7	Tabla de niveles de lesiones de manchas blancas 52
Tabla # 8	Tratamientos utilizados en el presente estudio Bioensayo II 54
Tabla # 9	Lesiones de tejidos y porcentajes de camarones positivos para WSSV en la población de estudio (Rosados y Azules a 33 °C) 67
Tabla # 10	Resultados de los análisis microbiológicos a los animales de coloración rosados 68
Tabla # 11	Porcentajes de tejidos y animales positivos para WSSV en los diferentes tratamientos 73

GLOSARIO

Agentes Biológicos: Organismos vivos que causan enfermedad o la muerte en humanos.

ADN: Ácido Dexosirribonucleico: Un ácido nucleico compuesto de dos cadenas polinucleotídicas que se disponen alrededor de un eje central formando una doble hélice, capaz de autorreplicarse y codificar la síntesis de ARN. Soporte físico de la herencia en el 99 % de las especies. La molécula bicatenaria está formada por dos cadenas antiparalelas y complementarias entre sí. Formada por nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina. Excepto en los retrovirus que tienen ARN, el ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células y para la replicación de la propia molécula de ADN. Representa la copia de seguridad o depósito de la información genética primaria, que en las células eucariotas está codificada en la caja fuerte del núcleo.

Antibiótico: (del griego = contra; bios = vida) literalmente destructor de la vida. Término que comprende todas las sustancias antimicrobianas independientes de su origen, ya sean derivadas de microorganismos (bacterias, mohos, hongos) de productos químicos sintéticos o de ingeniería genética.

Antígeno (del griego anti = contra; genos = origen): Moléculas, generalmente extrañas al organismo receptor, que inician la producción de anticuerpos, generalmente son proteínas o combinaciones de proteínas con polisacáridos.

Apoptosis: Muerte celular programada, suicidio celular. Cuando ello ocurre la célula se encoge y desprende de sus vecinas. En su superficie aparecen burbujas (la célula parece hervir) y la cromatina se condensa formando una o varias manchas cerca de la membrana nuclear. Poco después se fragmenta en numerosos cuerpos apoptóticos que engloban fracciones de las células siendo finalmente fagocitados.

Bacterias: Término genérico que cubre el conjunto de los micro-organismos unicelulares con núcleo desprovisto de membrana, con cromosoma único, generalmente con una pared exterior y capaces de multiplicarse por escisión. Microorganismo unicelular procariota. Son los seres más primitivos y resistentes que habitan la Tierra. Ocupan todos los hábitats conocidos, desde los hielos de la Antártica hasta las profundidades de los océanos. Especies vivientes caracterizadas por ser unicelulares y producir cambios en su estructura, capaces de ser cultivadas y reproducidas por un elemento orgánico no vivo.

Cambio Climático: Es el resultado de los cambios que se están generando en nuestro planeta debido a la acumulación en la atmósfera de gases causantes del efecto invernadero. Todo esto trae aparejado consecuencia muy graves como: el incremento

de las temperaturas, derretimiento de los hielos, incremento del nivel del mar, desertificación, pérdida de la diversidad biológica, etc. Todo esto dará lugar a mas hambre y miseria para la humanidad.

Cutícula (del latín cutícula diminutivo de cutis = piel): Capa de material graso: cutina, que se encuentra extremadamente a la pared de las células epidérmicas.

Doble Hélice: La forma que toman las dos hebras de ADN cuando se encuentran unidas.

Especie Introducida: Es la que se introduce en un hábitat que no es el de origen.

Especificidad: Propiedad de los participantes en la respuesta inmune (antígeno, anticuerpo o células sensibilizadas) de combinarse en forma selectiva con el reactante correspondiente.

Exoesqueleto: Estructura que se encuentra por fuera del cuerpo de los organismos, que les sirve como protección y sostén.

Factores Abióticos: Son los factores físicos y químicos del ambiente que actúan sobre los seres vivos. Entre los más relevantes se encuentran temperatura, humedad, luz, presión hidrostática, pH del agua, salinidad.

Hábitat: Espacio o área ecológicamente homogéneas caracterizado por un sustrato materia (suelo, agua, etc) que constituyen el soporte físico para que viva una biocenosis. Sinónimo de biotopo.

Hospedero o Huésped: Organismos que representa la fuente de alimento, abrigo u otras ventajas para un organismo de otra especie. Puede ser positivo (favorable) o negativo.

Indicadores Ecológicos: Se refiere a ciertas especies, que debido a sus características pueden tomarse como indicio sobre las condiciones ambientales de una zona determinada.

Infección: Irrupción en un organismo vivo de un agente extraño microscópico (microbio, virus, hongo) capaz de multiplicarse o de secretar toxinas.

Inmunidad: Capacidad de resistir, protegerse o inmunizarse frente a agentes infecciosos. La inmunidad se debe a sistemas defensivos propios de los organismos: Barrera de la piel, tubos digestivos asépticos y el específico sistema inmunológico basándose en células y la actividad química de los anticuerpos. Tal resistencia puede ser innata o adquirida.

Inmunología: Rama de la biología que estudia los fenómenos inherentes a la humanidad y, de una forma general, todos los procesos que tienen relación con la antigeneidad y con la elaboración de los anticuerpos.

Inmunológico: Relativo a los mecanismos que los organismos vivos poseen para defenderse de las enfermedades infecciosas.

In situ: Término en latín que significa en el lugar. Acciones que se llevan adelante en el lugar de interés.

Invernadero: Sitio creado para alojar a las plantas, con el fin de cuidarlas de las acciones climáticas y mantenerlas en condiciones que ayuden a mejorar su crecimiento.

Invertebrado: Animal sin huesos en la espalda, sin columna vertebral. Va desde los protozoos hasta los insectos, gusanos, caracoles y ostras.

In Vitro: Locución latina que se aplica a todo fenómeno observado fuera del organismo y en particular, en laboratorio.

Larva: Fase de desarrollo de numerosos animales (batracios, insectos, crustáceos, etc). Ejemplo: fase intermedia de desarrollo de los insectos, entre el momento que

salen del huevo y su transformación en crisálida, que se diferencian del estado adulto por su forma o modo de vivir. Pueden tener su hábitat en el suelo, en el agua, adheridos a vegetales o animales en forma parásita o no. Otros animales que pasan por transformaciones larvales son: Las Anguilas, la langosta, el camarón, etc.

Letal: Se refiere a factores del ambiente, caracterizados por ocasionar la muerte del organismo. O sea es fatal para su portador.

Letargo: Estado que consiste en la supresión durante un largo período de las funciones vitales y del uso de los sentidos.

Micra: Unidad de longitud para seres microscópicos correspondiente a la milésima parte del milímetro.

Microbiología: Disciplina médica que estudia los microbios y que agrupa la bacteriología, la virología, la micología y la parasitología.

Microhábitat: Un área restringida especializada, donde prevalecen condiciones diferentes del ambiente general.

Microorganismos: Término que se aplica a los innumerables organismos animales y vegetales minúsculos que, por regla general, sólo son visibles con el auxilio de un

microscopio. Incluyen bacterias, ciertos hongos y algas, así como foraminíferos, diatomeas y todos los minúsculos organismos flotantes que constituyen la vegetación flotante marina.

Patógeno: Agente que genera una enfermedad.

Patológico: Término utilizado para los residuos provenientes de servicios de salud, veterinarias o laboratorios de análisis clínicos, compuestos de guantes, gasas, algodones, agujas hipodérmicas, restos de intervenciones quirúrgicas. Estos residuos tienen alta peligrosidad.

Péptido: Polímero o cadena de aminoácidos.

pH: Valor numérico que describe la intensidad de ácido o base (alcalina) de una solución. Técnicamente, pH es un logaritmo recíproco (negativo) de la concentración de iones en el hidrógeno (actividad hidrógeno ión) en moles por litro.

Población: Número de individuos (plantas y animales) con características similares, que viven en un área dada y por un tiempo determinado.

RCP: 1) (PCR, de las iniciales en inglés Polimerase Chain Reaction): Método de amplificación de una secuencia de bases del ADN, ideado por Mullis, usando una

polimerasa termoestable y dos cebadores (“primers”) de 20 bases de largo de la secuencia a ser amplificada, uno complementario de las secuencias final de la hebra (+) y otro de la otra secuencia final de la hebra (-). En razón que las nuevas cadenas de ADN sintetizadas pueden subsecuentemente servir de moldes adicionales para la misma secuencia de cebadores, sucesivos “ciclos” de anillado de cebadores, alargamiento de la cadena y disociación del ADN bicatenario formado, producen rápidamente grandes cantidades de la secuencia original (amplificación). La PCR puede utilizarse para detectar una secuencia definida en una muestra de ADN. 2) Reacción en cadena de polimerasa: técnica de análisis del genoma mediante la amplificación ilimitada de porciones específicas del ADN, aunque sean minúsculas. Es un método revolucionario de amplificación exponencial del ADN por la intervención de una enzima termoestable, la Taq polimerasa, inventado por el americano Kary Mullis en 1985 por lo que se le concedió en 1993 el premio Nóbel. Es el proceso fundamental para la secuenciación del Proyecto Genoma Humano.

Salinidad: Es una medida de la cantidad de sal en el agua o en el suelo. Se representa en partes por millón.

Vacuna: Antígeno procedente de uno o varios organismos patógenos que se administra para introducir la inmunidad activa, protegiendo contra la infección de dichos organismos. Es una aplicación práctica de la inmunidad adquirida.

Viri6n: Unidad estructural de los virus. Consta fundamentalmente de dos estructuras imprescindibles: un 6cido nucleico (ADN o ARN) y una envoltura proteica (c6pside). A estas estructuras b6sicas se a6ade en algunos casos una envoltura lip6dica (peplos) y/o esp6culas de glucoprote6na.

Virus (del lat6n virus = veneno): Agente infeccioso de naturaleza obligatoriamente intracelular para sintetizar su material gen6tico, ultramicrosc6pico y ultrafiltrable. Consta de un 6cido nucleico (ADN o ARN) y un recubrimiento proteico. Entidad no celular de muy peque6o tama6o. En estado extracelular son inertes.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIDS	Síndrome de Deficiencia Inmune Adquirida
ANOVA	Análisis de varianza
BG	Betaglucanos
BGBP	β -1,3-glucanos fijadora de Proteina
°C	Grados celsius
Ca ++	ión calcio
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
CNA	Cámara Nacional de Acuicultura
Com. per.	Comunicación personal
CTAB	cetyl-trimetyl-ammonium bromide
d	días
g	gramo
h	Horas
Ha	Hectáreas
HP	Hepatopáncreas
ICENV	Virus Infeccioso Cuticular Epitelial (siglas en inglés)
ICTV	Comisión Internacional sobre Taxonomía de Virus (Siglas en inglés)

IHHNV	Virus de la Necrosis Hipodérmica Hematopoyética Infecciosa (infectious hypodermic and haematopoyetic necrosis virus) siglas en inglés.
Ind	Individuos
kg	Kilogramos
LPS	Lipopolisacáridos
L	litros
m	Metros
mg	miligramos
ml	mililitros
NaCl	Cloruro de Sodio
ng	nanogramo
NOB	Non-occluded baculovirus
PBS	Támpón fosfato salino sin Ca^{++} y Mg^{++}
PBS 1X	Támpón fosfato salino con Ca^{++} y Mg^{++} , dilución 1/10
PCR	Reacción de polimerización en cadena (siglas en inglés)
PG	Peptidoglucanos
PH	Potencial de Hidrógeno
p.i	Post-infección
P-K	Picknosis-Karriorrhesis
PL	Post larvas
PO	Fenoloxidasa

proPO	Sistema profenoloxidasa
O ₂ ⁻	Anión superóxido
SPF	Camarones libres de patógenos (siglas en ingles)
SPR	Resistentes a Patógenos específicos (siglas en ingles)
TM	toneladas métricas
TSV	Virus del síndrome de Taura (siglas en ingles)
µm	micras
µl	microlitro
ups	unidades prácticas de salinidad
U.V.	ultravioleta
WSD	Enfermedad de la mancha blanca (siglas en ingles)
WSSBV	white spot syndrome baculovirus
WSSV	Virus del síndrome de la mancha blanca (por sus siglas en ingles)
v/v	volúmen /volúmen

RESUMEN

Este trabajo se enfocó en establecer la supervivencia de los camarones prejuveniles *P. vannamei* cultivados en invernaderos y sometidos a temperaturas de mayor susceptibilidad al patógeno y en comprobar el efecto de los inmunoestimulantes y/o la preexposición con antígenos virales sobre la supervivencia de postlarvas *P. vannamei* desafiados al WSSV a temperatura alta. Para esto, se realizó dos experimentos: El primero consistió en utilizar camarones provenientes de invernaderos y bajar la temperatura (33, 28 y 24 °C), el experimento duró 21 días y se tomó varias muestras durante el experimento para análisis de histología para confirmar el estado de salud del camarón por tratamiento, hasta el final donde encontramos animales de dos tipos de coloración, rosados y azules. Los resultados nos muestran que no existió mortalidad, en cuanto a los análisis de histología mostraron que los animales que estuvieron más infectados fueron los de coloración azul (45,45 % de animales muestreados), en tanto que el porcentaje de infección en los animales de coloración rosada fue del 36,36 %.

En el segundo experimento se utilizaron animales SPF divididas en 3 tratamientos (animales SPF, aplicación de WSSV inactivo en Zoea y Misys y aplicación de WSSV activo en PL 12), los animales de cada tratamiento fueron separados en dos lotes y un lote de cada tratamiento recibió glucanos mezclado con el alimento, dando como resultado 6 tratamientos. El desafío duró 7 días, obteniendo la supervivencia de el

55,3 y 57 % para el grupo de animales con tratamientos SPF vs WSSV Inactivo y el 27 y 32% para el grupo de los animales con tratamientos SPF + glucano y WSSV Inactivo + glucano. Se determinó diferencias en niveles de infección mediante histología. Obteniendo los resultados que los animales más infectados fueron los del tratamiento 3 (tratados con Virus Inactivo). Los del tratamiento 1 y 5 (animales SPF y animales tratados con WSSV Activo respectivamente) tuvieron similares grado de infección, seguidos por los tratamientos 2 y 4 (animales SPF tratados con glucano y animales tratados con Virus Inactivo + glucano) con similares grado de infección y finalmente los animales del tratamiento 6 (WSSV Activo + Glucano). Los animales de los tratamientos 3 y 5 mostraron infección en grado 4 con el 100 % de la población infectada. En los animales del tratamiento 6 no se encontró células infectadas por WSSV. Todos los camarones que murieron (agudos), manifestaron coloración rojiza del cuerpo y manchas blancas que fueron observadas en el interior del caparazón pero no visibles a simple vista. Los camarones también mostraron aspecto lechoso y movimientos erráticos.

INTRODUCCIÓN

El virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), es la amenaza más seria que ha afrontado la industria del cultivo de camarón en Asia (desde 1992) y América Latina desde 1999 (Flegel *et al.*, 1997; Lightner and Redman 1998b). Datos de la Cámara Nacional de Acuicultura (CNA) del Ecuador muestran que debido al WSSV, las exportaciones de camarón cayeron de 115000 toneladas métricas (TM) en 1998 a 38000 TM en 2000, recuperándose a 47000 TM en 2002 y 50000 TM en 2003 (CNA, Website).

El WSSV, tuvo su origen en Asia entre 1992 y 1993 (Inouye *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994), y actuó en forma devastadora en China, Japón y Taiwan. Posteriormente se extendió a otros países como Tailandia (Wongteerasupaya *et al.*, 1995), Corea, Indonesia, Vietnam, Malasia e India (Chou *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995). En América Latina, se detectó por primera vez en 1999 en granjas camaroneras de Honduras y Nicaragua, de donde pasó a Panamá (país eminentemente exportador de larvas de camarón para cultivo) y de ahí se difundió rápidamente por la región afectando principalmente a Ecuador, Perú, Colombia, los países centroamericanos y México. Los efectos de la mancha blanca se han hecho sentir principalmente en la zona del Pacífico sudamericano (González, D.J. 2002) (Anexo. 1).

La sustentabilidad de la industria del camarón depende en gran parte del control de enfermedades. Teóricamente, las estrategias profilácticas y de control del WSSV incluyen buenas condiciones ambientales, un stock libre de patógenos específicos (SPF) o postlarvas resistentes a patógenos específicos (SPR).

La dinámica de ocurrencia de patógenos en sistemas acuáticos está probablemente modulada por parámetros ambientales tales como salinidad y temperatura (De La Peña *et al.*, 1993; Bray *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 2000). El cultivo de camarón en particular está sujeto a cambios climáticos debido a las prácticas de cultivo que influyen en la calidad fisicoquímica del agua, estos afectan el metabolismo, el crecimiento, la muda y la supervivencia (Staples and Heales, 1991; Chen *et al.*, 1995). Por otra parte, la literatura reporta modificaciones en la respuesta inmune de crustáceos provocadas por fluctuaciones de temperatura (Chisholm and Smith 1994, Vargas-Albores *et al.*, 1998; Cheng y Chen 2000). Estas modificaciones en los parámetros inmunitarios podrían ser las responsables de las diferencias en la susceptibilidad a las enfermedades, de acuerdo a las estaciones climáticas o a las alteraciones de temperatura (Jiménez *et al.*, 2000; Durand 1997).

La intensificación del cultivo de camarón se ha basado en progresos en acuicultura con una carencia de conocimientos de la fisiología de penaeidos y a menudo con poca consideración de aspectos ecológicos. Por lo tanto, la prevención y el control de enfermedades de camarón necesitan un acercamiento integrado en el cual el

conocimiento de la inmunidad del camarón debe ser mejorado. Nuevas estrategias de control incluyendo la vacunación contra el WSSV serían sumamente deseables. Sin embargo, los invertebrados carecen de un sistema de respuesta inmune adaptativo, manifestando en su lugar una respuesta inmune innata (Kimbrell, *et al.*, 2001). Aunque considerado menos sofisticado, este sistema inmune innato es capaz de reconocer y destruir rápida y eficientemente el material no propio, incluyendo patógenos (Lee, *et al.*, 2002).

Las interacciones que el camarón tiene con su medio ambiente no son fáciles de interpretar, básicamente porque la respuesta fisiológica no solamente depende de factores externos, sino también de factores internos o fisiológicos, condiciones de salud o condiciones nutricionales, etc. En esta complejidad de factores intrínsecos y extrínsecos, las alternativas para controlar las enfermedades se han multiplicado (Vargas-Albores *et al.*, 1998). En los últimos años se ha impulsado el uso de inmunoestimulantes. Los efectos protectores de varios inmunoestimulantes han sido reportados contra infecciones de WSSV, por ejemplo, la administración oral de péptidoglucanos o lipopolisacaridos en *Penaeus japonicus* (Itami *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2000) y *Penaeus monodon* (Song *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1999). La inmunoestimulación se presenta como una alternativa ya que los crustáceos no poseen una respuesta inmune adaptativa basada en inmunoglobulinas que faciliten la vacunación (Söderhäll and Thornqvist, 1997; Lee and Söderhäll, 2002).

La presente investigación pretende determinar el efecto protector de los β -1,3-glucano y/o la preexposición con antígenos virales, sobre la supervivencia de camarones prejuveniles *Penaeus vannamei* expuestos al virus activo, a una temperatura de susceptibilidad al patógeno. Se analizó en un primer ensayo, la prevalencia para WSSV de camarones prejuveniles (aproximadamente 1-2 g) provenientes de invernadero y sometidos luego a bajas temperaturas.

JUSTIFICACIÓN

La importancia de este estudio es investigar el efecto protector de los inmunoestimulantes y/o la preexposición con antígenos virales sobre la supervivencia en camarones prejuveniles de *P. vannamei* infectados con WSSV. Se espera recomendar medidas que se podrían aplicar para el control del virus WSSV, en los cultivos bajo invernaderos.

El presente trabajo tratará de determinar el efecto de las caídas de temperatura sobre la supervivencia de animales cultivados en invernadero. Se pretende saber además si la inmunoestimulación y/o la preexposición a antígenos virales incrementa la supervivencia a desafíos con WSSV. Se espera que ésta información permita recomendar estrategias de manejo del WSSV en invernaderos y en piscinas camaroneras descubiertas.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto protector de los β -1-3-glucano y/o la preexposición con antígenos virales de WSSV, sobre la supervivencia de camarones prejuveniles *P. vannamei* expuestos al virus activo, a una temperatura de susceptibilidad al patógeno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la supervivencia de los camarones prejuveniles *P. vannamei* cultivados en invernaderos y sometidos a temperaturas de mayor susceptibilidad al patógeno.
- Comprobar el efecto de los inmunoestimulantes y/o la preexposición con antígenos virales sobre la supervivencia de postlarvas *P. vannamei* desafiados al WSSV a temperatura alta.

HIPÓTESIS

La producción de camarones en la época de verano se reduce significativamente por la disminución de la temperatura y es en ese momento, cuando en la producción se empieza a percibir mortalidades altas, podremos cultivar cuando desciende la temperatura y tener supervivencias altas en los invernaderos.

Post-larvas cultivadas e inmunoestimuladas con β -glucanos y expuestas al virus estarían mejor preparadas para enfrentar el desafío viral que las larvas no inmunoestimuladas.

1. INCIDENCIA DE LOS VIRUS EN LA INDUSTRIA DEL CAMARÓN

A nivel mundial el desarrollo de la industria camaronera ha estado sometido a un permanente estado de alerta sanitario y ha debido enfrentar un gran número de obstáculos que entran 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 debido a agentes biológicos principalmente causados por virus, bacterias, rickettsias, hongos, protistas y metazoarios (Lightner and Redman, 1998). Las no infecciosas son originadas por factores abióticos como sustancias químicas tóxicas, ambiente desfavorable, desequilibrios alimenticios o factores genéticos (Lightner, D. 1996; Lightner, D.V., *et al.*, 1997). Sin embargo los principales agentes causantes de enfermedades del camarón son virus y bacterias asociadas, las primeras con el colapso casi absoluto de esta industria en el continente asiático (Alvaréz, J.D., *et al.*, 2003; Bachere, 2000) y en el Ecuador (CNA, Website). Se conocen veinte diferentes virus que infectan a camarones peneidos. Estos son probablemente los más importantes patógenos encontrados en la industria camaronera (Lightner, 1996; Aguirre y Ascencio, 2000; Hernandez-Rodríguez *et al.*, 2001).

