



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

**“Estudio de la necrosis muscular en el camarón blanco  
*Penaeus (Litopenaeus) vannamei* cultivado en Ecuador”**

**Tesis de Grado**

**Previo a la obtención del título de:**

**BIÓLOGO MARINO**

**Presentada por:**

**Vicente Javier Tomalá Bazán**

**La Libertad – Ecuador**

**2010**

UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

“ESTUDIO DE LA NECROSIS MUSCULAR EN EL CAMARÓN  
BLANCO *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* CULTIVADO EN  
ECUADOR”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

VICENTE JAVIER TOMALÁ BAZÁN

LA LIBERTAD – ECUADOR

2010

# DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad de los hechos, ideas y doctrinas expuestas en esta tesis me corresponden exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma le corresponde al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL).

-----  
Vicente Javier Tomalá Bazán

C.I.: 091971558-1

# DEDICATORIA

Dedico esta Tesis a Dios, a quien le debo todo lo que soy y lo que pueda llegar a ser.

Y en especial a mi querida madre, por darme su amor, paciencia, compañía y por siempre impulsar el sentido del valor y el coraje de enfrentarme a muchos retos en mi vida cotidiana.

A mi familia.

A mis verdaderos amigos, porque con su ánimo me han ayudado a seguir adelante.

*A ella ..... que es mi estrella que cubre mis sueños .....*

*Dedicada para mi Madre .....*

# AGRADECIMIENTO

A Dios por guiar mi vida.

A mi madre Luisa Bazán, por su amor y apoyo incondicional para motivar cada uno de mis logros.

A mi hermana Jeanine y mis sobrinos Zully y Jean Carlos, gracias por siempre estar conmigo.

A Johana y Mariela, quienes en tiempos diferentes fueron mi razón permanente de inspiración y de lucha. Te amo "*chiquita*".

A la UPSE y sus autoridades, en particular al ex-Rector Ab. Xavier Tomalá M., al Decano de la Facultad Ciencias del Mar Ing. Gonzalo Tamayo y al Director de Escuela de Biología Marina Blgo. Richard Duque.

Al CENAIM-ESPOL por financiar esta investigación, haciendo posible su ejecución. En particular, al Dr. Samuel Stern, ex-Director General; al Coordinador Científico, Dr. Stanislaus Sonnenholzner; a la Dra. María Herminia Cornejo, Coordinador de Asuntos Académicos y al Jefe de Operaciones, Ing. Andrés Pedrazzoli.

A Dr. José Melena, por aceptar ser mi Director de Tesis, gran amigo y por apoyar mi trabajo y siempre estar dispuesto a ayudarme.

A M. Sc. Janeth Galarza, Tutor de tesis, por su invaluable colaboración al supervisar esta investigación.

Al Blgo. Fabrizio Echeverría “*el pibe*” por su acertada, oportuna y necesaria colaboración en este estudio y la Tnlga Fanny Panchana “*Fanny lu*”, por su ayuda y respaldo en los análisis histopatológicos de mi tesis, mil gracias.

A Dra. Jenny Rodríguez y la Ocean. Irma Betancourt, por sus colaboraciones técnicas en los protocolos utilizados durante esta investigación.

A Dr. Yasuji Amano, investigador del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) del Instituto Nacional de Higiene (INH) Leopoldo Izquieta Pérez (Guayaquil), por su gentil colaboración con el análisis de muestras de este estudio.

A Dr. Sahul Hameed, científico e investigador del Departamento de Zoología del C. Abdul Hakeem College, Melvisharam 632-509, Vellore Dist., Tamil Nadu, India, por su colaboración en este estudio con información relevante respecto a la necrosis muscular infecciosa en camarón.

A Ing. Patricio Moncayo y al Blgo. Santiago Moscoso, por su invaluable colaboración durante el desarrollo de esta investigación.

A Dra. Bonny Bayot, M. Sc. Mariuxi Sotomayor y César Gonzabay por siempre estar dispuestos ayudarme durante todo el transcurso de mi tesis.

A todo el personal del CENAIM, porque su ayuda ha sido importante durante el transcurso de mi trabajo de tesis.

Mil gracias a todos y por todo, mi gratitud por siempre.

# TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

---

Ing. Gonzalo Tamayo C.

Decano de Facultad

Ciencias del Mar

---

Blgo. Richard Duque M.

Director de Escuela de

Biología Marina

---

Dr. José Melena C.

Director de Tesis

---

M. Sc. Janeth Galarza

Tutor de Tesis

---

Blgo. Angela Reyes L.

Profesor de Área

---

Ab. Milton Zambrano C.

Secretario General-Procurador

# ÍNDICE GENERAL

	Pag.
ÍNDICE GENERAL .....	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XVIII
ÍNDICE DE ANEXOS .....	XIX
GLOSARIO .....	XX
ABREVIATURAS .....	XXVII
RESUMEN .....	XXX
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1. OBJETIVO GENERAL .....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. HIPÓTESIS .....	5
4. ANTECEDENTES .....	6
4.1. LA PRODUCCIÓN CAMARONERA ECUATORIANA .....	6
4.2. Impactos negativos sobre la producción camarонера ecuatoriana ..	6
4.2.1. Síndrome de la Gaviota (SG) .....	6
4.2.2. Síndrome de Taura (TS) .....	6
4.2.3. El Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHNV) .....	7
4.2.4. El Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) .....	8
4.2.4.1. Generalidades del WSSV .....	9

4.2.4.2. Mecanismos de Transmisión del WSSV .....	10
4.2.4.3. Técnicas de Detección del WSSV .....	10
<b>4.3. Necrosis Muscular en la Industria Acuícola .....</b>	<b>11</b>
<b>4.3.1. El <i>Macrobrachium rosenbergii</i> nodavirus (MrNV) .....</b>	<b>13</b>
4.3.1.1. Hospederos .....	14
4.3.1.2. Mecanismos de transmisión .....	14
4.3.1.3. Métodos de Diagnóstico .....	14
<b>4.3.2. El Virus de Mionecrosis Infecciosa (IMNV) .....</b>	<b>15</b>
4.3.2.1. Hospederos .....	16
4.3.2.2. Mecanismos de Transmisión .....	16
4.3.2.3. Métodos de Diagnóstico .....	16
<b>4.3.3. El <i>Penaeus vannamei</i> nodavirus (PvNV) .....</b>	<b>16</b>
4.3.3.1. Hospederos .....	17
4.3.3.2. Mecanismos de Transmisión .....	17
4.3.3.3. Métodos de Diagnóstico .....	17
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
5.1. Material Biológico (población stock) .....	18
5.2. Recolección de tejidos de camarones sospechosos (Inóculo Original - IO) .....	18
5.3. Confirmación de signos clínicos en IO .....	18
5.4. Protocolo de aislamiento del agente causal de la necrosis muscular por ultracentrifugación .....	19
5.5. Protocolo para la elaboración de papilla (camarones cortados en pedazos) con necrosis muscular para los desafíos <i>per os</i> (Inóculo	