A finales de la década del 60 se dió inicio a la industria camaronera en el Ecuador, y con ella nació una de las industrias de mayor crecimiento y tecnificación en nuestro país. La misma ha evolucionado a través de más de tres décadas, enfrentando

problemas tales como enfermedades, falta de financiamiento, sobre oferta mundial del producto. Produciendo sin embargo, grandes beneficios para los involucrados en esta rama productiva y para el país en general como fuente generadora de divisas y empleo. A finales del año 2000 existían un total de 152.523 Ha concesionadas para la crianza de camarón y 2.036 cultivadores, entre tierras altas y de playa, como lo vemos en la Tabla No. 1. No obstante, desde la aparición del WSSV, el sector camaronero ha venido perdiendo su dinamismo, agravado por el incremento de la competencia mundial.

Tabla No. 1. Criaderos de camarón.
Hectáreas concedidas y cultivadores

AÑO	TOTALES		ESMERALDAS		MANABÍ		GUAYAS		EL ORO	
	Cultivadores	Has	Cultivadores	Has	Cultivadores	Has	Cultivadores	Has	Cultivadores	Has
1976	6	439	0	0	1	20	2	300	3	119
1980	156	14.707	1	50	28	1.772	104	10.944	23	1.941
1985	940	93.222	32	2.241	112	5.413	581	71.020	215	14.548
1990	1.780	128.071	136	4.363	347	10.716	877	90.010	420	22.982
1995	1.994	139.710	170	6.846	404	12.089	972	96.587	448	24.188
2000	2.036	152.523	180	9.949	409	12.459	998	105.482	449	24.633

Fuente: Subsecretaría de Recursos Pesqueros.
Tomado de: Marriott, F. 2003

Los impactos sobre la producción camaronera en Ecuador están gobernados por la naturaleza y fundamentalmente por eventos climáticos de gran escala (Calderón, 2005). Entre los principales hechos que han afectado negativamente al sector camaronero tenemos en primer lugar el evento del Niño, el mismo que causa destrucción en gran escala de la infraestructura de piscinas por las fuertes lluvias e inundaciones. La primera enfermedad significativa se llamó el “Síndrome de la Gaviota”, provocado por vibrios pero nombrado así por la tendencia de estas aves

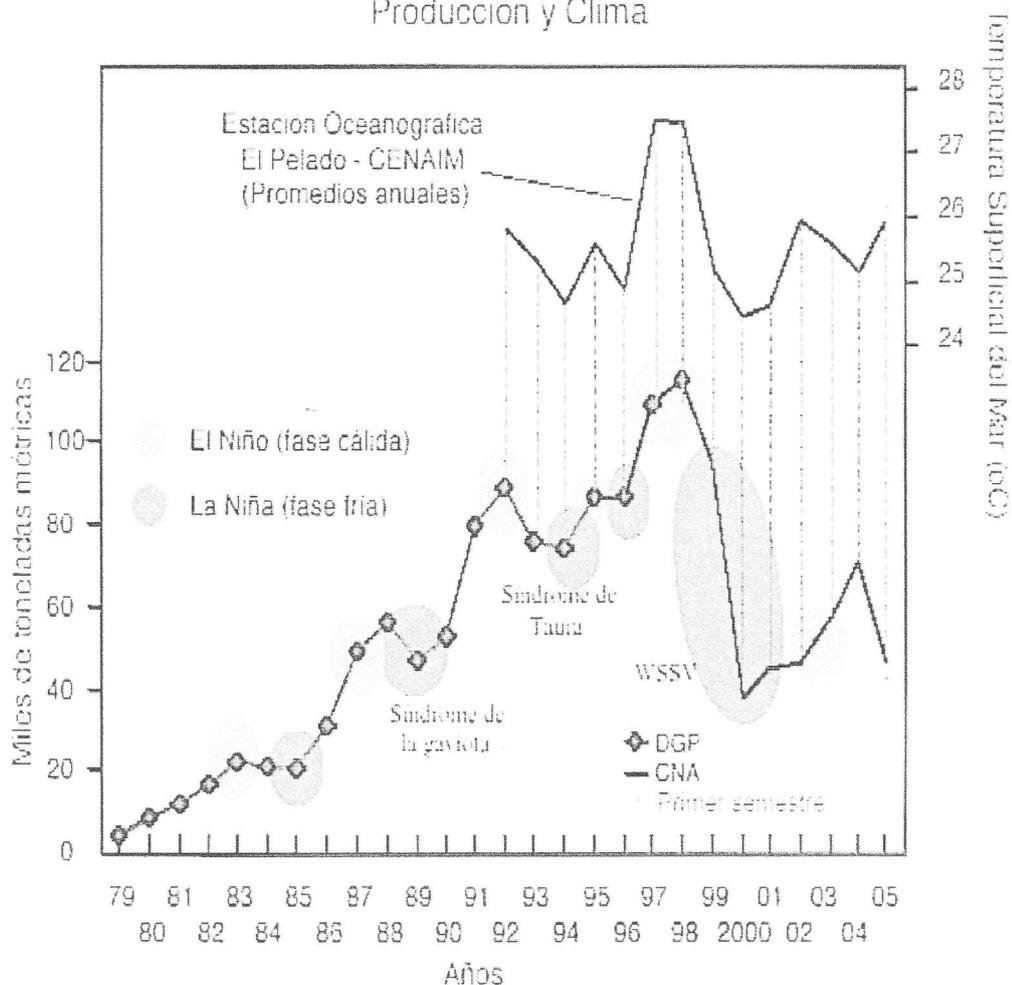
marinas de acudir en masa alrededor de las piscinas con camarones enfermos. La enfermedad atrofió el crecimiento de la industria a 4.000 TM durante un solo año en 1989 (MC Clennen, 2004).

La segunda enfermedad significativa fue el “Síndrome de Taura” (TSV); (Lotz *et al* 1997), el cual apareció a mediados del año 1991 y fue detectado en octubre de 1993 en la población de Taura, provincia del Guayas. El TSV ocasionó el cierre de 12.000 Ha de producción en 1994 y su efecto se extendió por la zona del Golfo de Guayaquil (Alday de Graindorge and Griffith 2001).

Quizás el peor embate que han debido afrontar los camaroneros hasta ahora ha sido el virus de la mancha blanca, que fué detectado por primera vez en China a mediados de 1993, y que se extendió a Japón y a toda Asia, excepto Filipinas que cerró sus fronteras y evitó la entrada de larvas y camarones infectados, ocasionando elevados índices de mortalidad.

Estas tres grandes enfermedades infecciosas mencionadas anteriormente se presentaron durante anomalías térmicas negativas en el mar, evento la Niña, subrayando el efecto de la temperatura sobre la susceptibilidad del camarón a las enfermedades (CENAIM, Website) (Fig. 1).

Producción y Clima



Fuente de datos.

Elaboración. Chavarría J. y B. Bayot

CENAIM Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas

DGP Dirección General de Pesca

CNA Cámara Nacional de Acuicultura (www.cna-ecuador.com)

Exportaciones de camarón, durante el periodo 1979 - 2005, en toneladas métricas (datos originales en libras) y su relación con las manifestaciones locales de las distintas fases de ENSO. Los datos de producción previos a 1994 han sido ajustados por los autores a la curva de datos de exportación reportados por la CNA.

Figura 1: Enfermedades Infecciosas presentes durante anomalías térmicas negativas en el mar.

El WSSV apareció en Ecuador a fines de mayo de 1999 y se extendió a las cuatro principales provincias productoras las cuales son: Esmeraldas, Manabí, Guayas y El Oro (Fig. 2) (Calderón et al., 1999, Calderón et al., 2000), generando una catástrofe en la industria camaronera ecuatoriana.

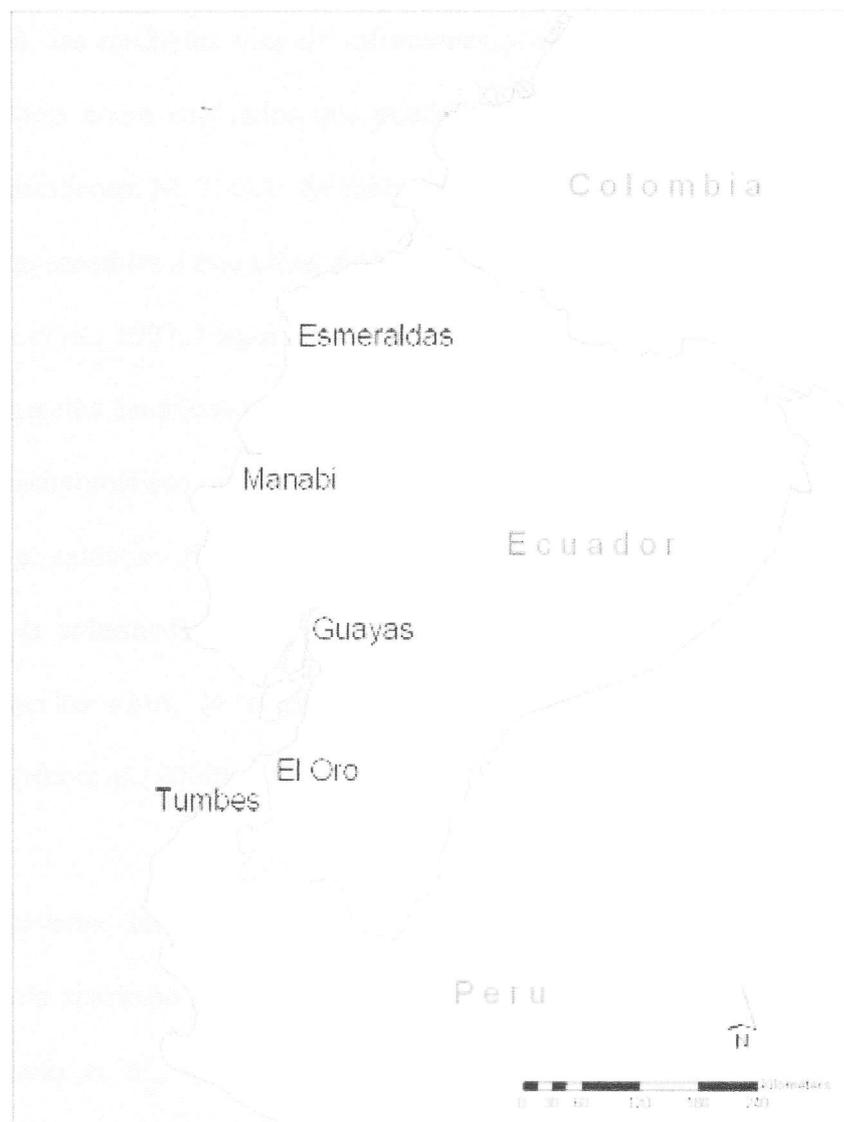


Figura 2: Principales provincias productoras de Camarón en el Ecuador.
Fuente: Calderón et al., 1999

1.1. EL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA (WSSV: WHITE SPOT SYNDROME VIRUS)

1.1.1. Generalidades sobre el WSSV

Sin duda una de las características más importantes del WSSV es su gran poder de propagación, las múltiples vías de infecciones y el amplio espectro de huéspedes, tanto silvestres como cultivados que pueden actuar como reservorios y/o vectores (FIDE Montesdeoca, M. 2002). Se sabe que no sólo todas las especies cultivadas de peneidos son sensibles a este virus, sino además cangrejos, cangrejos de río (Lo *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Flegel *et al.*, 1997) y otros crustáceos, incluso copépodos y larvas de insectos acuáticos pueden ser infectados. El mayor riesgo lo presentan los portadores asintomáticos que tienen fácil acceso al estanque, como los cangrejos o las especies de camarón planctónico, que van liberando partículas víricas o que transmiten la enfermedad al ser ingeridos (Alday, V. 1999). Esta condición poco común para los virus, lo convierten en un virus altamente peligroso para los crustáceos (Shi *et al.*, 2000).

En casos severos, las mortalidades puede alcanzar 100 % entre los 3 y 10 días después de la aparición de los primeros síntomas (Wang *et al.*, 1999; Mohan *et al.*, 1998; Nakano *et al.*, 1994). El WSSV puede experimentalmente ingresar en camarones por tres vías, inyección, inmersión de líquido homogenizante filtrado de

camarón enfermo (Chou, H. Y, *et al* 1995; Chang, C, F., *et al* 1999), e ingestión (Soto y Lotz, 2001).

El agente causante de la mancha blanca es un virus de doble cadena de ADN (Wang *et al.*, 1995) (Fig. 3). Varias investigaciones lo denominan como baculovirus del síndrome de la mancha blanca “white spot syndrome baculovirus” (WSSBV) (Lo *et al.*, 1997), quienes clasificaron en un principio al virus del WSSV en el género Baculovirus no ocluido “Non-occluded baculovirus” (NOB), de la subfamilia Nudibaculovirinae y de la familia Baculoviridae (Inouye *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1995), siendo esto aceptado en el quinto reporte de la Comisión Internacional sobre Taxonomía de Virus “International Committee on the Taxonomy of Virus” (ICTV) (Francki *et al.*, 1991; Lo *et al.*, 1997). Sin embargo en el sexto reporte de la ICTV, la pertenencia a la subfamilia Nudibaculovirinae y al género NOB fueron omitidos (Lo *et al.*, 1997), ya que el WSSV no tiene suficientes características en común con el resto de los baculovirus. Estudios a nivel molecular han demostrado que el WSSV pertenece a un nuevo grupo diferente a todos los virus conocidos y ha quedado clasificado como virus “no clasificado” (Alday, 1999). Estudios realizados de tres proteínas estructurales del virus demuestran que estas distan de ser homólogas a las proteínas estructurales de otros virus. Esta característica única ayuda a sustentar la idea de que WSSV puede representar un nuevo género de virus (Whispovirus) o quizás una nueva familia (*Whispoviridae*) (Van Hulten *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2000). Observaciones al microscopio electrónico de secciones de tejido infectado y

suspensiones virales del WSSV revelan su forma de varilla, una envoltura y un gran número de viriones no ocluidos (Durand *et al.*, 1997a). Los viriones completos tienen un promedio de 83 nm de diámetro y 275 nm de longitud, no se encuentra cuerpos de oclusión dejados por virus en las células que han infectado.

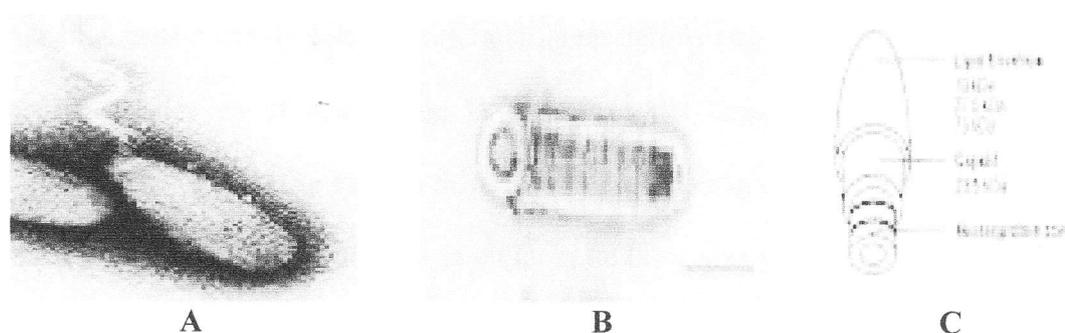


Figura 3: (A) Agente Causante del Virus de la Mancha Blanca, (B) 350 nm de longitud, (C) Estructura.

Fuente: Aqua In Tech Inc.

Además de su alta virulencia, el WSSV se caracteriza por ser poco específico en cuanto a su capacidad de invadir y afectar tejidos (Chang *et al.*, 1996). Mediante técnicas de histopatología, se han encontrado evidencias de infección y destrucción celular en: tejidos mesodermal y ectodermal incluyendo el epitelio cuticular, tejido conectivo, glándula antenal, branquias, tejido nervioso, órgano linfoide, tejido hematopoyético y principalmente en la ectodermis (Chang *et al.*, 1996). El virus también daña el estómago, las branquias, glándula antenal, corazón y ojos. Durante las etapas posteriores de infección, estos órganos son destruidos y muchas células son lisadas (GSMFC website).

1.1.2. Signos Clínicos Externos

El virus recibió el nombre por los signos externos que producía cuando apareció. Los signos externos típicos de camarones infectados con WSSV son una cutícula blanda con manchas blancas que oscilan entre 0.5 y 2.0 mm de diámetro (Chau *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995; Lightner, 1996; Lo *et al.*, 1997). Estas manchas representan depósitos anormales de sales de calcio en la epidermis cuticular, pero con frecuencia son observadas en el interior de la superficie del caparazón, en los segmentos abdominales y en la parte externa de todo el cuerpo (Wang *et al.*, 1999) (Fig. 4). Para verlos más fácilmente, se arranca la cutícula de la cabeza y con la uña del pulgar se rasca hasta retirar la epidermis (Alday, V. 1999) la cutícula floja en los animales afectados se desprende fácilmente y se separa de la epidermis subyacente (Chou *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999). Sin embargo estos signos no siempre están presentes, o pueden presentarse sin la presencia del virus. Las manchas blancas, también pueden ser provocadas por causas ambientales relacionadas con la concentración de Ca^{++} y el pH del estanque (Alday, V. 1999). Los camarones afectados se encuentran en un estado de letargia, nadando en forma lenta y errática en la superficie o en los bordes del estanque (Lo *et al.*, 1998), observándose además una rápida reducción del consumo de alimento.

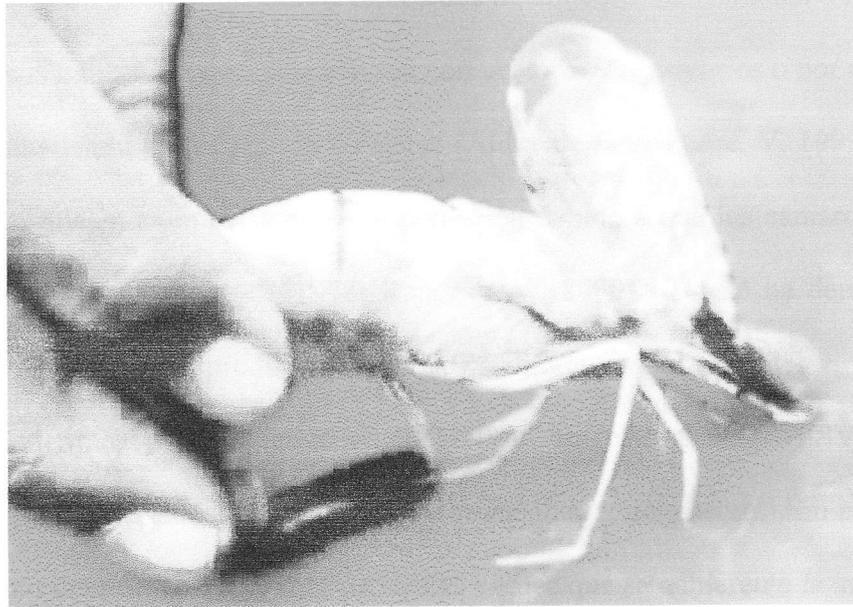


Figura 4: Signos Externos Típicos de camarón infectado con WSSV. Manchas blancas sobre la cutícula.

Fuente: Shrimp Disease Research. www.usm.edu/gcrl/research/shrimp_disease.php
Por: Jeffrey M. Lotz, Ph.D.

Otros signos, es la coloración pálido rojiza de los camarones infectados, dada por la presencia de cromatóforos expandidos y tal vez por la coloración rosada de la hemolinfa (provocadas por una inadecuada actividad PO plasmática) (Rodríguez, 2000), la cual normalmente es azul verdosa. Adicionalmente se observa un incremento en el número de hemocitos hialinos y aparición en circulación de hemocitos de morfología alterada (Montesdeoca *et al.*, 2002).

1.1.3. Vías de transmisión y propagación del virus

El virus de la mancha blanca se transmite horizontalmente (Wang *et al.*, 1999), esto se refiere de animal a animal. Soto y Lotz (2001) demostraron que el WSSV se

transmite más por ingestión de tejidos infectados de animales moribundos o muertos, al igual que sus mudas que por cohabitación con vectores y reservorios o por contacto con agua conteniendo partículas virales libres (Alday de Graindarge, V. 1999). Esta forma de transmisión es importante en la población debido a que los camarones son animales caníbales (Chou *et al.*, 1998; Rajan *et al.*, 2000). No se ha demostrado transmisión vertical (del reproductor al huevo) a diferencia del caso del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética (IHHNV). En el caso del WSSV se han detectado oocitos infectados pero éstos no se desarrollan y degeneran. Sin embargo, en el momento del desove, se liberan partículas virales que se adhieren a la superficie de los huevos y pueden contaminar al animal, si estos no son desinfectados (Alday, V. 1999).

1.1.4. Técnicas de detección del WSSV

1.1.4.1. Observación de Signos Externos

En este caso, los signos externos pueden ser de gran ayuda como indicativos de una anomalía. Pero como ya se ha dicho, no pueden usarse como único medio de diagnóstico, se necesita recurrir a técnicas confirmatorias.

1.1.4.2. Tinción Rápida de Branquias

La fijación rápida de branquias es una técnica que puede ser realizada por el personal de la camaronera y que da una respuesta en 2 h aproximadamente. Esta técnica

permite identificar la enfermedad de la mancha blanca, cabeza amarilla, IHHNV, vibriosis generalizada, micosis y epibiontes.

Una vez preparada la muestra se observa al microscopio y pueden detectarse los cuerpos de inclusión característicos, producidos por una infección con el virus de la mancha blanca.

Un resultado positivo con esta técnica rápida confirma la presencia del virus. Sin embargo, un resultado negativo no significa que el camarón no esté infectado, necesita confirmarse por medio de histología. En el caso de animales indiscutiblemente enfermos no es necesario recurrir a técnicas de biología molecular que aunque nos pueden dar una respuesta son muchos más costosas que la histología.

1.1.4.3. Histología

Es una técnica que da mucha información, tiene sin embargo como inconvenientes que es lenta (36 horas) y no es tan sensible como las técnicas de biología molecular. Para diagnosticar un proceso patológico, es necesario tomar animales que muestren anomalías en su aspecto externo o en el comportamiento.

1.1.4.4. Reacción de polimerización en cadena (PCR)

Si el animal no presenta signos externos de la enfermedad, no significa que no pueda estar infectado. En este caso se debe detectar niveles muy bajos de infección para lo

cual se necesita técnicas de biología molecular que detectan y amplifican el DNA del virus. La técnica más adecuada es la PCR. Existe una variante de la PCR llamada Nested PCR que equivale a una doble reacción de PCR, haciéndola muchísimo más sensible (Alday de Graindarge, V. 1999).

1.2. SISTEMA INMUNE

El sistema Inmune se ha desarrollado para proteger a los organismos multicelulares de sustancias extrañas (Vásquez *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002). Durante la evolución se han seleccionado dos tipos de sistemas inmune que proveen defensa interna contra agentes infecciosos (Lee y Söderhäll, 2002). El nombrado sistema de inmunidad innata (natural) que consiste en la primera línea de defensa contra un agente infeccioso y la inmunidad adaptativa (adquirida), caracterizada por la presencia de anticuerpos y células específicas contra ese agente (Van de Braak *et al.*, 1996). Así como el desarrollo de memoria inmunitaria.

El sistema de inmunidad innata es filogenéticamente el más antiguo mecanismo de defensa que se ha podido descubrir en todos los organismos multicelulares. Este sistema es la primera línea de defensa que ayuda a limitar la infección en una etapa temprana y confía en la línea de receptores codificados que reconocen y conservan el presente modelo molecular sobre microorganismos (Fearon, *et al.*, 1996; Medzhitov, *et al.*, 1997).

1.2.1. Respuesta Inmune de los Crustáceos

Contrariamente a los vertebrados, los crustáceos no poseen un sistema inmunitario con memoria y estricta especificidad, debido a su incapacidad de producir inmunoglobulinas (Hall y Söderhäll, 1984), receptores de células T y células de memoria (Thörnqvist y Södrehäll, 1997; Arala-Chávez y Sequeira, 2000). Sin embargo ellos poseen la capacidad de hacer frente a los patógenos invasores por medio de mecanismos, celulares y humorales, en los cuales están implicados los diferentes constituyentes de la hemolinfa que operan para mantener la integridad del organismo (Söderhäll and Cerenius, 1992). Este sistema inmune carece de la complementariedad antígeno-anticuerpo característica de los vertebrados, pero puede reaccionar efectivamente para destruir los microbios invasores y agentes parásitos (Christense & Nappy, 1988). Los mecanismos celulares implican directamente a los hemocitos y generalmente están relacionados con la respuesta inmune inmediata no inducible, es decir con los mecanismos de defensa que se desencadenan inmediatamente luego de que el animal ha sufrido la agresión del patógeno o una herida (Johanson y Söderhäll, 1989). Existen tres tipos de hemocitos circulantes: células hialinas, semigranulares y granulares (Bachere, 2000). Las células hialinas están asociadas con la fagocitosis y las células granulares y semigranulares están relacionadas con la encapsulación y con la producción de melanina mediante el sistema enzimático profenoloxidasa (proPO), el mismo que es liberado de los hemocitos en los sitios de infección. Los hemocitos son elementos cruciales en

reacciones inmunes como la fagocitosis, eventos de nodulación, encapsulación, citotoxicidad, coagulación y almacenamiento de las enzimas de la cascada proPO (responsable de la melanización) (Smith & Söderhäll, 1986; Van de Braak *et al.*, 1996; Thörnquist y Söderhäll, 1997; Johansson *et al.*, 2000). Los mecanismos humorales necesitan una estimulación previa antes de activarse y están basados en la presencia de factores microbicidas circulantes, los mismos que incrementan la resistencia del huésped por un corto periodo de tiempo. En las defensas humorales participan las proteínas plasmáticas, aglutininas (Ej. lectinas), enzimas hidrolíticas, péptidos antimicrobianos y factores microbicidas circulantes que mejoran la eficiencia de la respuesta inmune (Van de Braak *et al.*, 1996; Thörnquist y Söderhäll, 1997; Johansson *et al.*, 2000). Ellos forman parte de la respuesta inmune inducida (Chadwick y Dunphy, 1986).

Los decápodos tienen un sistema circulatorio abierto mediante el cual son distribuidos nutrientes, oxígeno, hormonas y poseen solamente inmunidad innata (Vásquez *et al.*, 1998). Los camarones poseen un sistema inmune innato rápido y eficiente para reconocer y destruir material no específico, incluyendo patógenos (Van de Braak *et al.*, 1996). El primer mecanismo de defensa de un camarón consiste en sus barreras físicas, como el exoesqueleto.

El camarón como todos los crustáceos, necesita remover y reemplazar periódicamente su exoesqueleto rígido para seguir creciendo. El ciclo de muda ha sido dividido en

cinco estadios por Drach (1989) y son: postmuda (A,B) intermuda (C), premuda (D=, D1, D2, D3) y exuvia (E). Este proceso es una fuente intrínseca de variaciones etológicas, fisiológicas e inmunitarias. Dichas variaciones, sumadas a la pérdida de la cutícula, son algunos de los factores que probablemente influyen en la resistencia y/o susceptibilidad de los crustáceos a los patógenos. Así, Le Moullac *et al.* (1997), encontraron que *P. stylirostris* es más sensible al vibrio patógeno AM23 durante la premuda que durante la intermuda. Adicionalmente, Hasson *et al.* (1999) reportaron que TSV ocasiona la mortalidad de *P. vannamei* en D4 (tardía premuda) o en E (exuvia). Por otra parte información anecdótica señala que los animales que mueren por WSSV son blandos al tacto.

Los cambios bioquímicos y biológicos, así como las modificaciones morfológicas en la epidermis de los crustáceos influyen también en el sistema inmune. Algunos estudios señalan cambios del hemograma durante el ciclo de muda. Tsing *et al.* (1989), en *P. japonicus* y Le Moullac *et al.* (1997), en *P. stylirostri*, encontraron el mayor número de hemocitos durante la postmuda y el menor número durante la intermuda. Similares variaciones fueron observadas, en *Sicyonia ingentis* en el cual la mayor liberación de hemocitos del tejido hematopoyético ocurrió en postmuda (Hose *et al.*, 1992). En cuanto a la fórmula hemocitaria, el mayor número de hemocitos granulares, ha sido observado en intermuda en *P. stylirostris* y *S. Ingentis* (Le Moullac *et al.*, 1997; Hose *et al.*, 1992). En tanto que se ha reportado que el pico

de las células hialinas ocurre durante el período de exuvia en *S. Ingentis* y en *P. japonicus* (Hose *et al.*, 1992; Sequeira *et al.*, 1995).

Aunque las barreras externas son eficientes, muchos agentes infecciosos las sobrepasan. Cuando eso ocurre, los agentes son rápidamente reconocidos como “extraños” o “no propios” por los mecanismos de vigilancia inmune del camarón, mediados por los hemocitos y proteínas de la hemolinfa. Algunos de esos mecanismos de reconocimiento también son capaces de desencadenar las reacciones de defensa. Un ejemplo son las proteínas que reconocen y se unen a carbohidratos de las paredes microbianas, lipopolisacáridos (LPS) de bacterias y β -1,3-glucano de hongos. Esos complejos proteína-microorganismos son fagocitados por los hemocitos o encapsulados en nódulos y de esa forma eliminados (Granja, C. *et al.*, 2001).

El proceso de fagocitosis es facilitado por otras proteínas denominadas opsoninas, que incrementan la unión del agente infeccioso al hemocito. Entre ellas están las lectinas que reconocen carbohidratos específicos expresados en la superficie de virus, bacterias, protozoarios, etc. Además, las lectinas parecen ejercer otros papeles biológicos como factores citolíticos y participación en la muerte celular programada (apoptosis), entre otros. Estudios recientes en cangrejos y artrópodos también las involucran en el reconocimiento de moléculas no propias. La diversidad y especificidad de ese reconocimiento, puede de cierta forma, ser comparado al de las inmuglobulinas en los vertebrados (Granja, C. *et al* 2001).

Otro mecanismo de defensa desencadenado concomitantemente por carbohidratos de las paredes de los microorganismos es el sistema proPO. Las reacciones celulares en invertebrados están en su mayoría acompañadas por melanización. La enzima clave en la síntesis del pigmento melanina es la PO, la cual está presente en la sangre de los artrópodos (hemolinfa) como una proenzima inactiva, la proPO. Esta proenzima es activada por componentes de la pared celular microbial como los β -1,3-glucanos de hongos, los LPS de bacterias Gram negativas o los peptidoglicanos de bacterias Gram positivas (Johansson & Söderhäll, 1989). En camarones, el complejo del β -1,3-glucano con su proteína ligante (BGBP) al unirse a la superficie del hemocito conduce a la liberación de los gránulos que contienen serina proteinasa. Esta enzima se activa en presencia de Ca^{++} y fracciona la ProPO, transformándola en PO. La PO es una enzima bifuncional que cataliza la o-hidroxilación de monofenoles y la oxidación de fenol en quinona, la cual polimeriza en melanina. Tanto los compuestos intermediarios de esa cascada como la melanina son tóxicos para los microorganismos. Así, la eliminación del agente agresor a través de este mecanismo genera regiones ennegrecidas ocasionadas por los depósitos de melanina (melanización), fácilmente identificables cuando se localizan en la cutícula (Granja, C. *et al* 2001). La proenzima ProPO es sintetizada por hemocitos granulares y semigranulares.

La coagulación participa tanto en la homeostasis como en la eliminación de patógenos. La coagulación puede ocurrir por dos vías independientes. En la primera, proteínas coagulables (lipoglicoproteínas) de la hemolinfa se polimerizan bajo la acción de una transglutaminasa dependiente de Ca^{++} , producida por hemocitos y células musculares, llevando a la formación de un gel. La otra vía de coagulación es del tipo de una cascada compuesta por zimógenos de serina semejante a la cascada de coagulación de los mamíferos. Tanto compuestos bacterianos como de hongos (LPS y β -1,3-glucano) son inductores potentes de ambas vías. En resumen, la coagulación juega un papel importante no sólo en la homeostasis sino también en la defensa ya que inmoviliza los organismos invasores (Granja, C. *et al* 2001).

Además de los mecanismos mencionados anteriormente, la respuesta inmune de los camarones puede involucrar una serie de otros mediadores solubles de la respuesta inflamatoria e interacciones con sus respectivos receptores, ya descritos en otros invertebrados. Diversos investigadores han encontrado que células de esponjas, equinodermos y moluscos producen polipéptidos inducibles semejantes a las citocinas interleucina-1, interleucina-6 y Factor de Necrosis Tumoral. Esas moléculas semejantes a citocinas activan las células fagocíticas, incrementan la opsonización y pueden tener inclusive actividad anti-viral, como las moléculas semejantes al interferón producidos por insectos (Granja, C. *et al.*, 2001).

Al respecto Arala-Chavez y Sequeira (2000) concluyen que los invertebrados a pesar de tener una muy baja diversidad de receptores para inmunoestimulantes comparado con los vertebrados, pueden generar respuestas inmunes. Los β -glucanos aplicados oralmente han estimulado una mayor producción de Anión Super Óxido (O_2^-) (Song y Hseih, 1994; Chang *et al.*, 2003), promovido la activación de los hemocitos circulantes en *Astacus astacus* y *Carcinus maenas* (Smith y Söderhäll, 1983), *P. monodon* (Le Moullac *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2000; Van de Braak *et al.*, 2002), *P. vannamei* (López *et al.*, 2003), e incrementado significativamente la actividad de la PO en juveniles de *P. monodon* (Le Moullac *et al.*, 1998) y *P. vannamei* (López *et al.*, 2003).

1.2.2. Inmunoestimulantes

Aunque el camarón cuenta con un sistema eficaz de defensa inmunitaria, su cultivo ha experimentado un descenso dramático debido a la presencia de patógenos. La crisis que atraviesa la industria camaronera ecuatoriana a causa de la Mancha Blanca, exige alternativas de manejo que permitan incrementar la resistencia de los animales, la manipulación del sistema inmune se vislumbra como tal. En los invertebrados, en quienes la vacunación no es posible a causa de las particularidades de sus sistema inmune, los inmunoestimulantes constituyen los principales candidatos para inducir un estado de alerta inmunitaria (Rendón, L., *et al.*, 2003).

La calidad y eficacia de los inmunoestimulantes para inducir la alerta inmunitaria está en función no sólo de la concentración del inmunoestimulante en el producto ofrecido, sino también de la estructura molecular, esta última hace al producto reconocible o no por el sistema inmune y varía de un organismo al otro (Rendón, L., *et al.*, 2003).

Es importante hacer una distinción entre nutrientes e inmunoestimulantes. El nutriente puede actuar como estimulante del sistema inmune de un animal proporcionándole a las células, los materiales requeridos para su óptimo funcionamiento. Este es un impacto indirecto sobre el sistema inmune del animal (Newman, S. 2000).

Las vitaminas como C y E, minerales y otros nutrientes tienen este efecto en mamíferos. Sin embargo, el camarón es fisiológicamente diferente de los mamíferos o peces y no se debe asumir que lo que funciona en éstos funcionará automáticamente en camarón. Los inmunoestimulantes son compuestos que actúan directamente sobre las células inmunes, sobre sus propios mecanismos de inmunidad y no sobre la "salud" de la célula (Newman, S. 2000).

Teóricamente el rol de los inmunoestimulantes es imitar una agresión microbiana, alertando por esta vía el sistema inmune (Ergstad, 1994). Los inmunoestimulantes son extraídos de las paredes celulares de microorganismos como bacterias Gram

negativas (LPS), bacterias Gram positivas (peptidoglicanos), hongos, levaduras y algas (β -1,3-glucanos).

Glucano es un término que se refiere a una cadena de moléculas de glucosa unidas por diferentes tipos de fuerzas químicas. Algunas de estas configuraciones tienen la habilidad de ser un estimulante no específico para que el camarón resista las infecciones virales y bacterianas (Newman, S. 2000).

En lo concerniente a β -1,3-glucanos. Desde 1998 CENAIM ha acumulado información sobre la dosis en mg/kg de alimento de un producto extraído de las paredes de *S. Cerevisiae* desproteínizado y libre de mananos. Este producto utilizado a una concentración de 150 mg/kg de alimento incrementa tanto la respuesta inmune de camarón (Otero *et al.*, 2000) como la resistencia al WSSV en piscinas (datos no publicados).

1.2.3. Inmunoestimulación

La metodología tradicional y ampliamente extendida de levantamiento larvario de camarones peneidos así como del cultivo en piscinas, involucra el uso de antibióticos de forma regular durante gran parte del cultivo, con la finalidad de combatir patógenos importantes como vibrios (Le Moullac *et al.*, 1998). El uso de antibióticos representa un riesgo debido a la reciente resistencia de las bacterias a éstos. Por otra parte, no se pueden descartar efectos secundarios negativos como la depresión del

sistema inmune, reportado en peces tratados con oxitetraciclina (Le Moulac *et al.*, 1998).

Una estrategia de mucha aceptación es la utilización de probióticos. Se considera que una microflora benéfica además de impedir la colonización de bacterias patógenas podría incidir sobre la salud de los animales, induciendo a un mejor desarrollo de los tejidos inmunitarios en los estadios de desarrollo larvario (Moriarty, 1999; Berger, 2000). Rengpipat *et al.* (2000) utilizando la bacteria probiótica (*Bacillus* S11) demostraron incrementos significativos ($p < 0,05$) en la supervivencia, el crecimiento, la actividad fagocitaria y la actividad *PO* de *P. monodon* desafiados con la bacteria patógena *V. Harveyi*. Guillian (2001) evaluando el efecto inmunoestimulantes de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *P. vannamei*, concluyó que las bacterias benéficas aisladas de la microflora autóctona del hepatopáncreas (HP) son competidoras potenciales de bacterias patógenas. De las 80 cepas bacterianas aisladas del HP de camarones silvestres, dos *Vibrio hepataias* y *Bacillus sp*, cumplieron con los requisitos de alcanzar altos porcentajes de colonización (>50 %) en camarones de 1 g e inhibir tanto *in vivo* como *in vitro*, el crecimiento de *V. Harveyi* (Gullian, 2001). Además muchos trabajos para probar el efecto de los inmunoestimulantes se han realizado utilizando bacterina de Vibrios (Sung *et al.*, 1996; Sung *et al.*, 1998), o compuestos extraídos de la pared celular de bacterias y levaduras (Sung *et al.*, 1994; Song y Hsieht 1994).

Por otra parte, un método alternativo o sinérgico a los probióticos podría ser el suministro en larvicultura de inmunoestimulantes tales como los β -glucanos. Larvas saludables con sus tejidos inmunes bien desarrollados podrían enfrentar con ventaja los desafíos microbianos en los estanques, o responder mejor a tratamientos de inmunoestimulación.

Los problemas virales para los cuales no existe la alternativa de los antibióticos, han incrementado aún más el interés en el tema, ya sea por que se ve en estas sustancias una alternativa para aumentar la resistencia a los virus o como un medio para controlar bacterias que puedan minar la salud de camarones infectados por virus. Las sustancias inmunoestimulantes tienen la cualidad de alertar al sistema inmune y son por regla general extraídas de las paredes de microorganismos. Los inmunoestimulantes pueden excitar el sistema inmune de los camarones, preparándolos contra los microorganismos patógenos. Así existe evidencia de protección contra vibrios (Sung *et al.*, 1994) e incluso contra el virus causante de la Mancha Blanca, WSSV (Takahashi *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1999).

A pesar de la falta de información sobre estas sustancias en invertebrados, en acuicultura los inmunoestimulantes han sido utilizados antes de conocidas situaciones de estrés (manipulación, cambios de temperatura o ambiente, cambio del tipo de alimentación, etc) o cuando hay algún incremento en la exposición a microorganismos patógenos y parásitos (blooms en el ambiente), o durante las fases

en que los organismos son más susceptibles a infecciones (cambios de estadios de los animales).

Sung (1996) ha realizado pruebas inmunitarias como determinación de la actividad del plasma contra *E. Coli*, la actividad PO y la producción del anión superóxido por parte de los hemocitos de camarón, para evaluar el efecto de tres inmunoestimulantes. Dichos estimulantes fueron “antígeno” vibrio (células de vibrios muertas por calor), β -1,3-1,6-glucanos extraídos de *Sacharomyces cerevisiae* y *symozan*, (paredes de *S. Cerevisiae*). Como conclusión Sung determinó que: (1) Algunas reacciones microbicidas pueden estar involucradas en la eliminación de vibrios invasores de la hemolinfa del camarón. (2) Los tres inmunoestimulantes tienen la capacidad de entrar al camarón vía tratamiento de inmersión, conduciendo así a la activación de factores plasmáticos y de los hemocitos, así como reforzando las actividades de producción de PO y de O_2^- , (3) Esta mejora en las reacciones microbicidas conduce a una rápida respuesta es de corta duración (Sung *et al.*, 1996). Estos resultados corroboran los obtenidos por la misma autora utilizando los β -glucanos como inmunoestimulantes, y evaluando la actividad PO para estudiar el efecto del estimulante (Sung *et al.*, 1994).

1.3. TIPOS DE CULTIVO DE CAMARÓN

La producción de camarón puede provenir de dos procesos productivos diferentes: la pesca de camarón silvestre (de donde se obtiene aproximadamente el 60 % de la producción mundial en la actualidad) y la producción acuícola. Aunque ambos métodos son utilizados en todos los países productores de camarón, el primer método es la principal fuente de producción en los países asiáticos, de donde proviene el 75 % de la producción total mundial de camarón, y el segundo método, la crianza de camarón en piscinas, es la principal fuente de producción de los países occidentales. En la figura 5 podemos ver un resumen del ciclo productivo acuícola, desde la obtención de la materia prima (larvas de camarón) hasta su comercialización.

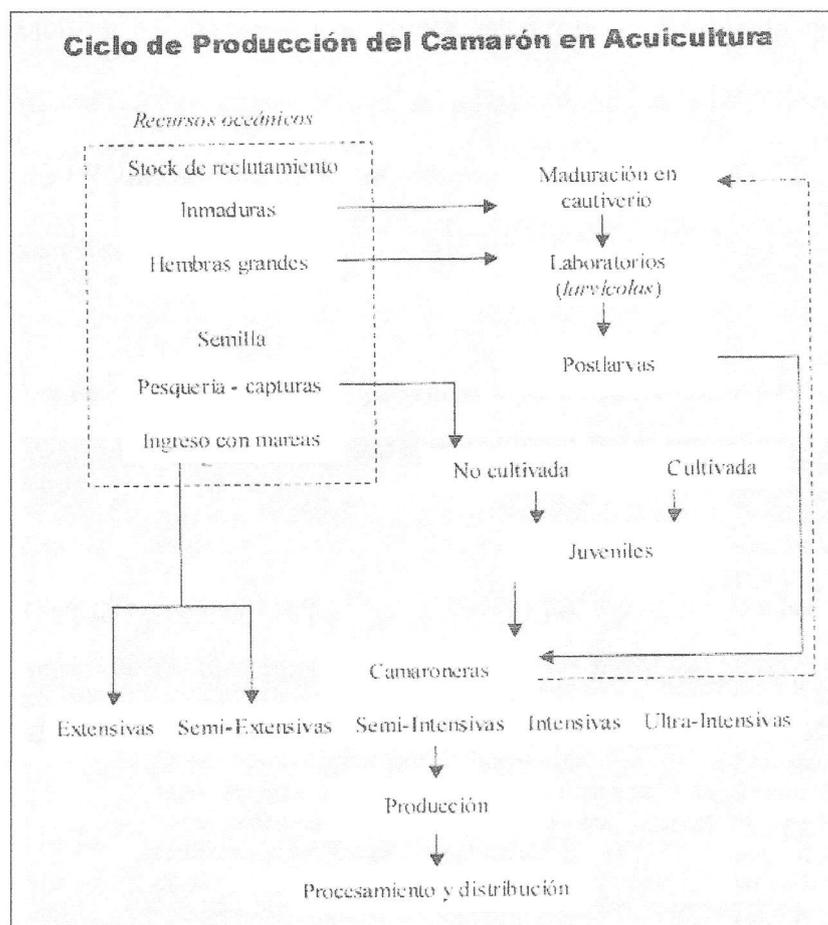


Figura 5: Ciclo de Producción del Camarón en Acuicultura

Fuente: Fast 1992

Elaboración: Tobey, James, *et al*

En la literatura se mencionan cinco clases de cultivo camaronero, que van desde extensivo a ultra-intensivo, pero los más utilizados son tres: extensivo, semi-extensivo e intensivo. La mayor parte de granjas de camarón en Ecuador es del tipo extensivo, aproximadamente el 60 % a mediados de los años 1990. El 40 % restante se ha desarrollado en un sistema semiintensivo, mientras que el sistema en granjas intensivas ha sido de lento desarrollo (Mc Clennen, 2004).