Experimental - IE) .....	20
<b>5.6. Bioensayos</b> .....	<b>20</b>
<b>5.6.1. Bioensayo 1 (reproducción de la enfermedad)</b> .....	<b>20</b>
5.6.1.1. Análisis Histopatológico .....	22
<b>5.6.2. Bioensayo 2 (confirmación de la reproducción de la enfermedad)</b> .....	<b>24</b>
5.6.2.1. Protocolo para la Detección de agente etiológico de necrosis muscular en camarón marino mediante Hibridación <i>in situ</i> (HIS) .....	27
5.6.2.2. Extracción de ARN .....	28
5.6.2.2.1. Protocolo del Kit IQ2000™ para detección de IMNV .....	29
5.6.2.3. Protocolo para Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) .....	30
<b>5.6.3. Bioensayo 3 (Aplicación de estrés ambiental e inóculo bacteriano)</b> .....	<b>30</b>
5.6.3.1. Aislamiento y caracterización bioquímica de bacterias (Inóculo bacteriano) .....	30
5.6.3.2. Preparación de Inóculo bacteriano e inyección .....	30
5.6.3.3. Bioensayo .....	31
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
6.1. Análisis histopatológico del material biológico .....	34
6.2. Observación macroscópica de camarones sospechosos .....	34
6.3. Análisis histopatológico de tejidos de camarones sospechosos (IO) ....	35
6.4. Análisis histopatológico del Inóculo Experimental (IE) .....	37

6.5. Bioensayo 1 (reproducción de la enfermedad) .....	38
6.5.1. <b>Histología</b> .....	38
6.6. Bioensayo 2 (confirmación) .....	39
6.6.1. <b>Histología</b> .....	40
6.6.2. <b>PCR por Transcripción Reversa (RT-PCR)</b> .....	42
6.6.3. <b>Hibridación <i>in situ</i> (HIS)</b> .....	42
6.6.4. <b>Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)</b> .....	45
6.7. Bioensayo 3 (Aplicación de estrés ambiental e inóculo bacteriano) .....	46
6.7.1. <b>Histología</b> .....	47
<b>DISCUSIÓN</b> .....	49
<b>CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	56
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	57
<b>ANEXOS</b> .....	69

# ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pag.
Figura 1.	
Camarones gigantes de agua dulce <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (juveniles). Observese opacidad muscular (camarones enfermos ver flecha blanca) como signo clínico externo de la enfermedad de la cola blanca (WTD). Camarones con apariencia sana (flecha negra) .....	<b>13</b>
Figura 2.	
Camarones juveniles <i>P. vannamei</i> . Se observan signos clínicos externos de la enfermedad de la mionecrosis infecciosa (IMNV) reportada al noreste de Brasil. Tomado del Atlas de Histopatología de <i>P. vannamei</i> . Volumen I (Panchana, 2009) .....	<b>15</b>
Figura 3.	
Ultracentrífuga “Sorvall modelo Discovery 90SE”. Se observa que el material proveniente del IO es colocado en la ultracentrífuga para realizar el aislamiento del eventual agente causal de la necrosis muscular .....	<b>19</b>
Figura 4.	
Sala experimental con bandejas de fibra de vidrio. Contienen acuarios con camarones para la siembra y pruebas tipo desafío de este estudio .....	<b>21</b>
Figura 5.	
Esquema del bioensayo 1 (reproducir la enfermedad).....	<b>22</b>
Figura 6.	
Micrótomo “Shandon”. Se observa el corte de un camarón en bloque de parafina .....	<b>24</b>

Figura 7.	Sala experimental con bandejas de fibra de vidrio. Contienen acuarios con camarones para la siembra y pruebas tipo desafío de este estudio .....	<b>25</b>
Figura 8.	Esquema del bioensayo 2 (confirmación de la reproducción de la enfermedad) .....	<b>26</b>
Figura 9.	Termociclador “Eppendorf”. Se observan las muestras de camarones sospechosos que fueron amplificadas por RT-PCR para la detección de IMNV (Kit IQ2000™) .....	<b>29</b>
Figura 10.	Sala experimental con bandejas de fibra de vidrio. Contienen carameleras con camarones para la siembra y prueba tipo desafío (bacteriano) de este estudio .....	<b>32</b>
Figura 11.	Esquema del bioensayo 3 (estrés ambiental e inóculo bacteriano) .....	<b>33</b>
Figura 12.	Secciones longitudinales de tejido muscular de camarones <i>P. vannamei</i> . A-B.- Observación de estructuras sarcoméricas normales (ver flechas). Sección de parafina 4 µm de grosor. Tinción de H&E. Objetivo de 10X .....	<b>34</b>
Figura 13.	Camarones <i>P. vannamei</i> del IO. A-D.- Se observa opacidad muscular en diferentes segmentos intermedios y distales de la cola (flecha), signo clínico externo que está asociado con necrosis muscular .....	<b>35</b>