A continuación se revisa con un poco más de detalle cada uno de los tres tipos principales de cultivo de camarón a nivel mundial, y en la Tabla N° 2 (reproducida de Tobey *et al.*, 1998) se presenta un resumen comparativo de las principales características de estos cultivos.

Tabla N° 2: Comparación entre los tres principales tipos de producción de camarón de cultivo.

Características	Extensivo	Semi-extensivo	Intensivo
Tamaño de Piscina	1 – 100 ha	5 – 25 ha	0.01 – 5 ha
Manejo	Atención mínima	Continuo, hábil	Continuo, hábil
Forma de piscina	irregular	Más regular	Cuadrado o rectangular regular
Densidad siembra (por ha)	5.000 – 30.000	25.000 – 200.000	200.000+
Tasa de recambio de agua (por día)	5 – 10 % (mareas)	10 – 20 % (bomba)	30 % (bomba)
Profundidad agua (m)	0.4 – 1.0	0.7 – 1.5	1.5 – 2.0
Alimentación al camarón	Organismos ocurren con flujo de agua natural (a veces suplementado con fertilización orgánica)	Alimentación del camarón aumenta con organismos que ocurren naturalmente	Principalmente alimento formulado (menos del 5 % de alimento por presencia natural)
Tasa de supervivencia	60 %	60 – 80 %	80 – 90 %
Cosechas por año	1- 2	2- 3	2.5 – 3
Demanda de energía (hp/ha)	0 - 2	2 - 5	15 – 20
Mano de obra (persona/ha)	0.15	0.10 – 0.25	0.5 – 1
Problemas enfermedades	mínimos	Usualmente no es problema	Pueden ser serios
Costos de producción (por kg)	U\$\$ 1 - 3	U\$\$ 3 - 5	U\$\$ 5 - 7
Costos de construcción (por ha)	bajo	U\$\$ 15.000 – 25.000	U\$\$ 25.000 – 100. 000
Rendimiento (kg/ha/año)	50 - 500	500 – 5.000	5.000 – 10.000

Fuente: Fast 1992; Maur and Roberts 1982; Lumbegis and Friffin 1992.
Elaboración: Tobey, James, *et al.*

1.3.1. Cultivo Extensivo

El sistema extensivo es el que está asociado a la capacidad de carga natural que tiene el estanque, con densidades de siembra entre 3 y 5 juveniles por metro cuadrado,

renovación de agua por diferencia de pleamares, bombeo casi nulo y sin alimentación suplementaria. Este tipo de cultivo es propio de regiones en donde no existen ni capital (infraestructura) ni recurso humano con especialización técnica, y en las que hay elevados costos crediticios y tierras baratas. Las piscinas son grandes (20 a 100 Ha generalmente) y debido al bajo costo de tierra y falta de capital, se construyen utilizando un sistema de contención consistente en una represa (hecha a mano generalmente) en un curso de agua natural o canal, dando lugar a la formación de una piscina.

Los terrenos que se utilizan para la construcción de este tipo de piscinas son pantanos de manglares y pampas salinas. Por la geografía del terreno, las piscinas poseen forma y profundidades irregulares (de 0,4 a 1 m), y pueden contener abundante vegetación. La alimentación y recambio de agua depende de las mareas, aunque a veces se agregan fertilizantes y estiércol para aumentar el crecimiento de algas y dar más alimento a los crustáceos. La densidad de siembra se estima entre 5.000 y 30.000 camarones por Ha. La supervivencia y rendimiento son bajos, pero debido a los bajos costos administrativos y financieros lo hacen un negocio atractivo y rentable.

1.3.2. Cultivo Semi-extensivo

Es el método que más se utiliza en Latinoamérica. Este sistema comprende una densidad de siembra mayor a la que el sistema (natural) puede sostener por sí solo.

Las piscinas son de menor tamaño (5 – 15 Ha), de dimensiones más regulares y profundidades más uniformes, que permiten un mayor control sobre la siembra de crustáceos.

Los costos de operación y administrativos son mucho más elevados que los del sistema extensivo, ya que debido a la mayor densidad de siembra (25.000 a 200.000 juveniles/Ha) debe invertirse más en alimentación, mano de obra, controles de producción, y en utilización de diesel y gasolina para aireación y bombeo para recambio de agua (la cual es cambiada entre un 10 y 30 % por día).

En este sistema se utilizan con relativa frecuencia estanques especiales para precría en donde se colocan a los juveniles (silvestres o de laboratorio) hasta que alcanzan la resistencia necesaria para poder ser sembrados en densidades menores en piscinas de cría. En lugares donde no se siembran especies endémicas (como en el Caribe y la costa este sudamericana) existe una alta dependencia de laboratorios.

Mientras mayor sea la densidad de siembra bajo este sistema, se crea una mayor dependencia de la tecnología, pues la probabilidad de que la cosecha falle por enfermedades, alimentación insuficiente, o estrés de las especies sembradas aumenta con la cantidad de camarones por hectárea.

1.3.3. Cultivo intensivo

Este tipo de cultivos está asociado con tasas de producción extremadamente altas (5.000 – 10.000 kg/Ha/año), mediante una mayor aportación de capital operativo, equipo y mano de obra especializada, alimentación, nutrientes, químicos y agentes quimioterapéuticos.

El tamaño de las piscinas es relativamente pequeño (0,01 – 5 Ha) y la densidad de siembra es mayor (> 200.000 juveniles/Ha). El camarón se cultiva por fases (1 hasta 5 fases), aprovechando la longitud y peso de los especímenes se siembran mayores cantidades en los primeros estadios y menores cantidades a medida que crece el camarón.

Otras características de este tipo de cultivo, son los sistemas mecánicos de aireación y de circulación (bombeo para recambio) del agua, el uso exclusivo de alimentación balanceada, y la dependencia de laboratorios de larvas para asegurar semilla sana y libre de enfermedades.

Debido a la elevada densidad de siembra los controles deben ser efectuados constantemente para poder detectar potenciales problemas y actuar a tiempo, ya que los fracasos se pueden presentar frecuentemente y ocasionar pérdidas catastróficas en las cosechas en muy corto tiempo.

Ante el escaso progreso en la implantación de técnicas de manejo que permitan incrementar los niveles de producción hasta un punto en que la actividad vuelva a ser rentable, varios productores empezaron a realizar pruebas de cultivos intensivos en lo que se denominó acuicultura en tierras altas (IN LAND). Estos sistemas consisten en estanques pequeños (1 Ha) y el agua proviene de pozos con salinidades bajas.

1.4. INVERNADEROS, UNA ALTERNATIVA DE INTENSIFICACIÓN

Los impactos sobre la producción camaronera en Ecuador están gobernados por la naturaleza y fundamentalmente por eventos climáticos de gran escala. Así como se observan incrementos en las exportaciones en la época de los eventos El Niño, también vemos una marcada disminución de las mismas durante las ocurrencias de los eventos La Niña. El evento de 1999 - 2001 ha sido uno de los eventos fríos más intensos de los últimos 50 años y se mantuvo en forma sostenida con anomalías negativas de temperatura por más de 24 meses. Este período coincidió con la ocurrencia de la epidemia del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) (Calderón, 2002).

Se estima que la temperatura óptima para el desarrollo de camarón *L. vannamei* es de 25 a 30 °C (Wyban *et al.*, 1995; Ponce-Pelafox *et al.*, 1997). La dinámica de ocurrencia de patógenos en sistemas acuáticos esta probablemente modulada por parámetros ambientales tales como la salinidad y temperatura (De la Peña *et al.*, 1993; Bray *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 2000). La literatura reporta modificaciones en

la respuesta inmune de crustáceos provocadas por fluctuaciones de temperatura (Chisholm and Smith 1994, Vargas-Albores *et al.*, 1998; Cheng y Chen 2000).

Una de las pruebas más promisorias es el tratamiento de los animales con temperaturas altas. A una temperatura de alrededor de 33 °C la formula hemocitaria cambia permitiendo al camarón controlar la replicación del WSSV y eventualmente “limpiarse” del mismo. En pruebas de laboratorio el camarón sometido a tratamiento térmico puede enfrentar una prueba de desafío con el WSSV sin presentar mortalidad (Calderón, 2002). Del análisis de aproximadamente 2.000 ciclos de producción durante el periodo 1998 - 2001, se pudo observar que la prevalencia de WSSV está inversamente relacionada con anomalías térmicas. Esta información es muy relevante, pues se puede observar que cuando las anomalías térmicas se encuentran bajo -0.5 °C la prevalencia del WSSV es cercano al 50 %. Cuando las anomalías empiezan a ser positivas la prevalencia del Virus decae. Es importante recalcar que la prevalencia no está indicando los resultados de la producción, está indicando simplemente la cantidad de estanques camaroneros infectados en el sistema y por lo tanto el nivel de riesgo en ese momento (Calderón, 2005).

El aumento de las mortalidades por WSSV ha sido atribuido a elevadas temperaturas del agua en China (Han *et al.*, 1998). Sin embargo, los agricultores y el personal de extensión de cultivos de camarón en otras partes han observado un aumento de la severidad de la enfermedad WSSV asociada con la temperatura baja y otros factores

relacionados como el aumento de las precipitaciones. La observación general ha sido que las pérdidas epidémicas debido a WSSV lo que ocurren en menores probabilidades durante períodos calientes.

Tanto supervivencias como producciones finales fueron mayores durante el verano del hemisferio sur, entre los meses de enero y abril de los años 2000 y 2001. Esta estación está caracterizada por lluvias y temperaturas ambientales más elevadas. Sin embargo, históricamente las producciones han sido superiores en ésta época. Por un lado, el incremento de la luminosidad estimula la productividad natural del estanque mejorando las condiciones nutricionales del camarón, y por otro lado el incremento de temperatura aceleraría el metabolismo del camarón traduciéndose esto en crecimientos más rápidos.

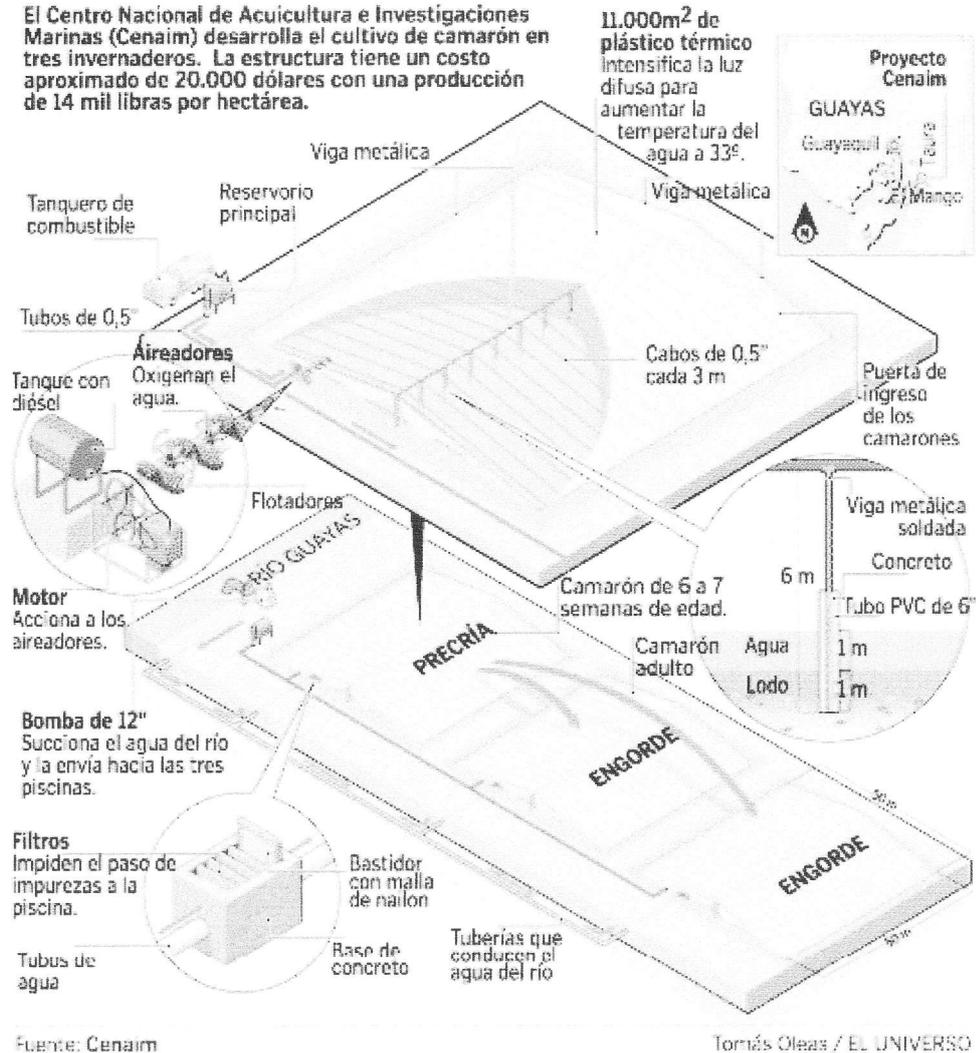
La temperatura del agua en los estanque de cultivo puede alcanzar valores entre 28 a 31 °C durante el invierno de diciembre a abril. Teichert-Coddington y otros (1994) reportaron diferencias de producción de camarón asociadas a la época y temperatura ambiental en Honduras. Jiménez y otros (2000) encontraron una correlación negativa entre la prevalencia del virus infeccioso cuticular epitelial (ICENV al que otros denominan TSV), y temperatura en granjas de cultivo de camarón en el Ecuador para el período 1994-1998, sugiriendo que el clima frío podría ser un factor de riesgo que precipite la ocurrencia de ICENV.

De modo interesante, en varias especies de animales de sangre caliente, las ventajas de la hipertermia en el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo aquellas causadas por virus y cáncer son conocidos (Pontiggio *et al.*, 1996; Ge and Huang 200; Hildebrandt *et al.*, 2000). Más recientemente, la hipertermia ha sido aplicada como una terapia experimental para pacientes con Síndrome de Deficiencia Immune Adquirida (AIDS) (Pennypacker *et al.*, 1995). La temperatura del cuerpo de animales homeotermos es determinada principalmente por la temperatura del ambiente que ellos habitan y la cantidad de radiación solar que ellos absorben. En el caso de invertebrados acuáticos, la temperatura del cuerpo depende principalmente de la temperatura de agua (Feder 1999). La regulación de temperatura de cuerpo es alcanzada por ajustes conductuales como el movimiento entre microhábitats. Sin embargo, animales acuáticos generalmente son limitados a los cuerpos del agua que varían en temperatura según el ambiente circundante. El camarón es incapaz de termorregular y está sujeto a la temperatura predominante donde vive.

Los estudios realizados por el CENAIM durante el año 2001, demostraron que con temperaturas del agua de 33 °C, el WSSV no provoca la muerte del *P. vannamei* (Calderón, J. *et al.*, 2003). Una de las alternativas propuestas para alcanzar estas temperaturas es el empleo de invernaderos (Fig. 6).

CAMARONERAS CON NUEVO SISTEMA

El Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (Cenaim) desarrolla el cultivo de camarón en tres invernaderos. La estructura tiene un costo aproximado de 20.000 dólares con una producción de 14 mil libras por hectárea.



Fuente: Cenaim

Tomás Oleas / EL UNIVERSO

Figura 6: Invernaderos de cultivos de camarón.

Su utilización implica el empleo de sistemas de cultivos intensivos a fin de que la rentabilidad justifique los costos. Los invernaderos tradicionalmente empleados en agricultura no son directamente aplicables a los cultivos acuícolas. Las características de la atmósfera dentro del invernadero, la temperatura y humedad altas se enfrentan a

nuevos retos tecnológicos para hacer posible su manejo a escala comercial (Calderón, J. *et al.*, 2003).

**2. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA
AL WSSV DE CAMARONES PREJUVENILES *Penaeus vannamei*
MEDIANTE β -1,3-GLUCANO Y PREEXPUESTOS AL VIRUS DURANTE
CAÍDAS DE TEMPERATURAS**

El desarrollo de este trabajo se realizó en el Centro Nacional de Acuicultura en Investigaciones Marinas "Edgar Arellano M." (Fundación CENAIM-ESPOL), ubicado en San Pedro de Manglaralto, 45 Km de Santa Elena (Provincia del Guayas). La parte experimental se realizó, durante el período de Septiembre del 2004 a Febrero del 2005.

**2.1. BIOENSAYO I. EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS
CAMARONES PREJUVENILES *P. vannamei* CULTIVADOS EN
INVERNADEROS ANTE CAÍDAS DE TEMPERATURAS.**

En el estudio se utilizaron camarones prejuveniles de la especie *P. vannamei* (N = 720), con un peso promedio de $1,66 \pm 0,63$ g., los camarones fueron obtenidos de un invernadero, de la estación experimental del CENAIM, localizada en la zona de Palmar, 40 Km de Santa Elena (provincia del Guayas). Los animales fueron trasladados a tanques cónicos de 250 L. Los prejuveniles fueron aclimatados durante 24 h. Antes de la aclimatación, se tomó una muestra de 50 individuos para detectar por PCR la presencia del WSSV y determinar una prevalencia menor al 50 %.

2.1.1. Diseño Experimental

Para el experimento se utilizó un diseño completamente aleatorio (Tabla N° 3). Las unidades observacionales fueron camarones de $1,66 \pm 0,63$ g. La población se dividió en tres lotes de animales. Animales mantenidos a 33 °C (población **A**), animales mantenidos a 28 °C (población **B**). La tercera población fue llevada a temperatura ambiental 24 °C (población **C**). Hubo 7 réplicas (unidades experimentales) por tratamiento, existiendo 21 unidades experimentales. En cada unidad experimental hubo 40 unidades observacionales. Cantidad equivalente a 80 ind/m² (n=40; N=960). Los tanques utilizados para el experimento tienen una capacidad de 150 L, y un área de 0,44 m². Los datos obtenidos de peso e índices histológicos durante la realización del ensayo fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) (DataDesk 6.1).

Tabla N° 3. Diseño Completamente Aleatorio.

TRATAMIENTOS	TEMPERATURAS
T1	33 °C
T2	28 °C
T3	T ° Ambiente

2.1.2. Manejo del Experimento

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio N° 23 durante el período comprendido del 30 de Octubre del 2004 al 19 de Noviembre del 2004 (21 días). La desinfección de tanques se realizó antes y después del bioensayo con cloro granulado. El sistema de aireación incluyó piedras difusoras y un sistema de circulación de agua Air lift. Este sistema se consiguió instalando la piedra difusora en el tubo central, el cual tenía

comunicación con la cámara inferior del tanque ubicado bajo el fondo de conchilla. De este modo se consiguió que el agua recirculara a través de la conchilla (Fig. 7).

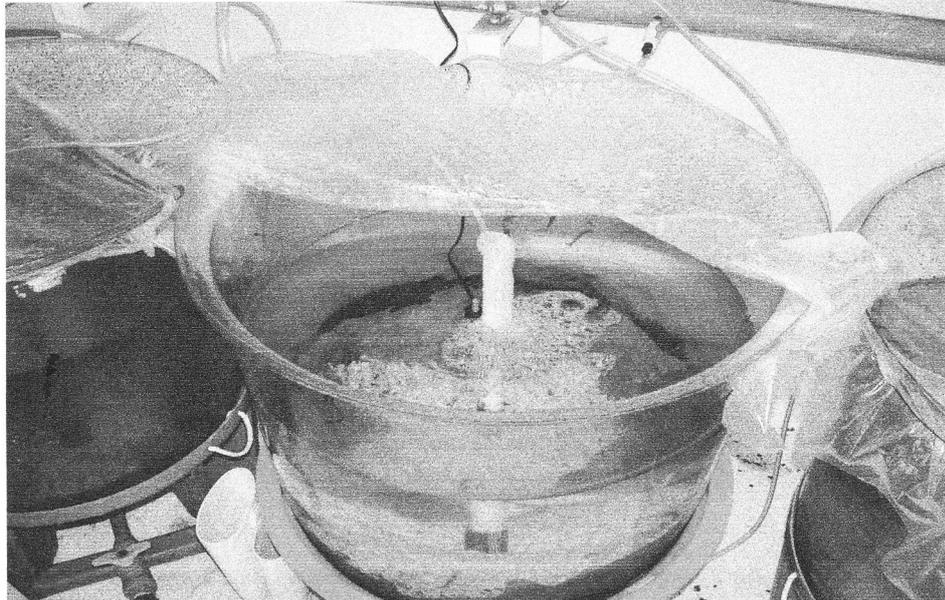


Figura 7: Unidades experimentales provistas de sistema Air lift

Cada unidad experimental contó con un protector plástico o tapa para evitar contaminación ambiental y pérdida de calor. La temperatura se controló mediante el uso de calentadores de barra (Fig. 8). La salinidad fue medida antes de la siembra con un refractómetro.