Figura 14.	Secciones longitudinales de tejido muscular de camarones <i>P. vannamei</i> del IO. A.- Necrosis coagulativa con grado de lesión medio. Objetivo de 4X. B.- Infiltraciones hemocíticas con grado de lesión leve. Objetivo de 4X. C-D.-Extensas infiltraciones hemocíticas (flecha) y pérdida de la estructura sarcomérica normal. Sección de parafina 4 µm de grosor. Tinción H&E. Objetivo de 10X ..... <b>36</b>
Figura 15.	Grado de lesión que mostraron los camarones <i>P. vannamei</i> del IE respecto a los dos signos clínicos asociados a necrosis muscular infecciosa: Escala 1= Muy Leve; 2= Leve; 3= Medio; 4= Severo ..... <b>38</b>
Figura 16.	Grado de lesión que presentaron los camarones <i>P. vannamei</i> del bioensayo 1 respecto a los dos signos clínicos asociados a necrosis muscular infecciosa (necrosis muscular e infiltración hemocítica) ..... <b>39</b>
Figura 17.	Secciones longitudinales de tejido muscular de camarones <i>P. vannamei</i> . A-D.- Se observan grado de lesión severo de necrosis coagulativa y extensas infiltraciones hemocíticas (flecha). Además, de la pérdida de la estructura sarcomérica normal. Sección de parafina 4 µm de grosor. Tinción H&E. Objetivo de 10X ..... <b>40</b>
Figura 18.	Gel de electroforesis presenta los productos amplificados por RT-PCR para la detección de IMNV (Kit IQ2000™). Pozos 1-6: camarones negativos con un amplicón de 680

	pb. (Control interno). Control positivo (+) corresponde a ARN de camarón infectado con IMNV, el cual presenta dos amplicones de 284 y 476 pb, respectivamente. El marcador de peso molecular (M) es de 1 Kb (Invitrogen™) ..... <b>42</b>
Figura 19.	Hibridación <i>in situ</i> (HIS) en secciones longitudinales de tejidos de camarones <i>P. vannamei</i> . A.- Señal positiva en músculo del control positivo de IMNV. Objetivo de 10X. B.- C.- Tejidos musculares de camarones desafiados localmente muestran señal positiva para IMNV. Objetivo de 10X. D.- Tejido conectivo del cefalotórax muestra señal positiva de IMNV en camarones desafiados localmente. Objetivo de 10X ..... <b>43</b>
Figura 20.	Esquema del número total de muestras analizadas por HIS. Los códigos marcados con negrillas corresponden a los camarones analizados 2 veces consecutivas por el mismo método ..... <b>44</b>
Figura 21.	Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Se observa tejido muscular necrosado con presencia de viriones de WSSV (ver flecha), vistos transversalmente con tinción negativa ..... <b>45</b>
Figura 22.	Grado de lesión que presentaron los camarones <i>P. vannamei</i> del bioensayo 3. En el T2 (bacterias + baja temperatura 17 °C), 2/3 camarones mostraron los dos signos clínicos de necrosis muscular infecciosa. T1=

bacterias + alta temperatura (30 °C), T2= bacterias + baja temperatura (17 °C), T3= bacterias + baja concentración de oxígeno disuelto (1 mg/L), T4= bacterias + alta temperatura (30 °C) + baja concentración de oxígeno disuelto (1 mg/L), T5= bacterias + baja temperatura (17 °C) + baja concentración de oxígeno disuelto (1 mg/L), T6= bacterias  
 .....47

Figura 23.

Secciones longitudinales de tejido muscular de camarones *P. vannamei* del T2 (bacterias + baja temperatura (17 °C)).  
 A.- Presencia de nódulos hemocíticos (ver flechas), con pérdida de la estructura sarcomérica normal. Objetivo de 10X. B.- Presencia de nódulos hemocíticos con melanización interior. Objetivo de 10X. C.- Pérdida de la estructura sarcomérica normal con grandes infiltraciones y nodulaciones hemocíticas. Objetivo de 4X. D.- Presencia de melanización, nodulación e infiltraciones hemocíticas. Sección de parafina 4 µm de grosor. Tinción H&E. Objetivo de 4X .....48

# ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pag.</b>
Tabla 1.	Niveles histopatológicos que cuantifican los grados de lesión que muestran los camarones <i>P. vannamei</i> en cada una de las pruebas tipo desafío ..... <b>37</b>
Tabla 2.	Grado de lesión que mostraron los camarones <i>P. vannamei</i> del bioensayo 2 expuestos a prueba de desafío “ <i>per os</i> ” <b>41</b>
Tabla 3.	Tipos de análisis para la detección de IMNV, que se realizaron a los camarones que presentaron signos clínicos de necrosis muscular infecciosa (necrosis e Infiltración hemocítica) ..... <b>46</b>

# ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pag.</b>
Anexo 1.	
Protocolo para mantenimiento de camarones juveniles <i>P. vannamei</i> (población stock) para el estudio de la necrosis muscular en Ecuador .....	<b>70</b>
Anexo 2.	
Protocolo para reducir la concentración de oxígeno disuelto en el agua de cultivo.....	<b>71</b>
Anexo 3.	
Hibridación <i>in situ</i> en camarones juveniles <i>P. vannamei</i> desafiados localmente .....	<b>72</b>

# GLOSARIO

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico: Ácido nucleico compuesto de dos cadenas nucleotídicas que se disponen alrededor de un eje central formando una doble hélice, capaz de autorreplicarse y codificar la síntesis de ARN. La molécula bicatenaria está formada por dos cadenas antiparalelas y complementarias entre sí. Es el soporte físico de la herencia en casi todas las especies. Los nucleótidos están constituidos por azúcar (desoxirribosa) y las bases nitrogenadas: adenina, timina, citosina y guanina.

**ARN:** Ácido Ribonucleico: Macromolécula de una sola cadena formada por monómeros, los ribonucleótidos, que contienen un azúcar de cinco átomos de carbono, ribosa, ácido fosfórico y bases nitrogenadas: citosina, guanina, adenina y uracilo.

La estructura primaria se debe a un encadenamiento 3-5 de los ribonucleótidos. Se cree que la estructura secundaria presenta segmentos en parte arrollados en hélice y otros segmentos totalmente lineales. La estructura terciaria obedecería a una cierta orientación de las zonas helicoidales.

**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, presentes en la superficie de un microorganismo (patógeno o parásito).

**Bacterias:** Micro-organismos unicelulares con núcleo desprovisto de membrana, con cromosoma único, generalmente con una pared exterior y capaces de multiplicarse por división celular. Microorganismo unicelular procariota. Ocupan todos los hábitats conocidos, desde los hielos de la Antártica hasta las profundidades de los océanos.