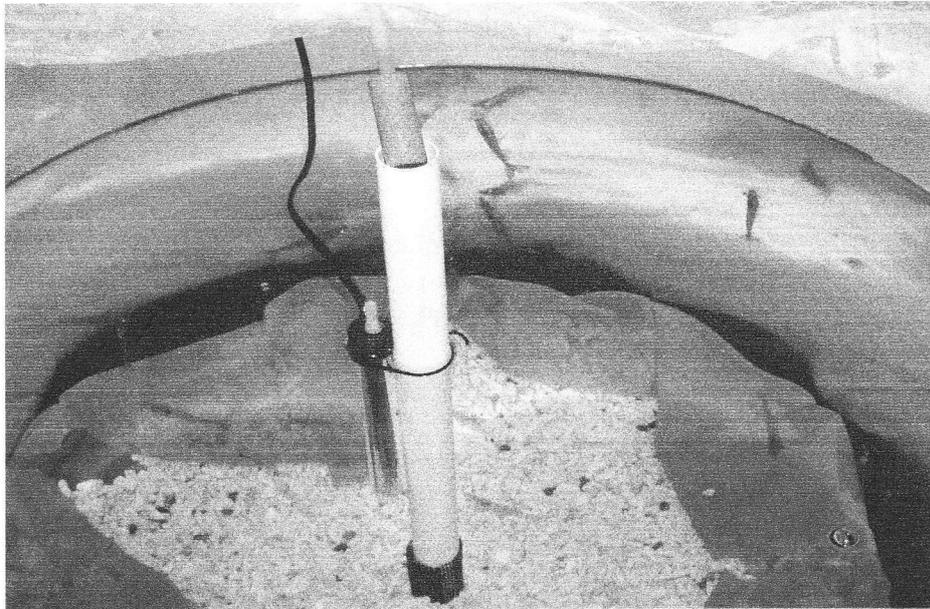


Figura 8: Calentadores de Barra

La alimentación (5% de la biomasa) se basó en una dieta comercial, Molino 50 dada en 2 raciones diarias. Se sifoneó semanalmente. Se monitoreó la temperatura de los tanques al igual que la mortalidad en intervalos de 4 horas. Se realizó un muestreo de peso al final del bioensayo (336 animales/población).

En dos ocasiones se tomaron muestras de agua para medir amonio.

Los animales utilizados en el bioensayo fueron analizados en cuatro ocasiones para detectar el virus de la mancha blanca:

- 1.- En la piscina camaronera antes de transportar un lote de camarones al CENAIM, se tomó una muestra de 50 animales, la misma que fue analizada mediante la técnica de PCR.
- 2.- En el CENAIM, a los 5 días de haber empezado el bioensayo, se tomó 5 animales de cada tanque para ser analizados por PCR.
- 3.- A los 17 días, se tomó 5 animales de cada tanque.
- 4.- Al término del bioensayo (21 días) se analizaron 5 individuos de cada tanque y se recolectó para análisis de histología 10 animales de coloración rosadas y azules del tratamiento con 33 °C.

Para el diagnóstico de WSSV por PCR las muestras se preservaron en Etanol al 95 %. En los mismos tiempos se tomaron muestras para histología, las cuales se fijaron con solución Davidson y luego se las preservó en Etanol al 70 % hasta su posterior análisis.

2.1.3. Técnicas para la detección del virus de la Mancha Blanca (WSSV)

2.1.3.1. PCR

La técnica de Reacción de Polimerización en Cadena (PCR) ha sido adoptada en la acuicultura para la amplificación de ADN de virus, bacterias e invertebrados (Lightner y Redman, 1998). Para detectar el virus de WSSV se utilizó los iniciadores de Kimura.

2.1.3.1.1. Extracción de ADN genómico por CTAB

El material genético de los camarones fue extraído de la cabeza. La muestra de camarón fue homogenizada, macerada y desintegrada con la ayuda de un macerador manual en tubos eppendorf con 500 μ l de cetiltrimetilamonio bromuro (CTAB) y 40 μ l de Proteinasa K. Fue incubada en baño María entre 55 - 60 ° C por 2 h. Se retiraron las muestras del baño María. Cuando alcanzaron la temperatura del ambiente, se adicionó a cada tubo 250 μ l de Fenol y 250 μ l de Cloroformo-isoamil. Las muestras se homogenizaron manualmente y luego fueron centrifugadas a 15800 g. por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó 450 μ l de cloroformo-isoamil. Se centrifugó a 15800 g. por 6 min y al líquido sobrenadante recuperado se le adicionó 600 μ l de Isopropanol (para precipitar el ADN) por 12 horas a -20 °C. El ADN fue separado por centrifugación mediante 10 min a 15800 g a 24 °C. El ADN precipitado fue lavado con etanol frío al 70 %, centrifugado por 4 min a 15800 g, secado en la estufa a 40 °C y resuspendido en 30 μ l de H₂O destilada doblemente filtrada (MiliQ). La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría (Bio Photometer Eppendorf) a ng/ μ L. dsDNA.

2.1.3.2. Histología

2.1.3.2.1. Fijación o Preservación

Las muestras se procesaron siguiendo el protocolo de Bell y Lightner (1988). En resumen los animales (vivos) se inyectaron con fijador Davidson (0,1 a 10 ml

dependiendo del tamaño del camarón). Primero directamente en la parte dorsal (desde arriba) a nivel del hepatopáncreas de manera lenta teniendo cuidado de no reventar el hepatopáncreas ni de traspasar la aguja de un lado al otro lado del animal. De la misma forma se inyectó en las dos partes laterales en los siguientes lugares: cabeza, el primer segmento abdominal, tercer segmento abdominal y luego en la cola (Bell and Lightner, 1988) (Fig. 9).

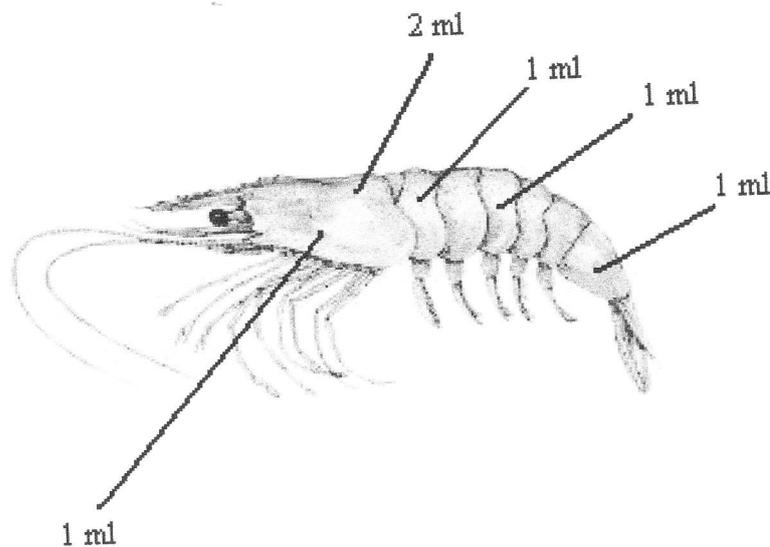


Figura 9: Proceso de Fijación y Preservación de Camarón

Fuente: Fanny Panchana

Las muestras permanecieron en ésta solución durante 24 h. Después de 24 - 72 h dependiendo del tamaño del camarón, las muestras se transfirieron a etanol al 70 %.

Se retiró los camarones del etanol al 70 % y se separó transversalmente al camarón entre el cefalotórax y el abdomen. Se dividió el cefalotórax justo en la mitad.

2.1.3.2.2. Deshidratación, desparafinado y Tinción

La deshidratación se realizó mediante baños sucesivos de alcohol a concentraciones crecientes (Tabla N° 4).

Tabla N° 4: Proceso de deshidratación de muestras para histología.

	TIEMPO
Etanol al 70 %	1 h
Etanol al 80 %	1 h
Etanol al 90 %	1 h
Etanol al 100 % I	1 h
Etanol al 100 % II	1 h
Etanol al 100 % III	1 h
Xilol I	1 h
Xilol II	1 h

Los tejidos se impregnaron en parafina en el procesador de tejidos automático (Procesador de Tejido Shandon).

Los cortes se realizaron utilizando un micrótopo (Micrótopo Shandon 0325). El desparafinado se realizó mediante baños sucesivos de xilol y alcohol (Tabla N° 5), y las placas fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina (Tabla N° 6).

Tabla N° 5: Proceso de desparafinado de muestras para histología.

	TIEMPO
Xilol II	7 min
Xilol I	7 min
Etanol al 100 % III	3 min
Etanol al 100 % II	3 min
Etanol al 100 % I	3 min
Etanol al 90 %	3 min
Etanol al 80 %	3 min
Etanol al 70 %	3 min

Tabla N° 6: Proceso de tinción de `placas con Hematoxilina y Eosina.

	TIEMPO
Agua Destilada	1 min
Hematoxilina	18 min
Agua Potable	3 min
Agua Destilada	1 min
Eosina	1 min
Etanol al 70 %	1 min
Etanol al 90 %	1 min
Etanol al 100 % I	1 min
Etanol al 100 % II	1 min
Xilol I	3 min
Xilol II	3 min

2.1.4. Análisis Histológico

Los animales fueron analizados a nivel histológico, y se observó que grado de infección con WSSV presentaban. Una vez detectadas las lesiones, se elaboraron tablas e índices histológicos que permitieron cuantificar los datos y encontrar el grado de infección de los diferentes órganos. Además se observó si los tejidos presentaban alguna otra anomalía (Picknosis-Kariorrhexis), o si por el contrario los animales habían desarrollado algún mecanismo de defensa (infiltración, cápsulas o esferoides) para eliminar el virus. Para definir el grado de infección con WSSV o de P-K se siguió el procedimiento de Panchana (com. per.), el cual tiene 4 grado de acuerdo al nivel de infección (Tabla N° 7).

Tabla N° 7: Tabla de niveles de lesiones de manchas blancas.

Tabla de Niveles de infección	
Menor de 3 células infectadas	Muy leve
Mayor de 3 - 20 células infectadas	Leve
Mayor de 20 a 60 células infectadas	Medio
Mayor de 60 a 100 células infectadas	Severo

2.2. BIOENSAYO II. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS INMUNOESTIMULANTES Y/O LA PREEXPOSICIÓN CON ANTÍGENOS VIRALES SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE POSTLARVAS *P. vannamei* DESAFIADAS CON WSSV.

Las larvas provinieron de familias obtenidas de 6 cruces comerciales de reproductores Libres de patógenos específicos (SPF) provenientes de Estados Unidos (Shrimp Improvement Sistem). 600.000 nauplios fueron levantados hasta postlarvas en las instalaciones del CENAIM.

2.2.1. Diseño Experimental

Las larvas tuvieron 3 tratamientos 1) animales SPF. 2) Aplicación de WSSV Inactivo entre Zoea y Mísys. 3) Aplicación de Virus Activo en PL12. Los animales de cada tratamiento fueron separados en dos lotes en el estadio PL27. un lote de cada tratamiento recibió glucanos mezclado con el alimento, dando como resultados 6 tratamientos (Tabla N° 8). Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), verificando los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Tabla 8: Tratamientos utilizados en el presente estudio

TRATAMIENTOS	COMBINACIONES
T1	SPF, sin glucanos
T2	SPF, con glucanos
T3	Virus Inactivo, sin glucanos
T4	Virus Inactivo, con glucanos
T5	Virus Activo, sin glucanos
T6	Virus Activo, con glucanos

2.2.2. Manejo del Experimento

2.2.2.1. Preparación de WSSV inactivada

La suspensión viral usada en este estudio estuvo preparada experimentalmente con *P. vannamei* infectado con WSSV siguiendo el protocolo previamente reportado por Wu et al. (2002). Brevemente, la hemolinfa fue retirada en un volumen de 4 ml con bufer de fosfato salino (PBS) de animales moribundos siendo dividido en alícuotas de 0.3 ml y almacenado en -80 ° C.

Para la preparación de formalina-inactivada de WSSV se utilizó formalina (0,5 % v/v), la misma que fue añadida a la suspensión viral lista como se describió anteriormente. El virus fue inactivado durante 10 min a 25 °C. Se retiró la formalina mediante dos centrifugaciones a 30000 g por 1 h a 4 °C. El pelet fue suspendido en PBS, y usado como una vacuna, (vacuna inactivada de WSSV). La suspensión viral fue diluida de 10 ml de PBS e inactivada durante 10 min a 60 ° C. Este protocolo fue tomado de Namikoshi et al., 2004.

2.3.3.2. Preparación de WSSV Activo

2.2.2.2.1. Preparación del Inoculo Viral

La solución viral para la infección por baño fue preparada siguiendo el protocolo de CENAIM, el mismo que es un protocolo modificado de Chou et al. (1998). El WSSV fue extraído de cabezas de camarones infectados *P. vannamei* diagnosticados como positivos al virus. Siete g fueron macerados y homogenizados en tampón TN 1X (20 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7,4) en una relación 1:5. La suspensión fue centrifugada a 780 g por 20 min. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de celulosa de 0.45 μm (ADVANTIC). La solución fue mantenida en hielo (pocos minutos) hasta el momento de la inoculación.

2.2.2.2.2. Pruebas de infecciones

Con la finalidad de contar con animales crónicamente infectados con WSSV (infección sub-letal), se realizaron pruebas en las que se evaluó la capacidad infecciosa de 3 dosis de material infeccioso, (0.5, 1 y 2.5 % de la biomasa de los animales a ser infectados) aplicadas como un homogenizado al agua (30 L). Se utilizó la sala experimental #21, a la cual fueron trasladados 40 animales con un peso promedio de 3 - 4 g, y distribuidos en 4 gavetas. La desinfección del local se realizó con cloro líquido a 100 ups. antes y después del experimento. El agua de mar fue esterilizada con filtros de 0,25 μm y desinfectada con una solución de cloro de 100 ups. El cloro fue desactivado con 25 ups de tiosulfato de sodio (50 %). La población de camarones

fue aclimatada durante 2 d, y permaneció en ayuno 24 h antes de la infección. Posteriormente 10 camarones fueron infectados por baño al 0,5 % de la biomasa (en un volumen de 10 ml del inóculo viral anteriormente descrito), 10 más fueron infectados con 1 % de la biomasa (20 ml del inóculo viral) y los 10 siguientes con el 2,5 % de la biomasa (50 ml del inóculo viral). La infección se realizó a una temperatura de 28 °C y duró 15 h. El grupo control (una gaveta), no fue infectado. Pasado las 15 h p.i. se procedió a la distribución de los camarones infectados en las unidades experimentales, la misma que se realizó aleatoriamente. Las unidades experimentales consistieron en frascos de vidrio de 3 L con un sistema de aireación permanente y tapas para evitar contaminación ambiental. Los frascos fueron distribuidos en 3 bandejas con calentadores de barra para mantener la temperatura de manera estable a 28 °C. Se procedió a alimentar y a observar la aparición de signos externos. En base a estos se eligió 3 camarones infectados al 2,5 % de la biomasa para infectar por cohabitación a los animales SPF (expuestos a virus activo).

2.2.3. Exposición al WSSV Activo

Se utilizó la sala experimental #21 a la cual fueron trasladados 1000 animales SPF a una sola gaveta, ellos fueron aclimatados durante 2 d. En esa gaveta se instaló los animales seleccionados para la infección por cohabitación dentro de una canasta de malla para evitar la depredación.

2.2.4. Inmunoestimulación

2.2.4.1. Dietas

El β -glucano fue suplementado durante 9 días a razón de 150 mg/Kg del producto comercial incluido en el alimento. Cuando los camarones alcanzaron el estadio PL27, de cada tratamiento se separó dos lotes de 500 animales en gavetas plásticas de 60 L, con aireación constante y recambio diario de agua. En una de las poblaciones se aplicó β -1,3-glucano mezclado con el alimento artificial Molino 50 durante 9 días hasta el estadio PL36, los animales de la otra población recibieron solamente Molino 50. Los camarones fueron alimentados cada 4 h (08:00, 12:00, 16:00, 20:00, 00:00, 04:00 h) 6 veces al día. La ración inicial fue del 0,5 % del peso corporal, y se fue ajustando conforme respondían a la alimentación. Durante el experimento la temperatura del agua se controló con calentadores de barra.

2.2.5. Desafío con el WSSV y evaluación de la supervivencia

Se realizaron dos experimentos usando larvas preinmunizadas. Los camarones tenían un estadio aproximado de PL 43 y 45 respectivamente. En ambos experimentos se evaluó la supervivencia luego de un desafío con WSSV.

2.2.5.1. Primer bioensayo

2.2.5.1.1. Diseño experimental

El bioensayo consistió en evaluar la supervivencia de los animales SPF y los animales SPF tratados con WSSV inactivo. Las unidades observacionales fueron larvas PL46 camarones de aproximadamente $0,10 \pm 0,11$ g. Se utilizó un diseño completamente aleatorio con 20 réplicas (unidades experimentales) por tratamiento y 15 unidades observacionales por réplica ($n = 15$; $N=300$). Las unidades experimentales fueron recipientes de vidrio de 4 L de capacidad (carameleras) Fig. 10.

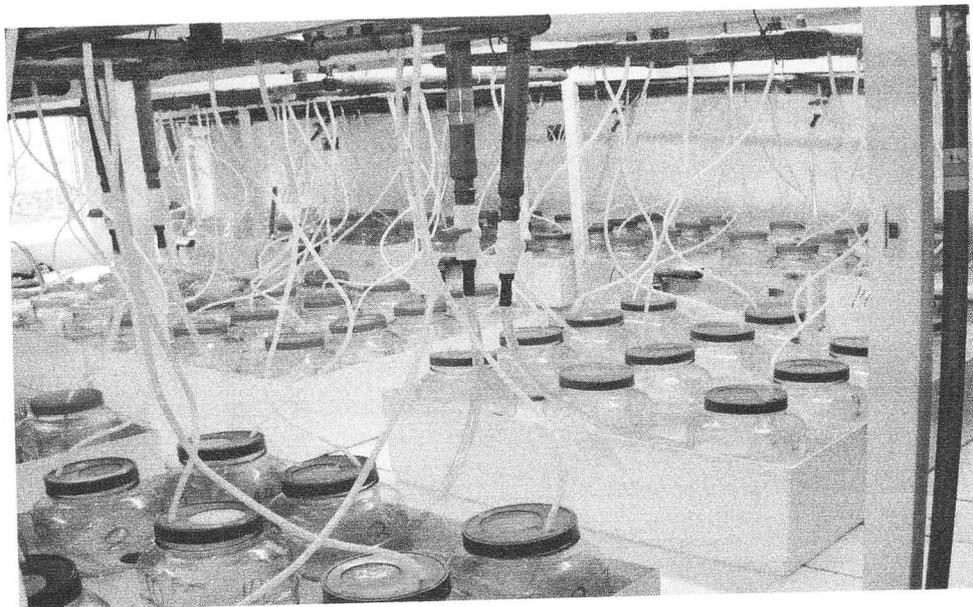


Figura 10: Recipientes de vidrio de 4 L. (unidades experimentales).

2.2.5.1.2. Manejo del Experimento

El experimento se realizó en el laboratorio #1 durante el periodo comprendido del 29 Enero al 3 Febrero del 2005 (6 d). El desafío se realizó por medio de ingestión. El extracto viral fue preparado en el CENAIM siguiendo el protocolo descrito por Chou *et al.* (1998). Se realizaron dos aplicaciones de la papilla a intervalos de 3 h cada una. Se administró aproximadamente el 0,5 % de la biomasa por unidad experimental. Luego de 1 h de aplicación se procedió a recambiar el agua a fin de evitar mortalidad por degradación de la calidad del agua.

El experimento se dividió en 2 fases y durante cada fase se anotó el número de camarones muertos por unidad experimental. La primera fase abarcó observaciones individuales por unidad experimental cada 2 h durante las primeras 72 h del experimento. En la segunda fase las observaciones se realizaron cada 4 h cubriendo el periodo entre las 73 y 144 h de experimentación.

Después de 6 d se cosecharon los camarones sobrevivientes. Se tomó una muestra (5 camarones) de cada tratamiento para PCR e Histología.

2.2.5.2. Segundo Bioensayo.

2.2.5.2.1. Diseño experimental

Se estableció la hipótesis de trabajo de que las postlarvas PL46 cultivadas e inmunoestimuladas con β -glucanos y expuestas al virus estarían mejor preparadas para enfrentar un desafío viral que las larvas no inmunoestimuladas. El bioensayo consistió en evaluar la supervivencia en los animales provenientes de los 2 tratamientos sometidos a desafío con WSSV. Las unidades observacionales fueron los camarones de aproximadamente $0,10 \pm 0,07$ g. Se utilizó un diseño completamente aleatorio con 10 réplicas (unidades experimentales) por tratamiento y 10 unidades observacionales por réplica ($n=10$; $N=100$). Las unidades experimentales fueron recipientes de vidrio de 4 L de capacidad (carameleras).

2.2.5.2.2. Manejo del Experimento

El experimento se realizó en el laboratorio #1 (CENAIM) durante el período comprendido del 29 Enero al 3 Febrero del 2005 (6 d). El desafío se realizó por medio de ingestión siguiendo el método previamente descrito.

Cada 2 h a partir del momento de la infección, se retiraron los camarones muertos y moribundos para el análisis de supervivencia. Para el diagnóstico de WSSV se tomaron las muestras de sobrevivientes - crónicos a los 7 d p.i. después de finalizar el

ensayo. Los camarones fueron fijados en Solución Davison y analizados por Histología.

3. EFECTOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL WSSV DE CAMARONES PREJUVENILES *Penaeus vannamei* MEDIANTE β -1,3-GLUCANO Y PREEXPUESTOS AL VIRUS DURANTE CAÍDAS DE TEMPERATURAS

3.1. ENSAYO I

3.1.1. Condiciones Experimentales

Con la implementación del sistema Air-lift se mantuvo la calidad del agua. La temperatura se mantuvo estable durante todo el experimento: $32.8 \pm$, $27.8 \pm$, $25 \pm$ °C. La concentración de O₂ disuelto estuvo alrededor de 0,5 mg/L valores que están dentro de los rangos permitidos.

Durante el experimento se recolectaron 2 muestras de agua, una al inicio del ensayo y otra al final del mismo para evaluar los niveles de amonio. La concentración de N-amonio se mantuvo por debajo de 0.09 mg/L.