**Especificidad:** Propiedad de los participantes en la respuesta inmune (antígeno, anticuerpo o células sensibilizadas) de combinarse en forma selectiva con el reactante correspondiente. En un sentido más amplio implica un reconocimiento molecular.

**Etiología:** Estudio del origen de una enfermedad.

**Exoesqueleto:** Estructura que se encuentra por fuera del cuerpo de los organismos, que les sirve como protección y sostén, tal como en el caso de los invertebrados.

**Hibridación:** Característica que permite la unión entre elementos que se pueden complementar. A nivel molecular, la hibridación puede ser utilizado para buscar y encontrar complementos entre secuencias. De utilidad en diagnóstico.

**Hospedero:** Organismo que representa la fuente de alimento, abrigo u otras ventajas para un organismo de otra especie. El término refleja claramente la interacción con patógenos (hospedero – patógeno).

**Infección:** Capacidad de un agente extraño microscópico (microbio, virus, hongo) de proliferar dentro o sobre un hospedero.

**Inmunidad:** Capacidad de un hospedero 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 basado en células especializadas 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 respuesta inmune y, de una forma general, a todos los procesos que tienen relación con la respuesta de defensa del hospedero.

**Inmunológico:** Relativo a los mecanismos que los hospederos 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.

**Invertebrado:** Organismo sin huesos y sin columna vertebral. Este grupo se extiende desde los protozoos hasta los insectos, crustáceos, gusanos, caracoles y ostras.

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

**Micra ( $\mu\text{m}$ ):** Unidad de longitud para seres microscópicos correspondiente a la milésima parte del milímetro.

**Necrosis:** Muerte de tejido. La necrosis muscular es un trastorno caracterizado por: dañar tejido muscular estriado del camarón, presentar opacidad focal del tejido muscular (áreas blanquecinas) y en grado severo puede ocasionar mortalidades.

**Órgano Linfoide (OL):** Filtro con capacidad de retener en la hemolinfa partículas virales circulantes, conduciendo a la formación de esferoides.

**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.

**Patogenicidad:** Capacidad de un agente patógeno de multiplicarse en el organismo y desarrollar la enfermedad.

**PCR:** (PCR, de las iniciales en inglés Polymerase Chain Reaction): Método de amplificación de una secuencia de bases del ADN, ideado por Kary Mullis a

mediados de la década de 1980, usando una polimerasa termoestable y dos iniciadores (*primers*) de 10 - 25 bases de largo de la secuencia a ser amplificada, uno complementario a la secuencia 5' - 3' y otro a la secuencia 3' - 5'. 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.

**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.

**Per os:** Locución latina que significa "por la boca" o "vía oral".

**Picnosis:** Condensación de la cromatina que acaba por formar una masa homogénea e intensamente pigmentada. A menudo constituye un signo de alteración del núcleo celular.

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

**Prueba de Desafío:** Bioensayo en el que bajo dosis y períodos determinados, un hospedero es expuesto a un agente infeccioso, el cual puede ser bacteriano, viral, fúngico, etc.

**Salinidad:** Es una medida de la cantidad de sales minerales en el agua o en el suelo. Se representa en partes por mil (parts per thousand).

**Sarcómero:** Fragmento de una miofibrilla limitada por dos estrías.

**Transmisión Horizontal:** A través del agua, es la que se produce entre dos segmentos de una población (ejemplos, canibalismo, cohabitación y las secreciones).

**Transmisión Vertical:** Es la transmisión producida por los individuos de una generación a su descendencia.

**Virión:** Unidad estructural de los virus. Consta fundamentalmente de dos estructuras imprescindibles: un ácido nucleico (ADN ó ARN) y una envoltura proteica (cápside). A estas estructuras básicas se añade en algunos casos una envoltura lipídica y/o espículas de glucoproteína. Representa su estado extracelular, donde se muestra inerte.

**Virus (del latín virus = veneno):** Agente infeccioso de naturaleza obligatoriamente intracelular para sintetizar su material genético, ultramicroscópico y ultrafiltrable. Consta de un ácido nucleico (ADN ó ARN) y un recubrimiento proteico. Entidad no celular de muy pequeño tamaño (medido en nanómetros).

**Virulencia:** Potencial de un agente para producir cuadros graves que derivan en muerte.

# ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
APT	Ácido fosfotungstico
°C	Grados celsius
Ca ++	ión calcio
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
CNA	Cámara Nacional de Acuicultura
d	días
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	gramo
h	Horas
HIS	Hibridación <i>in situ</i>
IHHNV	Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (por sus siglas en inglés)
IMNV	Virus de Mionecrosis Infecciosa (por sus siglas en inglés)
INH	Instituto Nacional de Higiene
IE	Inóculo Experimental
IO	Inóculo Original
Kb	Kilo base
KDa	Kilo Daltones
Km	Kilómetros
Kpb	Kilo par de base

L	litros
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
mg	miligramo
min	minutos
mL	mililitro
<i>MrNV</i>	<i>Macrobrachium rosenbergii</i> nodavirus
NBT	Nitro blue tetrazolium
nm	nanómetro
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
OL	Órgano Linfoide
PBS	Tampón fosfato salino sin Ca <sup>++</sup> y Mg <sup>++</sup>
PBS 1X	Tampón fosfato salino con Ca <sup>++</sup> y Mg <sup>++</sup> , dilución 1/10
PCR	Reacción de Polimerización en Cadena (por sus siglas en inglés)
pH	Potencial de Hidrógeno
p.i.	Post-infección
ppt	partes por mil (part per thousand)
<i>PvNV</i>	<i>Penaeus vannamei</i> nodavirus (por sus siglas en inglés)
RDS	Síndrome de la Deformidad y Enanismo (por sus siglas en inglés)
Real-time PCR	PCR en Tiempo Real (por sus siglas en inglés)
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción de Polimerización en Cadena por Transcripción Reversa (por sus siglas en inglés)
s	segundos

SG	Síndrome de la Gaviota
SSC	Tampón de Citrato sódico salino
TN	Tampón Tris-HCl Cloruro de Sodio
TS	Síndrome de Taura (por sus siglas en inglés)
TSV	Virus del Síndrome de Taura (por sus siglas en inglés)
UAZ	Universidad de Arizona
µg	microgramo
µL	microlitro
µm	micras
U. V.	ultravioleta
µW	microwatts
WSSV	Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (por sus siglas en inglés)
WTD	Enfermedad de la Cola Blanca (por sus siglas en inglés)
v/v	volumen/volumen

# RESUMEN

El objetivo de esta investigación ha sido estudiar la necrosis muscular en el camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* cultivado en Ecuador, mediante técnicas de diagnóstico en laboratorio y bioensayos, para determinar su etiología y el desarrollo de la enfermedad.

La hipótesis de trabajo propuso que la necrosis muscular observada en el cultivo de camarón blanco *P. vannamei* en Ecuador, ha sido causada por un agente infeccioso.

Esta investigación constó de 3 bioensayos tipo prueba de desafío. En el primero se observó, que los camarones desafiados con Inóculo Experimental (IE) vía 'per os' mostraron los dos signos clínicos típicos de una necrosis muscular infecciosa. Esto indica que el estudio ha permitido obtener la reproducción de la enfermedad (necrosis muscular), bajo condiciones experimentales en camarones cultivados localmente. Tales resultados confirman, en base a la reproducibilidad de la enfermedad, que la necrosis muscular observada en el cultivo de camarón *P. vannamei* en Ecuador es de origen infeccioso.

Complementariamente, en el segundo bioensayo se realizó el estudio de determinación del agente causal de la necrosis muscular descrita en Ecuador, mediante la aplicación de 4 técnicas de laboratorio: Histología, Reacción de Polimerización en Cadena por Transcripción Reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés), Hibridación *in situ* (HIS) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). En particular, se analizaron por HIS a 25 camarones individuales enfermos, previamente confirmados por Histología. El 52% (13/25) presentó

señal positiva (precipitados de color azul) para IMNV en sus tejidos (cefalotórax y abdomen).

Finalmente, se realizó un tercer bioensayo tipo prueba de desafío con un inóculo conformado por 6 aislados bacterianos (*Vibrio pelagicus*, *V. splendidus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. fischeri*), al que se incorporaron dos fuentes de estrés: variación de temperatura del agua de cultivo ( $\Delta T: \pm 6 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y reducción de la concentración de oxígeno disuelto (1 mg/L). Los resultados obtenidos indicaron que los camarones desafiados con inóculo bacteriano ( $1 \times 10^4$  UFC/camarón) vía 'inyección' y sometidos a baja temperatura ( $T = 17^\circ\text{C}$ ), evidenciaron signos clínicos característicos de necrosis muscular infecciosa. De lo observado, las fuentes de estrés o el inóculo bacteriano no son suficientes por sí solos para inducir los signos clínicos característicos de la necrosis muscular en *P. vannamei*. Por otra parte, estos resultados señalan preliminarmente que bacterias del género *Vibrio* junto al estrés por baja temperatura también estarían involucradas en la expresión de un tipo de necrosis muscular en *P. vannamei*, bajo condiciones experimentales.

En conclusión, las evidencias proporcionadas por HIS en camarones *P. vannamei* con necrosis muscular sugiere que el IMNV es uno de sus agentes etiológicos a nivel local.

## 1. INTRODUCCIÓN

En el comercio internacional, uno de los productos más importantes obtenidos en Acuicultura es el camarón marino, con más de US\$ 11.000 millones en exportaciones al año. Por ello, la Acuicultura representa un importante sector de la producción alimenticia mundial constituyendo una valiosa fuente de proteínas, empleo, ingresos fiscales y de divisas para los países en desarrollo que cultivan camarón marino (FAO, 2006). El camarón blanco *Penaeus vannamei* (taxonomía según Holthius, 1980), es una de las especies predominantes para el cultivo en granja a nivel mundial.

Sin embargo, el cultivo de camarón marino se ha visto afectado por problemas graves relacionados con brotes de enfermedades infecciosas. Estas enfermedades, han sido señaladas como la más grande fuente de pérdidas económicas para la industria acuícola (Meyer, 1991). Al respecto, se ha reportado que la cercanía entre sí de piscinas de camarones cultivados incrementa la dispersión de tales enfermedades (Kautsky *et al.*, 2000).

En particular, los camarones son susceptibles a patógenos virales, rickettsiales, bacterianas, fúngicos, protozoos y metazoos (Lightner, 1993; Flegel, 2006). Sin embargo, la mayoría de las enfermedades severas descritas en cultivos de camarón son de origen viral y bacterianas (Lightner *et al.*, 1992; Flegel, 2006).

La Industria ecuatoriana del cultivo del camarón marino *P. vannamei*, no ha sido la excepción, puesto que ha sido enormemente afectada por la aparición de enfermedades de tipo viral. El patógeno más devastador hasta el momento es el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV, por sus siglas en inglés), el cual ha sido responsable de mortalidades elevadas en numerosas camaroneas provocando pérdidas por alrededor de US\$ 1.200 millones y 130.000 empleados despedidos (Cámara Nacional de Acuicultura, 2001).

Actualmente, siguen presentándose brotes de WSSV en ciertas zonas de cultivo, ratificando que el WSSV se ha vuelto un patógeno endémico y sus

efectos nocivos se pueden volver evidentes si las condiciones ambientales afectan negativamente al camarón.

En este contexto, se han observado brotes esporádicos de un síndrome (trastorno de etiología desconocida), con signos clínicos similares a los de una necrosis muscular de origen infeccioso. Este síndrome se caracteriza por presentar pérdida de la transparencia de los segmentos abdominales volviéndolos opacos de acuerdo al grado de severidad, algunas áreas con aspecto lechoso y en estados más avanzados se observa una necrosis de las áreas infectadas, produciendo bajas mortalidades crónicas que podrían alcanzar 20-30% durante el ciclo de cultivo (Melena, 2007)

Este hallazgo, fue hecho en una instalación comercial de la provincia del Guayas, donde se encontraron camarones adultos con signos clínicos semejantes a una necrosis muscular infecciosa.