3.1.2. Análisis de la Supervivencia

El ensayo duró 21 d, transcurrido este tiempo se procedió a contar y recolectar los animales sobrevivientes registrando los signos externos, aspecto del tracto digestivo (vacío o lleno), coloración, etc. Se tomaron sub muestras para PCR (de todos los

tratamientos) e histología, muestreándose camarones con coloración rosada y azules de los tratamientos de 33 °C. Se verificó así mismo el peso.

Durante el ensayo no se observó mortalidad en ninguno de los tratamientos.

3.1.3. Prevalencia Inicial y Final de la Población de Estudio

El análisis de PCR en la población utilizada para el estudio (animales del invernadero #1) mostró una prevalencia inicial del 6 %, al 95 % de confianza.

3.1.4. Índice Histológico de WSD

En el tratamiento de hipertermia se observó animales de color rosado. Este signo clínico externo es muy común de WSD, los cuales al ser retirados del agua se encorvaban y luego de unos minutos morían, y animales de apariencia azules. Se realizó el análisis histológico a animales de color rosado y azules para poder hacer diferencias en cuanto a nivel de infección en sus tejidos.

El análisis histológico mostró que los dos grupos de animales (Rosados y Azules) presentaron células infectadas (núcleos hipertrofiados, eosinófilos a basófilos y cromatina marginada) en los siguientes tejidos: los **Rosados**. Cerebro, epitelio cuticular general, tejido conectivo, intestino y branquias (Fig. 11) y los **Azules**. Branquias, tejido conectivo, epitelio cuticular general y corazón (Tabla N° 9) (Fig. 12).

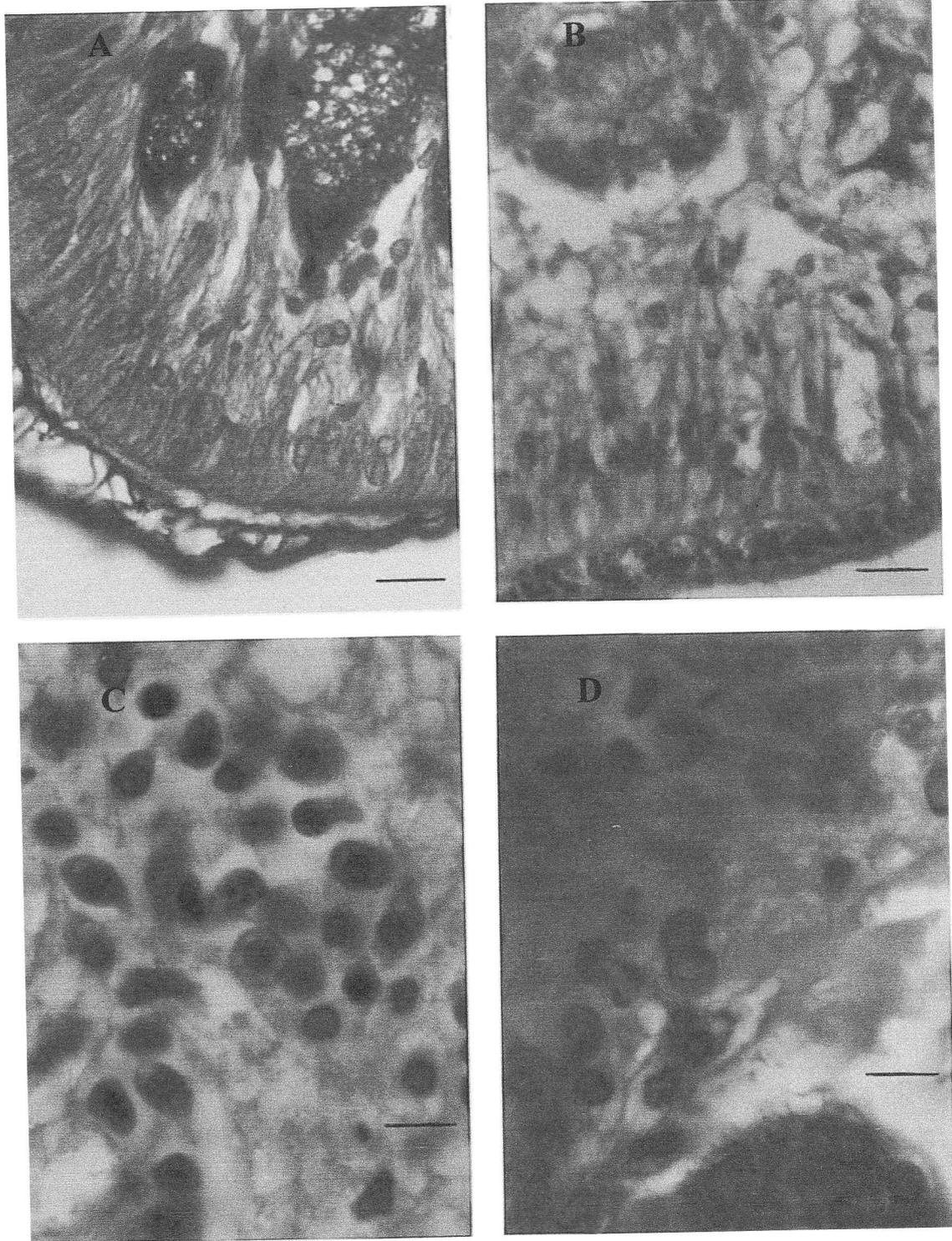


Figura 11. Microfotografías de órganos y tejidos del camarón *L. vannamei* de coloración Rosados: (a y b) Región Oral, barra 30 μm , (c) Tejido Conectivo, barra 10 μm , (d) Boca, barra 10 μm . (H&E).

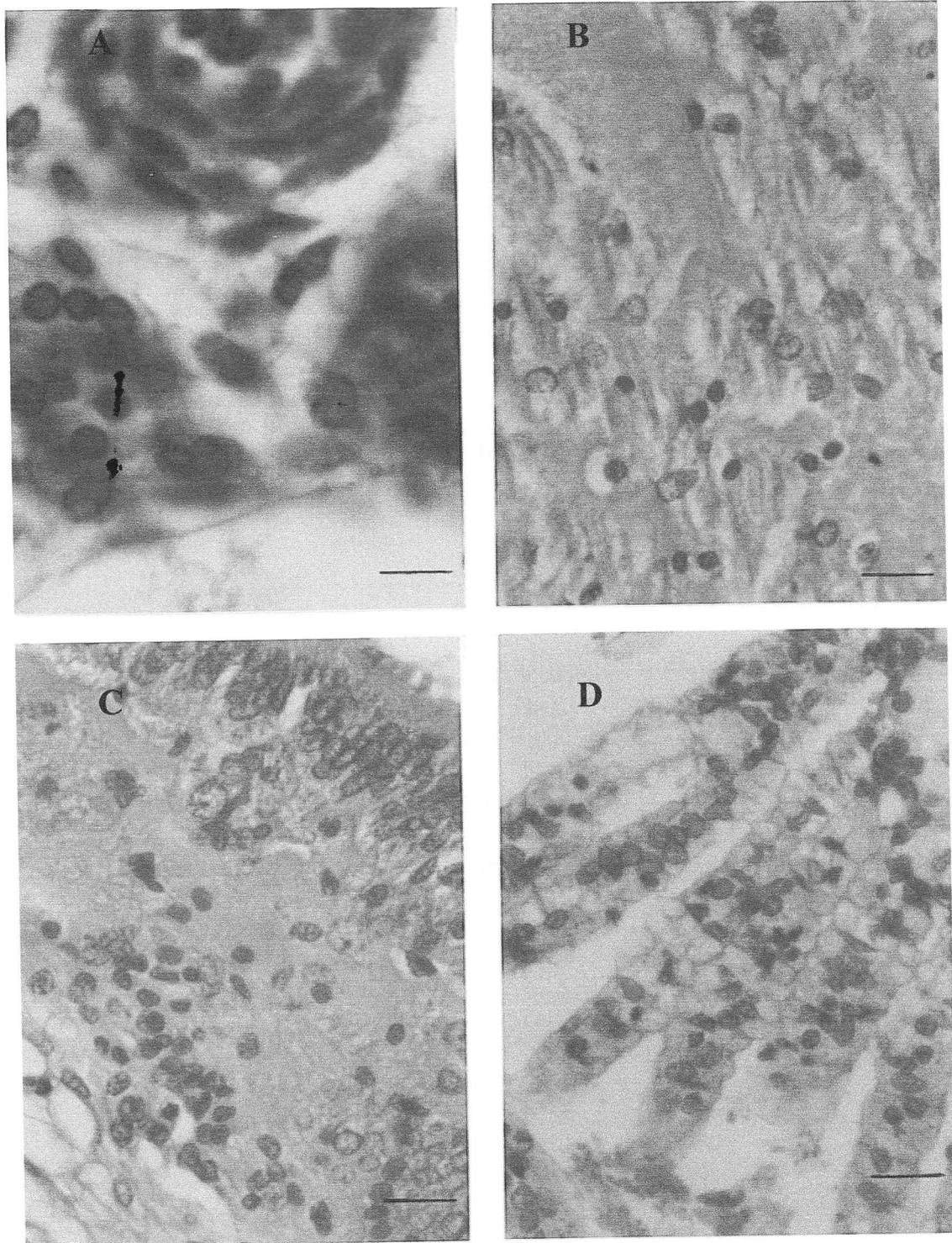


Figura 12. Microfotografías de órganos y tejidos del camarón *L. vannamei* de coloración Azul: (a) Órgano Linfoide, barra 10 μm , (b) Corazón, barra 30 μm (c) Estómago, barra 30 μm , (d) Branquias, barra 30 μm . (H&E).

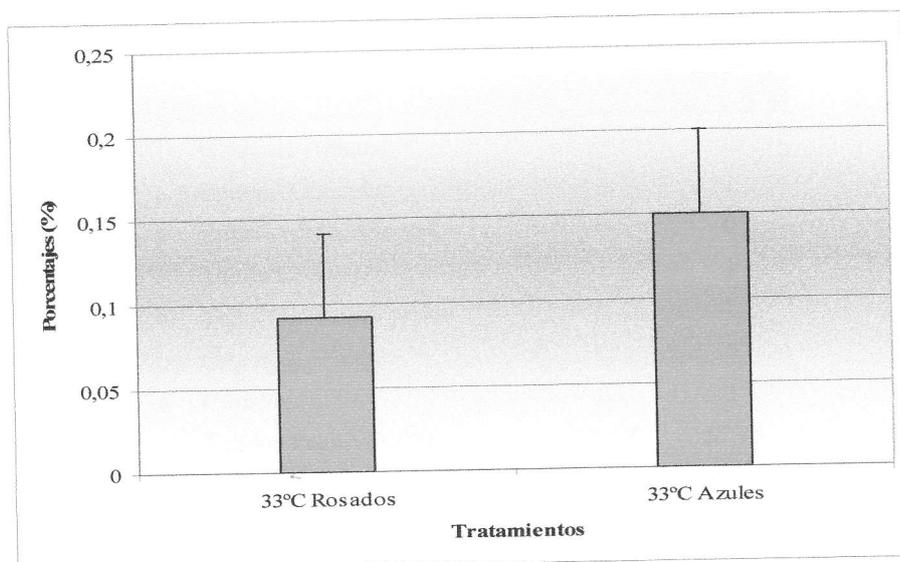


Figura 13: Índice Histológico de WSD de animales Rosados y Azules del tratamiento de temperatura 33 °C.

Los órganos que se infectaron en ambos grupos de animales fueron el tejido conectivo como se muestra en la Tabla N° 9, cerebro y branquias en los cuales la severidad de la infección fue de grado 2 en la mayoría de los camarones. Los animales que estuvieron más infectados fueron los de coloración azul (45,45 % de animales muestreados), en tanto que el porcentaje de infección en los animales de coloración rosada fue del 36,36 %.

Tabla N° 9: Lesiones de tejidos y porcentajes de camarones positivos para WSSV en la población de estudio (Rosados y Azules a 33 °C.)

TRATAMIENTO		Rosados	Azules
T	Glándula Antenal	0	0
e	Epitelio Cuticular	1	1
j	Epitelio del Estómago	0	0
i	Tejido Conectivo	1	1
d	Tejido Hematopoyético	0	1
o	Órgano Linfoide	0	0
s	Corazón	0	1
	Tejidos Positivos (%)	28,57	57,14
	Animales Positivos (%)	36,364	45,455
	Total Animales Observados	11	11

Se observó además células vacías y con fragmentación del núcleo encontrándose en mayor proporción tanto en nivel como en número, principalmente en los animales de coloración azules (Fig. 14). Estas lesiones han sido observadas en animales enfermos de WSD (Panchana, comunicación personal). Sin embargo este signo no es típico de WSD y los resultados de PCR para WSSV fueron negativos en estos animales.

Se detectó infiltración de hemocitos fundamentalmente en tejido conectivo del estómago, también en corazón, apéndices bucales y branquias.

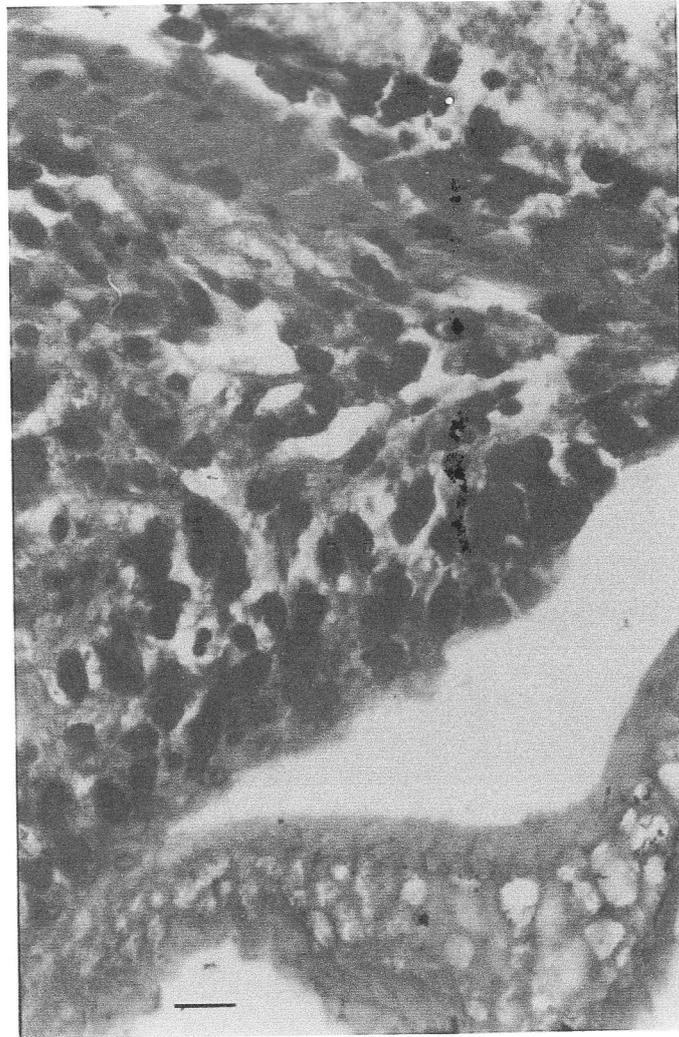


Figura 14. Microfotografías de epitelio cuticular del estomago del camarón *L.*, barra 30 μm . (H&E).

3.1.5. Análisis Microbiológico

Se realizó análisis microbiológico a camarones de coloración rosada que estuvieron a temperatura de 33 °C a manera de control y camarones que estuvieron a temperatura ambiente. los resultado se presentan en la Tabla N° 10.

Tabla N° 10: Resultados de los análisis microbiológico a los animales de coloración rosada.

	AM	TCBS
Rosados	6.03×10^3	1×10^3
Azules	1.383×10^3	0

3.1.6. Análisis de Pesos Finales

El análisis de peso final mostró que no existió diferencias significativas ($p=0,15$) (Anexo 2) entre los tratamientos y que los animales tuvieron la misma tasa de crecimiento (0.74 g/semana) independientemente de la temperatura (Fig. 15).

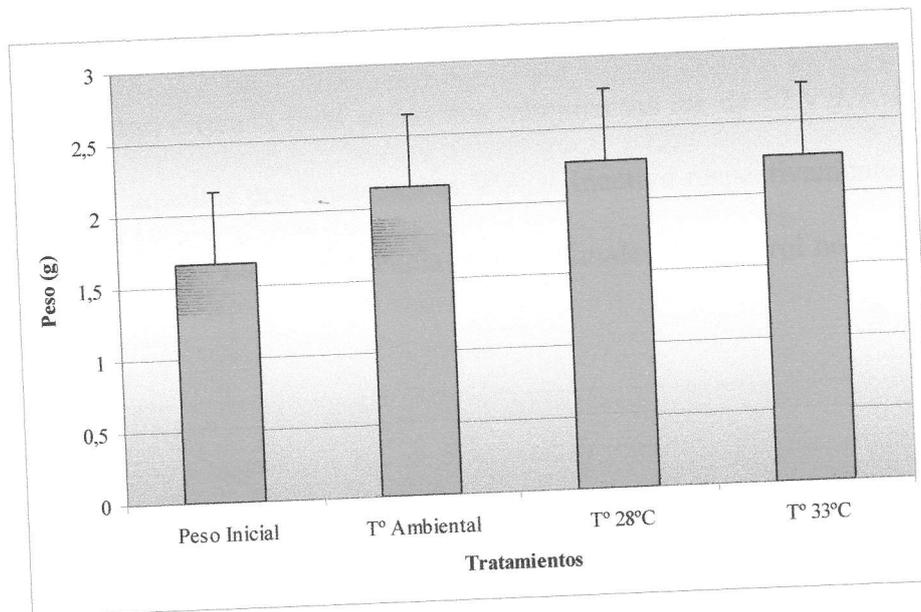


Figura 15: Promedios de Pesos de animales de los 3 tratamientos luego de 21 días de cultivo y peso Inicial.

3.2. ENSAYO II.

A los 7 d de haber empezado el desafío con WSSV se tuvo que finalizar el ensayo debido a que en uno de los tratamientos (Tratamiento N° 3) quedó un número reducido de animales necesitándose para el análisis histológico, 20 animales sobrevivientes por tratamiento. El desafío se lo realizó a temperatura ambiente.

3.2.1. Análisis de la Supervivencia

3.2.1.1. SPF vs WSSV Inactivo. La mortalidad se inició a las 24 h p.i. El porcentaje de supervivencia en este momento fue del 96,3 y 99 % en los tratamientos (animales SPF y animales pre-tratados con virus inactivo respectivamente). La mortalidad llegó al 55,3 y 57 % a las 72 h p.i no existiendo diferencias significativas ($p=0,72$) (Anexo 3), la supervivencia final en los dos tratamientos fue de 12 y 9,7 % para los animales SPF y aquellos pre-expuestos al WSSV Inactivo respectivamente, como se muestra en la Fig. 16. La supervivencia de los animales del control no infectado fue del 100 %.

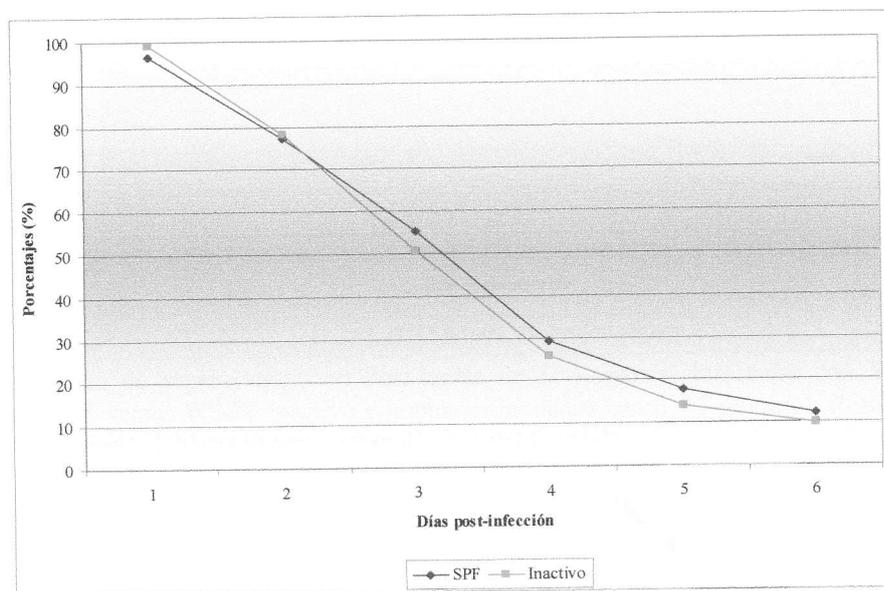


Figura 16: Curva de supervivencia de Post-larvas de *L. vannamei* de 2 tratamientos (SPF y WSSV Inactivo) infectados con WSSV. Resultados de la presente investigación. Elaborado por Yomara De la Cruz González.

3.2.1.2. SPF + Glucano vs WSSV Inactivo + Glucano. La mortalidad se inició a las 24 h p.i. El porcentaje de supervivencia observado en este momento fue del 98 y 100 % en los dos tratamientos (SPF + Glucano versus Virus Inactivo + Glucano

respectivamente), llegando a una supervivencia de 27 y 32 % a las 96 h p.i, no existió sin embargo diferencias significativa entre los tratamientos ($p=0,43$) (Anexo 4). La supervivencia final en los dos tratamientos fue de 10 y 17 % para los animales SPF + glucano y los animales expuestos a WSSV tratados con Inactivo + glucano respectivamente como se muestra en la Fig. 17. La supervivencia de los animales del control no infectado fue del 100 %.