Anteriormente, la necrosis muscular a nivel local, no era considerada un gran problema para los cultivos, debido a que dicho trastorno podría ser una expresión metabólica causada por algún agente de tipo no infeccioso. En la actualidad, existen evidencias obtenidas en campo y en laboratorio que demuestran que la necrosis muscular puede originarse por estrés ambiental (Rigdon & Baxter, 1970; Nash *et al.*, 1987; Lightner, 1988) o por la acción de agentes infecciosos (Arcier *et al.*, 1999; Ramasamy *et al.*, 2001; Poulos *et al.*, 2006; Vijayan *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2007; Ridgway *et al.*, 2007; Lightner *et al.*, 2008).

Por ello, el objetivo de esta investigación es determinar la etiología de la necrosis muscular observada en el camarón marino *Penaeus vannamei* cultivado en Ecuador, a través de la demostración de los postulados de Koch (para el caso de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos, etc.) o de Rivers (para el caso de virus). En esencia, ambos grupos de postulados proponen reproducir una enfermedad en condiciones experimentales, aislando al potencial agente infeccioso recuperado a partir de un hospedero enfermo e inoculándolo para inducir la misma enfermedad en un hospedero sano de la misma especie (Koch, 1891; Rivers, 1937).

Complementariamente, se realizó un bioensayo en el cual se aplicaron dos fuentes de estrés estrechamente asociadas con la aparición de necrosis muscular: variación de temperatura ( $\Delta T: \pm 6 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y reducción de la concentración de oxígeno disuelto (1 mg/L), y un desafío bacteriano, a fin de determinar si existen otros agentes patógenos involucrados en la expresión de esta enfermedad.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar la necrosis muscular en el camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* cultivado en Ecuador, mediante técnicas de diagnóstico en laboratorio y bioensayos, para determinar su etiología y el desarrollo de la enfermedad.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la etiología de la necrosis muscular en camarón *P. vannamei*, mediante la demostración de los Postulados de Koch o de Rivers, utilizando bioensayos, Histopatología y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), para establecer si su agente causal es infeccioso.
- Determinar si la necrosis muscular observada en *P. vannamei* cultivado localmente, es inducida por las condiciones ambientales descritas en la literatura científica, mediante bioensayos, para establecer si su expresión obedece a la presencia de tales factores ambientales durante su cultivo.

### **3. HIPÓTESIS**

La necrosis muscular observada en el cultivo de camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* en Ecuador, es causada por un agente infeccioso.

## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1. LA PRODUCCIÓN CAMARONERA ECUATORIANA**

La producción camaronera ecuatoriana, en todas sus fases de cultivo, ha sido atrayente para la inversión económica debido a los niveles de ganancias y a la creciente demanda del mercado internacional. Esto se ha visto reflejado en el crecimiento progresivo del cultivo de camarones *P. vannamei* durante las tres últimas décadas, alcanzando en el año 2008 una producción de 277'827.192 libras, el valor más alto en la historia de la industria nacional de camarón cultivado (CNA, 2009). Sin embargo, esta misma industria se ha visto afectada por problemas graves relacionados con brotes de enfermedades infecciosas (Lightner, 1993).

### **4.2. Impactos negativos sobre la producción camaronera ecuatoriana.**

#### **4.2.1. Síndrome de la Gaviota (SG)**

Una de las primeras enfermedades de tipo infecciosa reportadas en la historia de la producción camaronera ecuatoriana es el Síndrome de la Gaviota (SG, por sus siglas en inglés), asociado con la presencia de bacterias del género *Vibrio* (Lightner *et al.*, 1992; Stern, 1995) que durante los años 1989-1990 causó pérdidas económicas por alrededor de US\$ 200 millones (FAO, 2002). El diagnóstico de esta enfermedad estuvo marcado por altas concentraciones de bacterias en la hemolinfa y el hepatopáncreas del camarón. Además, era posible apreciar nódulos hemocíticos con centros sépticos, los cuales podrían o no estar melanizados (Stern, 1995).

#### **4.2.2. Síndrome de Taura (TS)**

Posteriormente, en el año 1992 se presentó el Síndrome de Taura (TS, por sus siglas en inglés), el cual fue descubierto por primera vez en camarones infectados de granjas camaroneras cerca de la desembocadura del río Taura (Jiménez, 1992; Rosenberry, 1993; Wigglesworth, 1994), provocando pérdidas por alrededor de US\$ 300 millones (FAO, 2002) y controversia en cuanto a la determinación de su etiología, ya que surgieron dos hipótesis

con las que se relacionaba este síndrome: la primera basada en un origen de tipo infeccioso y la segunda atribuida a la toxicidad de los fungicidas utilizados en las plantaciones de banano adyacentes a las granjas de camarón con este síndrome (Wigglesworth, 1994). Sin embargo, en 1995 se determinó que el origen de esta enfermedad era de tipo viral y que su agente causal era el Virus del Síndrome de Taura (TSV, por sus siglas en inglés) (Hasson *et al.*, 1995). La enfermedad causada por el TSV, es diagnosticada durante la fase aguda como una necrosis multifocal en el epitelio cuticular de los apéndices, branquias, estómago e intestino, acompañada de elevada mortalidad (Lightner *et al.*, 1995).

Los camarones infectados presentan necrosis (muerte de tejido) y picnosis (condensación de núcleo celular) nuclear de células epiteliales, pero durante esta fase el Órgano Linfoide (OL) no presenta ninguna lesión (Lightner & Chen, 2000). La etapa de transición se caracteriza por la presencia de lesiones melanizadas en la cutícula mientras que en la fase crónica los organismos presentan melanización multifocal en el exoesqueleto, pueden o no presentar cutícula suave y expansión de los cromatóforos rojos. Su comportamiento es el de portadores asintomáticos, solo se observan regiones melanizadas en vías de recuperación (Morales-Covarrubias, 2004). Además, puede ser identificada por la formación de esferoides del OL (Lightner & Chen, 2000).

#### **4.2.3. El Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV)**

Otra de las enfermedades infecciosas reportadas en la producción camaronera ecuatoriana es la causada por el Virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV, por sus siglas en inglés). Esta enfermedad se conoce como el Síndrome de la deformidad y enanismo (RDS, por sus siglas en inglés), caracterizada por deformidad cuticular y reducción del crecimiento en *P. vannamei*. El IHHNV no causó problemas significativos hasta que aguas templadas y abundante semilla silvestre (actuando como portadores latentes de la enfermedad) asociados con el fuerte efecto del Fenómeno “EL NIÑO” de 1997-1998, causaron una epidemia (Jiménez *et al.*, 1999).

El IHNV, es letal en *P. stylirostris*, causando mortalidades por alrededor del 90%, especialmente en estadios juveniles (Lightner, 1996). Sin embargo, en la actualidad no se han reportado índices de mortalidades masivas de *P. stylirostris*, debido a la selección genética de camarones resistentes al virus (Lightner, 1999; Tang *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2003).

Los signos clínicos externos de la enfermedad no son específicos, en la fase aguda, en juveniles de *P. stylirostris* y *P. vannamei*, se aprecian una reducción en el consumo de alimento y nado lento hacia la superficie, con la parte ventral hacia arriba. En *P. stylirostris* es posible observar manchas de color blanquecino en la cutícula, las cuales desaparecen al entrar a la fase crónica. En esta fase, en las dos especies de camarones se observan deformidades en el rostrum y telson (Morales-Covarrubias, 2004).

El diagnóstico de la enfermedad estuvo marcado por cuerpos de inclusión intracelulares tipo Cowdry A. Estos cuerpos de inclusión se encuentran dentro de núcleos hipertrofiados con cromatina marginal en células de branquias, epitelio cuticular, epitelio del estómago, cordón y ganglios nerviosos, así como también es posible observarlo en tejido hematopoyético, glándula antenal, gónadas, órgano linfóide, tejido conectivo y músculo estriado. En infecciones severas se observan cuerpos de inclusión en el tejido conectivo entre los túbulos del hepatopáncreas (Morales-Covarrubias, 2004).

#### **4.2.4. El Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV)**

Finalmente, en la provincia de Esmeraldas se detectó al Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), en Mayo de 1999, el cual constituye el patógeno más devastador conocido en camarones peneidos (Lo *et al.*, 1996; Lightner, 1996; Flegel, 1997). Este virus se propagó rápidamente al resto de las provincias costeras ecuatorianas (Calderón *et al.*, 1999), provocando pérdidas por alrededor de US\$ 1.200 millones (CNA, 2001). Los camarones afectados con esta enfermedad muestran un decrecimiento en el consumo de alimento, comportamiento letárgico, coloración rojiza y en ocasiones manchas blancas sobre la superficie interna de la cutícula previo a su muerte (Wang *et al.*, 1999).

#### 4.2.4.1. Generalidades del WSSV

Las características más importantes del WSSV son los altos niveles de infecciosidad, patogenicidad y virulencia. Con respecto a la infecciosidad (capacidad de un agente patógeno de introducirse, multiplicarse y transmitirse en los tejidos del hospedero), se ha encontrado que entre las 24 y 35 horas (h) post-infección (p.i.) el virus se puede multiplicar hasta 140 veces en los tejidos del individuo (Tang & Lightner, 2000).

El WSSV, presenta una baja especificidad de hospedero y por su capacidad de invadir y afectar tejidos (Chang *et al.*, 1996) puede ser virtualmente transmitido a cualquier especie de crustáceos, los cuales se comportan en la mayoría de los casos, como portadores asintomáticos (Lo *et al.*, 1996; Supamattaya *et al.*, 1998). Sin embargo, es extremadamente patogénico (capacidad de un agente patógeno de multiplicarse en el organismo y desarrollar la enfermedad) y virulento (potencial de un agente para producir cuadros graves que derivan en muerte) en camarones.

La literatura reporta que la patogenicidad, en contraste con la transmisión, es afectada por la temperatura, siendo éste un factor crítico para la supervivencia de una población de camarones en cultivo (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003).

En cuanto a las mortalidades, en condiciones de laboratorio, pueden alcanzar 100% entre los 3 y 10 días después de la aparición de los primeros síntomas (Nakano *et al.*, 1994; Chou *et al.*, 1995; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Mohan *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999).

A nivel experimental, el WSSV puede ingresar en camarones por tres vías: inyección de un extracto de tejido infectado, inmersión en agua conteniendo extracto viral (Chou *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1999) e ingestión de tejido infectado (Lightner & Redman, 1998). El método de infección por ingestión es el más utilizado porque recrea la vía de transmisión natural del virus durante los brotes epidémicos (Lotz & Soto, 2002).

#### **4.2.4.2. Mecanismos de Transmisión del WSSV**

Los mecanismos de transmisión constituyen las formas en que el agente patógeno se pone en contacto con el portal de entrada de los individuos susceptibles (camarón sano), lo que está relacionado con el portal de salida de los infectados (camarón enfermo). Los portales corresponden a los sitios, a través de los cuales el agente infeccioso ingresa al hospedero y, a través de los cuales sale al medio (Thrusfield, 1995).

Los mecanismos de transmisión se clasifican en: horizontal y vertical.

*Transmisión horizontal* a través del agua, es la que se produce entre dos segmentos de una población. Por ejemplo, a través del canibalismo de animales más débiles, moribundos o de la muda; por la cohabitación de animales sanos con los enfermos, y por las secreciones.

*Transmisión vertical*, es la transmisión producida por los individuos de una generación a su descendencia.

Se ha comprobado que el WSSV, utiliza un mecanismo de transmisión horizontal, a través del contacto con el medio acuático (Flegel, 1997; Flegel *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999) e ingestión oral (Mohan *et al.*, 1997; Chou *et al.*, 1998). La transmisión vertical ha sido probada por Lo *et al.* (1997) y Mohan *et al.* (1997).

Además, varios autores (Chou *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2001; Lotz & Soto, 2002) plantean que la transmisión oral es la forma predominante de transmisión, debido principalmente al comportamiento caníbal de los animales, siendo estimado en un orden de magnitud superior a la transmisión por cohabitación (Lotz & Soto, 2002)

#### **4.2.4.3. Técnicas de Detección del WSSV**

Las técnicas de diagnóstico de enfermedades para camarones peneidos se basan en métodos tradicionalmente usados en el diagnóstico de enfermedades en salud humana y animal (vertebrados).

En el caso del WSSV, las técnicas de diagnóstico más utilizadas son: el análisis de Reacción de Polimerización en Cadena (PCR) (Kimura *et al.*, 1996), Real-Time PCR (Durand & Lightner, 2002), reacciones histopatológicas por Hibridación *in situ* (HIS) con sondas moleculares (Nunan & Lightner, 1997), e Inmunohistoquímica, empleando anticuerpos específicos para las proteínas del virus (Poulos *et al.*, 2001).