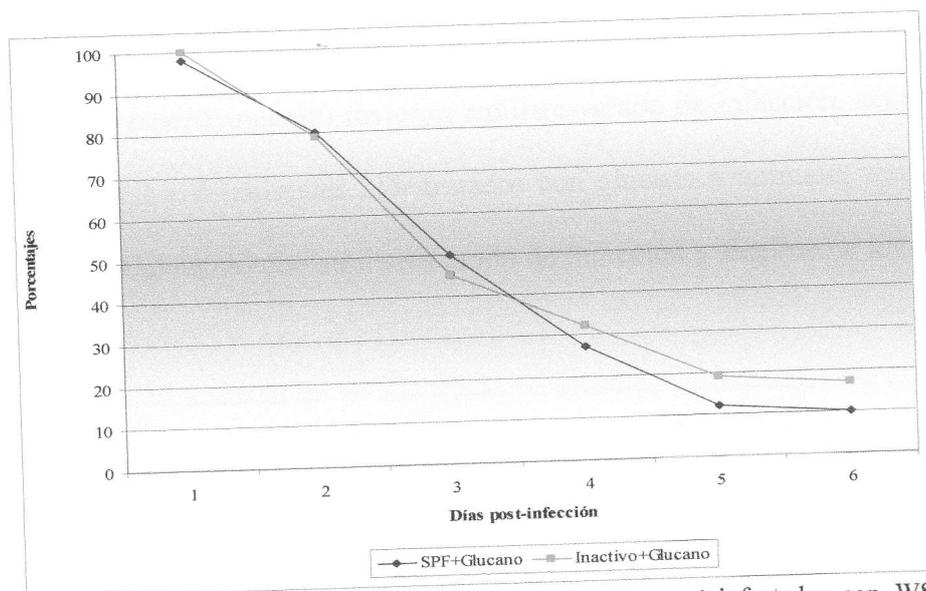


Figura 17: Curva de supervivencia en Post-larvas de *L. vannamei* infectadas con WSSV de 2 tratamientos (SPF versus WSSV Inactivo e inmunoestimulados con β -1,3-glucano). Resultados de la presente investigación. Elaborado por Yomara De la Cruz González.

3.2.2. Análisis histopatológico en la población infectada por WSSV

Los resultados de histología, obtenidos en la muestra de camarones tomados a las 168 h p.i mostraron que la infección experimental se había realizado exitosamente.

Se determinó diferencias en niveles de infección mediante histología. En los tejidos se investigó el grado de lesiones típicas de WSD, necrosis, Picknosis, así como la respuesta celular del hospedero (hemocitos infiltrantes, esferoides).

Obteniendo los resultados que se muestran en la Fig. 18 y la tabla N° 11 donde se observa que los animales más infectados fueron los del tratamiento 3 (tratados con Virus Inactivo). Los del tratamiento 1 y 5 (animales SPF y animales tratados con Virus Inactivo respectivamente) tuvieron similares grado de infección, seguidos por los tratamientos 2 y 4 (animales SPF tratados con glucano y animales tratados con Virus Inactivo + glucano) con similares grado de infección y finalmente los animales del tratamiento 6 (WSSV Activo + Glucano).

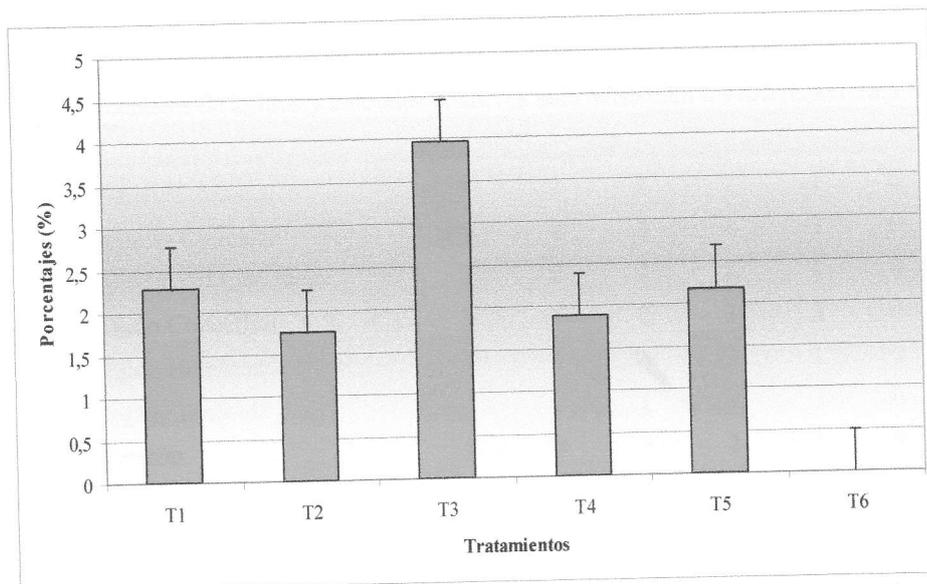


Figura 18: Índice Histológico WSSV de animales sobrevivientes de 6 tratamientos luego de ser infectados experimentalmente. Cada punto es un promedio de 5 camarones.

Los animales de los tratamientos 3 y 5 (Tabla N° 11) mostraron infección en grado 4 con el 100 % de la población infectada en los tejido hematopoyético, epitelio

cuticular del estómago, órgano linfoide, glándula antenal, intestino, branquias, tejido conectivo, corazón y epitelio cuticular general.

En animales de los tratamientos 1, 2 y 4, los tejidos infectados fueron: glándula antenal, epitelio cuticular del estómago, tejido hematopoyético, intestino, branquias, tejido conectivo y epitelio cuticular general, corazón; en animales de los tratamientos 1 y 4, órgano linfoide en los animales del tratamiento 2, dando como resultado el 80 % de infección en grado 4 de la población analizada de los tratamientos antes mencionados.

En los animales del tratamiento 6 no se encontró células infectadas por WSSV.

Tabla N° 11: Porcentajes de tejidos y animales positivos para WSSV en los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTO	T1	T2	T3	T4	T5	T6
T Glándula Antenal	3	2	3	2	2	0
e Epitelio Cuticular	4	2	3	1	2	0
j Epitelio del Estómago	2	2	2	2	1	0
i Tejido Conectivo	3	3	2	3	3	0
d Tejido Hematopoyético	2	1	3	2	1	0
o Órgano Linfoide	0	1	1	0	1	0
s Corazón	1	0	3	2	1	0
Tejidos Positivos (%)	85,7	85,7	100	85,7	100	0
Animales Positivos (%)	80	80	100	80	100	0
Total Animales Observados	5	5	3	5	3	2

3.2.3. Signos externos en la población infectada por WSSV

Todos los camarones que murieron (agudos), manifestaron coloración rojiza del cuerpo y manchas blancas que fueron observadas en el interior del caparazón pero no visibles a simple vista. Los camarones también mostraron aspecto lechoso y movimientos erráticos.

Los signos externos en la población que sobrevivió al desafío (crónicos) fueron: aspecto lechoso, manchas blancas y cola roja.

4. CONCLUSIÓN

- Mediante PCR se detectó una prevalencia para WSSV del 6 % en la población original del invernadero.
- Se mantuvo la calidad del agua con el sistema Air-Lift sin recambios de agua, manteniéndose un buen nivel de oxígeno y de amonio.
- Los rangos de los valores de temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH, correspondiente a los tres tratamientos estuvieron en rangos considerados normales para el buen desarrollo de los camarones.
- Posiblemente debido a la buena calidad del agua en el medio no existió mortalidad por WSSV en ninguno de los tratamientos, a pesar de la presencia de WSD detectado por histología.
- En cuanto a pesos por tratamientos no se encontró diferencia entre los tratamientos.
- No se encontró diferencias entre animales rosados y azules, ni en carga viral ni en carga bacteriana.

- En el análisis histológico de animales de color rosado y azules no se observaron diferencias en cuanto al índice de WSD.
- La supervivencia final de post-larvas de *L. vannamei* desafiadas con WSSV no se incrementó con el uso de β -glucanos.
- Ninguno de los tratamientos mostró mejor supervivencia luego del desafío.
- Los Tratamientos 5 y 6 no soportaron la reinfección.
- El nivel de infección encontrado al tercer día produjo más del 50 % de la mortalidad para todos los tratamientos.
- El ANOVA de medidas repetidas no encontró que los β -glucano tuvieran un efecto positivo en la supervivencia durante el período 0 - 144 h post infección.
- Los sobrevivientes del tratamiento 6 fueron negativos para WSD. Sin embargo trabajar con este tipo de animales resultó poco práctico. Ellos resultaron muy sensibles obteniéndose pocos sobrevivientes antes del segundo desafío.

DISCUSIÓN

Este trabajo estuvo enfocado por una parte en encontrar si dentro del cuerpo de agua de los cultivos en las camaroneras se encuentra el virus y si existe un brote de WSSV, si se presenta una baja de temperatura por unos días en el campo de cultivo.

La temperatura es un agente externo principalmente muy importante en el sistema de producción. Con respecto a los resultados obtenidos con temperatura, en el presente estudio, no hubo diferencias significativas, a los 21 días de experimento en cuanto a peso, por ende se ha propuesto que a temperaturas más elevadas exista mayor resistencia a las infecciones por WSSV. Se ha evidenciado que temperaturas de 31 – 33 °C tienen un efecto protector sobre el impacto del WSSV en el camarón (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002b). Vidal *et al.* (2001) observaron diferencias en supervivencia de camarones cultivados en las costas del océano Pacífico (aguas frías) versus aquellos de las costas del Caribe (aguas calientes). En Ecuador las mayores supervivencias se reportaron en temporadas de invierno donde las temperaturas del agua fluctúan entre 29 y 31 °C (Sonnenholzner *et al.*, 2002b); así mismo desafíos experimentales a camarones con WSSV en campo y laboratorio corroboran estas observaciones (Sonnenholzner *et al.*, 2002^a, 2002b, 2002c), no se observó mortalidad en este bioensayo.

Por otra parte se enfocó también en el estudio de los mecanismos de defensa celular en camarones inmunoestimulados con β -glucano e infectados con WSSV pero capaces de enfrentar la agresión viral. En la hipótesis de trabajo se postuló que los animales inmunoestimulados con β -glucanos en etapas tempranas (PL27) durante 9 días con β -1,3-glucano, estaban mejor preparados para enfrentar desafíos virales que los animales no inmunoestimulados y por ende deberían tener mejores supervivencias.

Para comprender como se manifiesta la defensa inmunitaria del camarón ante la presencia de procesos infecciosos como las patologías virales, es importante considerar el método de infección. En ensayos con infecciones virales o desafíos, un factor importante a considerar en el momento de analizar los resultados es la eficiencia de la infección. Es importante poder asegurar que la infección ha sido adecuada para atribuir la mortalidad de los animales a la exposición al virus. Existen varios métodos para desafiar de manera experimental a crustáceos en laboratorio como: inyección de un extracto de tejido infectado (Tapay *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2003), inmersión en agua conteniendo extracto viral (Chou *et al.*, 1995; Chou *et al.*, 1998) e ingestión de tejido infectado (Lightner y Redman, 1998). Se escogió el método de infección por ingestión por ser el más usado, porque recrea las vías de transmisión natural del virus durante los brotes (Lotz y Soto, 2002; Lightner *et al.*, 1998) y porque es la ruta dominante de infección una vez que la epidemia ha comenzado en los estanques (Lotz y Soto, 2002).

La desventaja de este método es que no se puede controlar la carga viral ya que se administra el tejido infectado directamente (Soto *et al.*, 2001) en contraste con los métodos de inmersión ó inyección en donde la carga viral puede ser manipulada (Chou *et al.*, 1998; Vidal *et al.*, 2001; Echeverría *et al.*, 2002), e incluso disminuida (Chang *et al.*, 1999).

Los resultados demostraron que el efecto de los β -1,3 glucanos en grupos infectados con WSSV inactivo tuvo un carácter selectivo, es decir que observa un efecto significativo. Este efecto se vió reflejado como una respuesta a la inmunoestimulación en una solo grupo, el tratamiento 4 (éste grupo había presentado la mayor supervivencia en el bioensayo).

El análisis de la supervivencia por el método ANOVA no detectó diferencias significativas entre los tratamientos. Las primeras mortalidades se observaron a las 12 h post infección, registrándose una mortalidad acumulada del 50% a la 72 h. Se considera que hubo una reacción viral muy fuerte durante este período ya que generalmente en los experimentos de laboratorio utilizando el WSSV las mortalidades inician entre las 24 a 48 h post infección (Chou *et al.*, 1995; Lightner *et al.*, 1998). Al respecto Chou *et al.* (1998) sostienen que el WSSV tiene su pico de replicación en el período 24 a 48 h post infección y es capaz de infectar la totalidad de los órganos (Chang *et al.*, 1996).

Un factor que incidió en la mortalidad del presente ensayo fue el canibalismo el cual se observó durante todo el desafío pese al esfuerzo por retirar los cadáveres en cada muestreo. El consumo de los animales muertos implicó una maximización del proceso infeccioso y una mayor diseminación del virus vía reinfección. Este efecto aditivo de cohabitación y canibalismo se ha reportado también en experimentos realizados con *Macrobrachium rosenbergii* desafiados con el WSSV, encontrándose un aumento significativo en el canibalismo y la tasa de mortalidad debido a la presencia de animales muertos (Pramod-Kiran *et al.*, 2002).

Durante el período 56 a 156 h el cual está caracterizado como un período de infección aguda (Lotz y Soto, 2002) la mortalidad aumentó y el efecto β -glucano dejó de ser significativo. En esta etapa las combinaciones WSSV Inactivo y β -glucanos PL27 presentaron las mayores supervivencias (17%). Una explicación sería que la alerta inmunitaria inicial en los tratamientos con WSSV Inactivo y β -glucanos no pudo sostenerse por mucho tiempo debido a su alto costo energético (Sánchez *et al.*, 2001). Otra explicación sería que la carga viral se haya visto favorecida por las bajas densidades a las que se realizaron los ensayos, por los procesos de reinfección debidos al canibalismo o por la concentración viral de la papilla misma, todos estos factores pudieron haber aumentado tanto la carga viral que finalmente superó la capacidad inmunitaria del hospedero (Lightner *et al.*, 1998). Las supervivencias finales no fueron significativamente diferentes y variaron entre un 9,7 a 17%.

En términos generales hay muy pocos camarones supervivientes en desafíos de laboratorio con el WSSV (Lotz y Soto, 2002). Al respecto Chou et al. (1995); Lightner et al. (1998) reportan supervivencias finales entre 0 y 2,9 % en desafíos virales utilizando 3% de biomasa de camarones infectados con el WSSV en un período de 12 días. Resultados similares de bajas supervivencias finales (12 %) son reportados en desafíos de 15 días de duración utilizando postlarvas (PL 15) de *P. monodon* desafiadas con el WSSV e inmunoestimuladas con dosis de β -glucanos de 2 g/Kg de alimento (Chang et al., 1999).

Durante este ensayo sólo se observó la mortalidad y no se midieron otros parámetros inmunitarios, sin embargo podría suponerse que la mayor supervivencia observada en este período estaría relacionada con un aumento de la respuesta inmunitaria de los animales que recibieron β -glucano (Rengpipat *et al.*, 2000; Gullian, 2001) en especial a una mayor actividad de los hemocitos hialinos los que no son infectados por el WSSV (Wang *et al.*, 2002) y pudieron estar comprometidos en procesos de fagocitosis, encapsulación ó nodulación de partículas virales justo al inicio de la infección como una respuesta celular inmediata (Montesdeoca, 2001).

RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar el sistema Air-lift para mantener la calidad del agua en la producción de camarón.
- Con las muestras de camarones recogidas durante los muestreos del primer bioensayo se recomienda realizar análisis histológico para confirmar el grado de infección de WSSV en los diferentes tejidos, también se recomienda realizar hibridación *in situ* para confirmar la infiltración de los hemocitos granulados y semigranulosos en los tejidos infectados.
- Se recomienda utilizar glucanos (β -1,3-glucano) en larvicultura dado sus efectos benéficos como inmunoestimulantes.
- De igual manera se recomienda realizar más desafíos virales utilizando animales SPF y administrando β -1,3-glucano durante la primera fase de crecimiento con la finalidad de obtener la suficiente consistencia estadística que reafirme los beneficios de esta estrategia de inmunoestimulación ante desafíos con el WSSV.

BIBLIOGRAFÍAS

- Aguirre, G., and Ascencio, F., 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. Unidad de patología marina. Centro de investigaciones biológicas del noroeste (CIBNOR). Costa., La Paz, B.C.S. México. AP 128, C.P. 23000. 1-21.
- Alday de Graindorge, V. 1999. Diagnóstico y prevención de la enfermedad del Punto Blanco. Panorama Acuícola. Vol. 4, N° 4, pp. 27-29.
- Alday de Graindorge, V. & Griffith, D. 2000. Ecuador. In: Thematic review on Management Strategies for Major Diseases in Shrimp Aquaculture. A component of the WB/NACA/WWF/FAO Program on Shrimp Farming and the Environment. Report of the workshop held in Cebu, Philippines from 28-30 November 1999. pp. 17-19.
- Álvarez, J. D., Claudia Agurto, R., Obregón, J., y Peroza, L. 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-LUZ / Vol. XIII, N° 4, 255-262.

- Arala, M., and Sequeira, T., 2000. Is there any adaptive immunity in invertebrates? *Aquaculture* 191, 247-258.
- Bachere, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. UMR219. Defense et Resistance chez les Invertébrés Marins. IFREMER/CNRS, CC80. Université Montpellier 2, Place E. Bataillon, Montpellier 34095. France. *Aquaculture* 191, 3-11.
- Bell, T. A. and D. V. Lightner. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. Special Publication of The World Aquaculture Society. Baton Rouge. Louisiana. USA.
- Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. En : Cruz Suárez, L. E., D. Ricque-Marie, M. Tapia. Salazar, M. A. Olvera-Novoa, y R. Civera-Cerecedo, (eds.). Avances en Nutrición Acuícola, Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Bray, W. A., Lawrence, A. L. y Leung-Trujillo, J. R. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observation on interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture* 122, pp. 133-146.

Calderón, J., B. Bayot, I. Betancourt, y V. Alday, 1999. Monitoreo del Virus de la mancha Blanca en Ecuador: 20 de junio-14 de julio de 1999. *El Mundo Acuícola*. Fundación CENAIM-ESPOL, 5(2): 11-14.

Calderón, J., Sonnenholzner, S., 2002. Uso de los Invernaderos como una alternativa de producción camaronera en Ecuador. *El mundo Acuicola* (8) 2. 7-11.

Calderón, J., Sonnenholzner, S., 2003. Cultivo de camaron Experiencias y desafíos en el uso de invernaderos. *El mundo acuicola* (9)1. 4-8.

Chadwick, J. S., and Dunphy, G. B. 1986. Antibacterial and antiviral factors in arthropod hemolymph. In: Gupta, A. P. (Editor) *Hemocytic and Humoral Immunity in Artropods*. Jhon Wiley and Sons, Inc., Chichester: 61-77.

Chang, C. F., Chen, H. Y., Su, M. S., Liao, I. C. 2000. Immunomodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 10: 505-14.

Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen, y I. C. Liao. 2003. Dietary β -1,3-betaglucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology* 00, 1-14.

- Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., Lo, Kou, G.H., Liao, I.C. 1999. Effect of dietary beta-1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 36, 163-168.
- Chang, P. S., C. F. Lo, Y. C. Wang, G. H. Kou. >In Press=. Detection of white shrimp syndrome associated virus (WSSV) in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridization. Aquaculture. (Proceedings of the Second International Conference on the Culture of Penaeid Prawns and Shrimp. 14-17 May, 1996, SEAFDC, Iloilo, Philippines).
- Chang, P.S., Lo, C.F., Wang, Y.C., Kou, G.H., 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in shrimp, *Penaeus monodon*, by in situ hybridization. Dis. Aquat. Org. 27, 131-139.
- Chen, J.C., Lin, M.N., TingY.Y., Lin, J.N., 1995. Survival, haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinities and temperature levels. Comp. Biochem. Physiol. A 110, 253-258.
- Chen, X. F., Chen, C., Wu, D. H., Huai, H. & Chi, X. C. (1997). A new baculovirus of cultured shrimp. Sci China Ser C 40, 630-635.

- Cheng, W. y Chen, J. C. 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosembegii*. Fish and Shellfish immunology. 10: 387-391.
- Chisholm, J.R.S., Smith, V.J., 1994. Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, with temperature. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 74, 979-982.
- Chou, H.Y., Huang, c.Y., Wang, C.H., Chiang, H.C., Lo, C.F., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaei shrimp in Taiwan. Dis. Aquatic. Org. 23, 165-173.
- Chou, H. Y., Huang, C., Lo, C. C., y Kou, G. H. 1998. Studies of transmisión of white spot síndrome associated baculovirus (WSB) in *Penaeus monodon* and *Penaeus japonicus* via water-borne contact and oral ingestion. Aquaculture. 164: 263-276.
- Christensen, Nappi, 1988. Immune Responses of Arthropods Animal and Plant Sciences.

- CSIRO. 2002. Impact of Infectious Agents on Farming and Food Production: Global Impact of Newly Emergent Pathogens on Shrimp Farm Production. Accessed From. http://ftp.cdc.gov/pub/infectious_diseases/iceid/2002/pdf/walker.pdf
- De la Peña, L. D., T. Tamaki, K. Momoyama, T. Nakai y K. Moruga. 1993. Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 115, pp. 1-12.
- Drach, P. 1938. Mue et cyclus d'intemue chez les crustacés décapodes. *Ann Inst. Oceanogr.* 49: 103-391.
- Durand, S., Lightner, D. V., Redman, R. M., Bonamí, J. R. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.* 29, 205-211.
- Echeverría, F., V. Otero, F. Cornejo, y J. Rodríguez. 2002. WSSV y ciclo de muda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *El Mundo Acuícola*, Vol. 8, No.1, Fundación Cenaim-Espol, Guayaquil, Ecuador, pp. 43-46
- Engstd, R. E., 1994. Yeast β -Glucan as an immunoestimulant in atlantic salmon (*Salmo salar* L.). A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of doctor scientarum. University of Tromso, Norway.

- Fearon, D. T. and Locksley, R. M. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-54.
- Feder, M. E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperons, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 61: 243-282.
- Flegel, T. W., S. Boonyaratapalin and B. Withyachumnankul. 1997. Progress in research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In: T. W. Flegel and I. H. MacRae, eds. *Diseases in Asian Aquaculture III. Fish Health Section*, pp. 285-295. Manila, Asian Fisheries Society.
- Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L. and Brown, F. (editors) 1991. *Classification and Nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol Supplementum 2.*
- Ge, H. and J. Huang. 2000. Regional hyperthermia in the treatment of primary hepatic carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 74: 193-195.
- González, D. J. 2002. El virus de la mancha blanca: Un ejemplo de vulnerabilidad en la camaronicultura de la Región de América Latina y el Caribe.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). pp. 1-3.

Granja, C. y Salazar, M., 2001. Una revisión acerca de los mecanismos de la respuesta inmunológica del camarón. *Panorama Acuícola*. 6(6), 8-9.

Gullian, M., 2001. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus Vannamei*. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL. Guayaquil-Ecuador. Pp. 1-55.

Han, W. B., Y. H. Wang, J. L. Fryer, K. K. Yu, H. Fukuda, and Q. X. Meng. 1998. White spot syndrome virus infection of culture shrimp in China. *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 405-410.

Hasson, K. W. Lightner, D. V., Mohny, L., Redman, R. M. y White, B. M. 1999. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*.

Hernández-Rodríguez, A., Alceste-Oliviero, C., Sánchez, R., Jory, D., Vidal, L. & Constain-Franco, L.-F. 2001. Aquaculture development trends in Latin America and the Caribbean. *In*: R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery & J.R. Arthur, eds. *Aquaculture in the Third*

Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000. pp. 317-340. NACA, Bangkok and FAO, Rome.

Hilderbrandt, B., P. Wust, B. Rou, P. Schlag, and H. Riess. 2000. Regional Hyperthermia for rectal cancer. *Lancet* 356: 771-772.

Hose, J. E., Martin, G. G., Tiu, S., y McKrell, N., 1992. Patterns of hemocyte production and release throughout the molt cycle in the penaeid shrimp *Sicyona in entis*. *Bioll. Bull.* 183: 185-199.

Inouye, K., Miwa, S., Oseko, N., Nakano, H., Kimura, T., Monoyama, K., and M. Hiraoka. 1994. Mass mortalities of cultures kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathology* 29: 149-158.

Inouye, K., Yamano, K., Ikeda, N., Kimura, T., Nakano, H., Momoyama, K., Kobayashi, J. and Miyajima, S. 1996. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) which causes penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol.*, 31, 39-45.

Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*,

alter oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164: 277-288.

Jimenez R., R. Barniol, L. de Barniol y M. Machuca. 2000. Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Diseases of Aquatic Organisms* 42 (2), pp. 91-99.

Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191, 45-52.

Johansson, M.W., Söderhäll, K., 1989. Cellular immunity in crustacean and the proPRO system. *Parasitol. Today* 5, 171-176.

Kimbrell, D.A., Beutler, B. 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat. Rev. Gen.* 2, 256-67.

Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., *Aquacop.* 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostry* in relation with the moult cycle : protection against vibriosis. *Fish Shellfish Immunol* 7, 227-34.

Le Moullac, G., Soyeux, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C. and Levy, P. 1998.

Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Fish and Shellfish Immunology, (: 621-629.

Lee S.O., Soderhall, K. 2002. Early events in crustacean innate immunity. Fish Shellfish Immunol. 12:421-437.

Lightner, D. V. 1996a. The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. >Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties= 15(2):579-601.

Lightner, D. V., and Redman, R. M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Department of Veterinary Science, University of Arizona, Tucson. AZ 85721, USA. Aquaculture 164: 201-220.

Lightner, D. V., ed. 1996b. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Section 3: Viruses. World Aquaculture Soc., Baton Rouge, LA.

Lightner, D.V. & Redman, R.M. 1998b. Emerging crustacean diseases. *In*: Third International Symposium on Aquatic Animal Health, Aug 30-Sept 3, 1998, Baltimore, Maryland, USA. 6 pp.

Lightner, D.V. 1996a. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two Penaeidshrimp viruses in the Americas. *Revue Scientifique et Technique, OIE* 15(2): 579-602.

Lightner, D.V. 1996b. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured Penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA. The World Aquaculture Society.

Lightner, D.V. In Press. Introduction of pathogens and diagnostic protocols. *In*: T. D. McIlwain, M. Broussard, and G. Pruder, eds. Highlight Summary Report: National Workshop: Integrated Assessment of Shrimp Pathogens. June 18-19, 1996, New Orleans, LA.

Lightner, D.V., 1996. A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 305 pp.

- Lightner, D.V., Redman, R.M., Poulos, B.T., Nunan, L.M., Mari, J.L. and Hasson, K.W. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 16: 146-160.
- Lo, C. F., J. H. Leu, C. H. Chen, S. E. Peng, Y. T. Chen, C. M. Chou, P. Y. Yeh, C. J. Huang, H. Y. Chou, C. H. Wang, and G. H. Kou. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms 25:133-141.
- Lo, C. F., Ho, C. H., Chen, C. H., Liu, K. F., Chiu, Y. L., Yeh, P. Y., Peng, S. E., Hsu, H. E., Liu, H. C., Chang, C. F., Su, M. S., Wang, C. H. and Kou, G. H. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. Dis. Aquat. Org. 30, 53-72.
- Lo, C. F. and Kou, G. H. 1998. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwán: a review. Fish Pathol. 33, 365-371.
- López, N., G. Cuzon G., Gaxiola, G., Tabeada, M., Valenzuela, C., Pascual, A., Sánchez, y C. Rosas. 2003. Physiological, nutritional, and immunological role

of dietary β -1,3-glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 224: 223-234.

Lotz, J.M. 1997. Disease control and pathogen status assurance in an SPF-based shrimp aquaculture industry, with particular reference to the United States. *In*: T.W. Flegel & I.H. MacRae eds., *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section, pp. 243-254. Manila, Asian Fisheries Society.

Mc Clennen, C. 2004. White Spot Syndrome Virus. The Fletcher School. Pp. 1-104.
<http://fletcher.fufts.edu>.

Medzhitov, R. and Janeway, C. A. Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-298.

Mohan, C. V., Shankar, K. M., Kulkarni, S. and Sudha, P. M. 1998. Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Dis. Aquat. Org.* 34, 9-12.

Montesdeoca, M., Amano, Y., Echeverría, F., Betancourt, I., Panchana, F., Sotomayor, M., y Rodríguez, J. 2002. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en

el control de la enfermedad en los estanques. El mundo Acuícola,
Vol. 8, No. 1.

Moriarty, J. D. W. 1999. Diseases Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. Microbial Biosystem: New Frontiers Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Bell CR, Brylinsky M, Johanson-Green P (eds.), -atlantic Canada ÇSociety for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A and Summers, M. D. (editors) 1995. Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vienna & New York: Springer-Verlag.

Nakano, H., Koube, H., Umezaca, S., Monoyama, K., Hiraoka, M., Intuye, K., Oseko, N., 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in 1993: epizootiological survey and infection trial. Fish Pathol. 29, 135-139, (in Japanese).

Namikoshi, A., Wu, J., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M., Muroga, K., 2004. Vaccination trial with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. Aquaculture. 229, 25-35

Newman, S., 2000. Inmunoestimulantes. Panorama Acuícola. 5(5), 13-14.

Otero, V., Molina, C., Cedeño. R., Sotomayor, M., Rodriguez, J., 2000. Evaluación del efecto inmunoestimulantes de los B-glucanos. El Mundo Acuícola. 6(2), 46-51.

Pennypacker, C., A. S. Perelson, N. Nys, G. Nelson, and D. I. Sessler. 1995. Localized or systemic in vivo heat inactivation of human immunodeficiency virus (HIV) a mathematical analysis. Journal of Acquired Immune Deficiency. Syndrome of Human Retrovirus 1: 321-329.

Pramod Kiran, R.B., K.V. Rajendran, S.J. Jung, y M.J. Oh. 2002. Experimental susceptibility of different life-stages of the giant freshwater prawn, *Machrobrachium rosenbergii* (de Man), to white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Fish Diseases 25:201-207

Ponce-Pelafox J., C.A. Martínez-Palacios y L. G. Gross. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. Aquaculture 157 (1,2), 107-115.

- Pontiggia, P., G. B. Rotella, A. Sabato, and F. C. Cierto. 1996. Therapeutic hyperthermia in cancer and AIDS: an updated survey. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology Oncology* 15: 289-927.
- Rajan, P. R., P. Ramasamy, V. Purushothaman, y G. P. Brennan. 2000. White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp *Penaeus monodon* y *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 184: 31-44.
- Rendón, L., Echeverría, F., Bravo, M., Rodríguez, J., 2003. Ensayos inmunitarios in vitro, una herramienta para evaluar productos inmunoestimulantes. Centro Nacional de Acuicultura e investigaciones Marinas (CENAIM). *El Mundo Acuícola*. 25-27.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul, P. Menasaveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger prawn (*Penaeus monodon*) by a Probiotic bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191: 271-288
- Rodríguez, J., Cedeño, R., Molina, C., Otero, V., Valenzuela, E., Sotomayor, M. A. 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. In: Cruz-Suárez, L. E., Rieque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M. A. y Civera-Cerecedo, R., (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium*

Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.

Sánchez, A., C. Pascual, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac, G., y C. Rosas. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: The effect of acclimation. *Aquaculture* 198: 13-28.

Sequeira, T., Vilanova, m., Lobo-Da-Cunha, A., Baldada, L., Arala-Chavez, M., 1995. Flow cytometric análisis of molt-related changes in haemocytes types in male and female *Penaeus japonicus*. *Biol. Bull.* 189, 376-380.

Shi, Z., Huang, C., Zhang, J., Chen, D., Bonami, J.R. 2000. White spot syndrome virus (WSSV) experimental infection of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *J. Fish Dis.* 23: 285-288.

Smith and Söderhäll, 1986. Cellular Immune Mechanisms in the Crustacea. *Symposia of the Zoological Society of London*, N° 56, pp. 59-79.

Smith, V.J., Söderhäll, K., 1983. β -Glucan activation the of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. *Biol. Bull.* 164: 299-314.

Söderhäll K. and Hall, L., 1984. Lippolysaccharide induce activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocite lysate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 797 pp. 99-104.

Söderhäll, K. and Crenius, L. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*: 3-23.

Song, Y. L., Hsieh, Y. T., 1994. Immunostimulation of tiger shrimp *Penaeus monodon* hemocytes for generation of microbicidal substances-analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 201-209.

Song, L., Liv, J. J., Chan, L. C., Sung, H. H. 1997. Glucan induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Developments in Biological Standardisation* 90: 413-421.

Sonnenholzner, S., Rodríguez, J. y Calderón, J., 2002. Cultivos Experimentales de camarón en invernaderos. Centro Nacional de acuicultura e Investigaciones marinas (CENAIM). 4-6.

Sonnenholzner, S., Rodríguez, J., Pérez, F., Betancourt, F., Echeverría, F. y Calderón, J., ET AL., 2002. Supervivencia y repuesta inmune de camarones

juveniles *L. vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. *El mundo Acuícola*. 8(1). 50-55.

Soto, M.A. & Lotz, J.M. 2001. Epidemiological parameters of white spot syndrome virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. Setiferus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 9-15.

Staples, D. J., Heales, D. S. 1991. Temperature and salinity optima for growth and survival of juvenile banana prawns *Penaeus merguensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 154, 251-274.

Sung, H. H., Chang, H. H., Chang, J. C., Song, Y. L. 1998. Phenoloxidase activity of haemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal Invertebrate Pathology* 71 (1): 26-336.

Sung, Yang. Song. 1996. Enhancement of microbicidal Activity in the Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Via Immunoestimulation. *Journal of Crustacean Biology*, 16 (2): 278-284.

Sung, H. H., Kuo, G. H. and Song, Y. L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*, 29 (1): 11-17.

Takahashi, H., Ishikawa, G., Ueki, K., Azumi, K., Yokosawa, H., 1997. Oning and tyrosine phosphorylation of a novel invertebrate immunocyte protein containing immunoreceptors tyrosine-based activation motifs. *J. Biol. Chem.* 272, 32006-32010.

Takahashi, Y., Kondo, M., Itami, T., Honda, T., Inagawa, H., Nishizawa, T. 2000. Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). *Fish Shellfish Immunol* 10: 555-8.

Tapay, L. M., Lu, Y., Gose, R. B., Nadala, E. C. B., Jr, Brock, J. A and Loh, P. C. 1997. Development of an *in vitro* quantal assay in primary cell cultures for a non-occluded baculo-like virus of penaeid shrimp. *J. Virol. Methods*, 64, 37-41.

Teicher-Coddington, D., Rouse, D., Couch, J., Scardino, W. 1998. Characterization of water quality and partial budgets for experimental shrimp ponds in Alabama (abstract). In: DeVoe, M. R. (eds.), *World Aquaculture '98 Book of Abstracts World Aquaculture Society Annual Conference. Meeting, Las Vegas, NV, 15-19 Feb., p. 535.*

- Thörnqvist, P.O. & Söderhäll, K. 1997. Crustacean Immune reactions, a shortreview.
In: Flegel, T.W., Macrae, I.H. (eds.), Diseases in Asian Aquaculture III.
Fish health Section, Asian Fisheries Society, Manila, 203-218.
- Tobey, J., Clay, J., Vergene, F., 1998. Impactos económicos, ambientales y sociales del cultivo de camarón en Latinoamérica. Reporte de manejo de recurso costero II. Centro de Recursos costeros, Universidad de Rhode Island. 1-31.
- Tsai, M. F., Lo, C. F., Van Hulten, M. C. W., Tzeng, H. F., Chou, C. M., Huang, C. J., Wang, C. H., Lin, J. Y., Valk, J. M. and Kou, G. H. 2000. Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology*, 277, 92-99.
- Tsai, M. F., Yu, H. T., Tzeng, H. F., Leu, J. H., Chou, C. M., Huang, C. J., Wang, C. H., Lin, J. Y., Kou, G. H. and Lo, C. F. 2000. Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase. *Virology*, 277, 100-110.
- Tsing, A., Arcier, J.M., Bréhélin, M., 1989. Haemocytes of penaeidos and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms. *J. Invertebr. Pathol.* 53, 64-77.

- Van de Braak, C. B. T., M. H. A. Botterblom, E. A., Huisman, J. H. W., Robout, W. P. W., Van der Knap. 2002. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 51: 149-155.
- Van de Braak, C. B. T., R. Faber, y J. H. Boon. 1996. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph. Comparative Haematology International, 194-203.
- Van Hulter, M. C. W., Westenberg, M., Goodall, S. D., Vlak, J. M. 2000. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. Virology 266: 227-36.
- Vargas-Albores, F., Baltazar, P.H., Clark, G.P., Barajas, F.M., 1998. Influence of temperatura and salinity on the yellowlegs shrimp, *Penaeus californiensis*. Holmes, prophenoloxidase system. Aquacult. Res. 29, 549-553.
- Vásquez, L., C. Sierra, S. Juárez, C. Agundis, A. Zavala, y E. Centeno. 1998. Mecanismos de inmunidad en crustáceos. Interciencia, Vol. 23, Nº. 6. Nov.-Dic.

- Vidal, O., Granja, C., Aranguren, F., Salazar, M. and Brock, J. 2001. A profound effect of Hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White Spot Syndrome Virus. *Journal of the World Aquaculture Society*. 32 (4), 364-372.
- Wang, C. H., C. F. Lo, J. H. Leu, C. M. Chou, P. Y. Yeh, H. Y. Chou, M. C. Tung, C. F. Chang, M. S. Su, and G. H. Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:239-242.778.
- Wang, Q., B. L. White, R. M., Redman, and D. V., Lightner. 1999. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 170: 179-194.
- Wang, Y. G., M. D. Hassan, M. Shariff, S. M. Zamri y X. Chen. 1999. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Diseases of Aquatic Organisms* 39:1-11.

Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 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*. Dis. Aquat. Org. 21, 69-77.

Wyban J., W. A. Walsh, y D. M. Godin. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*), Aquaculture 138 (1-4). 267-279.

Zhang, L. R., Zhang, J. H., Chen, D. H. and Xiao, L. C. 1994. Assembly of the rod-shape virus of *Penaeus orientalis* Kishinoye in vivo. J. Chinese Electron Microscopy Soc. 13, 354-363.

(www.cnaecuador.com/estadisticas/impacto_ws).

(www.cenaim.com).

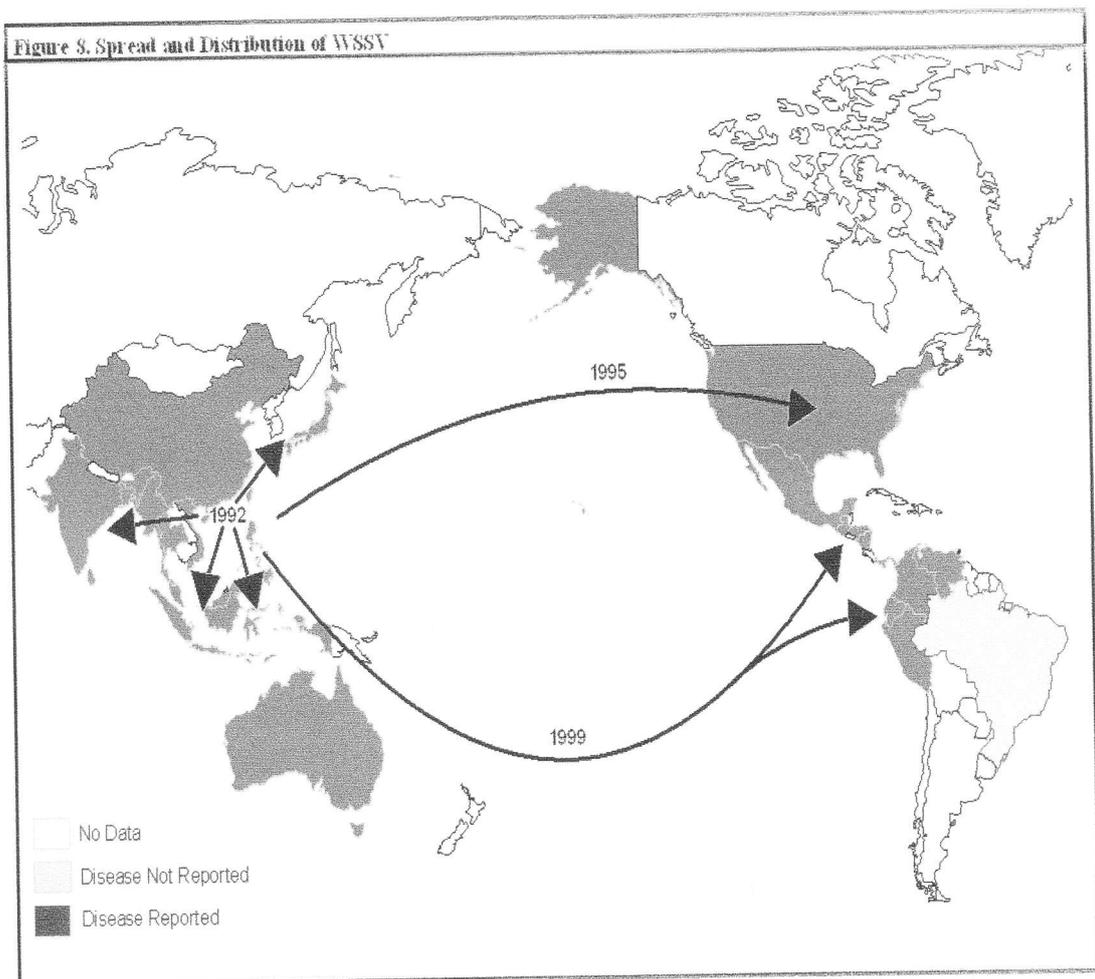
(www.gsmfc.com).

ANEXOS

ANEXO 1

Extensión y distribución de WSSV.

Fuente: WHITE SPOT SYNDROME VIRUS, CSIRO et al.



ANEXO 2

Resultados del análisis de varianza (ANOVA) realizado en el programa Data Desk 6.1 de peso final del Ensayo I.

DESIGN

Dependent variables

Name	Code
Temp	Tmp

Type of analysis: OLS ANOVA

Factors

Name	Code	Nested in	F/R	Kind
Datos	Dt	()	Fix	Disc

Partial (Type 3) Sums of Squares

Interactions up to 1 - way

No Modifications

RESULTS

General Results

18 total cases

ANOVA

Analysis of Variance For Temp
No Selector

Source	df	Sums of Squares	Mean Square	F-ratio	Prob
Const	1	64.2222	64.2222	192.67	Š 0.0001
Dt	12	10.1111	0.842593	2.5278	0.1574
Error	5	1.66667	0.333333		
Total	17	11.7778			

Results for factor Dt

ANEXO 3.

Resultados del análisis de varianza (ANOVA) realizado en el programa Data Desk 6.1 de supervivencia de Post-larvas de *L. vannamei* de 2 tratamientos (SPF y WSSV Inactivo) infectados con WSSV del Ensayo II.

Source	df	Sums of Squares	Mean Square	F-ratio	Prob
Const	1	47,7946	47,7946	636,72	Š 0,000
vrl	1	0,028571	0,028571	0,38063	0,5450
Subject	18	1,35114	0,075063	10,329	Š 0,000
Repeat	6	15,3344	2,55574	351,68	Š 0,000
vrl*Rpt	6	0,026429	0,004405	0,60612	0,7249
Error	108	0,784857	0,007267		
Total	139	17,5254			

ANEXO 4.

Resultados del análisis de varianza (ANOVA) realizado en el programa Data Desk 6.1 de supervivencia de Post-larvas de *L. vannamei* infectados con WSSV de 2 tratamientos (SPF versus WSSV Inactivo e inmunoestimulados con β -1,3-glucano) del Ensayo II.

Source	df	Sums of Squares	Mean Square	F-ratio	Prob
Const	1	46,5178	46,5178	501,26	Š 0,0001
v/T	1	0,016071	0,016071	0,17318	0,6822
Subject	18	1,67043	0,092802	9,9571	Š 0,0001
Repeat	6	14,4037	2,40062	257,57	Š 0,0001
v/T*Rpt	6	0,055429	0,009238	0,99120	0,4350
Error	108	1,00657	0,009320		
Total	139	17,1522			