Además, estudios ultraestructurales han sido conducidos con ayuda de la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) (Durand *et al.*, 1996).

#### **4.3. Necrosis Muscular en la Industria Acuícola**

La recopilación bibliográfica sobre la necrosis muscular ha dejado al descubierto varias evidencias que la señalan como una enfermedad presente en la industria acuícola desde hace más de tres décadas.

Anteriormente, la necrosis muscular, pasaba desapercibida por no ser considerada un gran problema para sus cultivos, debido a que dicho trastorno era una expresión metabólica causada por algún agente de origen no infeccioso (parámetros ambientales como la temperatura y/o concentración de oxígeno disuelto), de efecto reversible y sin mortalidad asociada.

Por ello, uno de los primeros casos documentados de necrosis muscular no infecciosa se describió en el camarón *Penaeus aztecus* en la Bahía de Galveston (Texas) que al ser sometido a bajas de oxígeno presentó áreas de color blanco irregular en diferentes segmentos del abdomen (Rigdon & Baxter, 1970).

Otro caso de necrosis muscular inducida por un parámetro de tipo ambiental es el ocurrido en Tailandia en el año 1987, en donde se presentaron eventos de mortalidades del camarón *Macrobrachium rosenbergii*, debido a que en los tanques de cultivo los camarones eran mantenidos con bajos niveles de oxígeno (Nash *et al.*, 1987).

Sin embargo, el tema de la necrosis muscular, ha ido recobrando interés con el transcurso del tiempo. Hoy, la industria acuícola esta consciente que dicha expresión en sus cultivos de camarón no solo se debe a algún agente de origen no infeccioso, sino también se suman agentes infecciosos que recobran interés por causar mortalidades como: *microsporidios* que afectan los cultivos de camarón (Ramasamy, 1985; Ramasamy *et al.*, 2001); bacterias, como las *Pseudoalteromonas spp* y *Vibrio spp* identificadas en la langosta *Nephrops norvegicus* (Ridgway *et al.*, 2007) y los virus: *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) (Arcier *et al.*, 1999); el Virus de Mionecrosis infecciosa (IMNV) (Poulos *et al.*, 2006) y el *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV) (Tang *et al.*, 2007).

Al respecto, es importante señalar que Evans *et al.* (1999) han estudiado la necrosis muscular en crustáceos y determinaron que existen dos tipos de necrosis muscular: la necrosis acompañada de una extensa infiltración hemocítica (respuesta inflamatoria) y la necrosis que no presenta respuesta inflamatoria. Complementariamente, esta investigación asevera que la necrosis muscular sin respuesta inflamatoria ocurriría como consecuencia de estrés de origen ambiental, mientras que la infiltración hemocítica ocurriría en respuesta al daño causado por patógenos.

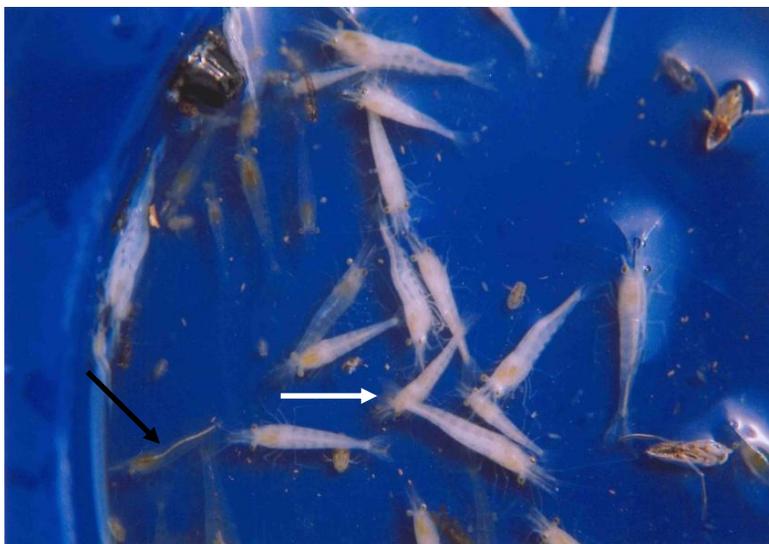
Los índices de mortalidad causados por necrosis muscular en cultivos de camarón han ido variando según el tiempo. Uno de los primeros indicios de mortalidades fue el suscitado en la Bahía de Galveston (Texas) en donde un 10% de la población de camarón *P. aztecus* moría entre las primeras 18 y 24 h al ser mantenida en tanques con baja aireación (Rigdon & Baxter, 1970).

Otro caso similar, fue el de *M. rosenbergii* en Tailandia, en donde las mortalidades alcanzaron un 60% de la población durante los primeros 28 días luego de presentada la enfermedad. Posteriormente los mortalidades se redujeron debido al incremento de los niveles de oxígeno (Nash *et al.*, 1987).

Por otro lado, en 1985, al sur de India se presentaron mortalidades bajas en camarón gigante de agua dulce *M. rosenbergii*, causadas por *microsporidios* (Ramasamy, 1985).

#### 4.3.1. El *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV)

Conocida también como la enfermedad de la cola blanca o White Tail Disease (WTD, por sus siglas en inglés), es una enfermedad que afecta a los cultivos de camarón gigante de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (Figura 1). Apareció, en la isla de Guadalupe (El Caribe), y rápidamente se propagó a Puerto Rico, Taiwán, China e India, registrando pérdidas de producción y económicas en el sector dedicado al cultivo del camarón gigante de agua dulce. El MrNV es un virus de ARN (Ácido ribonucleico), cuya simetría es eicosaedral de 27 nm de diámetro. Su genoma está compuesto por 2 fragmentos, una línea de una sola hebra de ARN (ss-RNA) de 2.9 y 1.3 kb respectivamente, y una cápside expuesta con un solo polipéptido de 43 KDa. Además, el MrNV pertenece a la familia *Nodaviridae* (OIE, 2006; OIE, 2007; Bonami *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Camarones gigantes de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (juveniles). Observese opacidad muscular (camarones enfermos ver flecha blanca) como signo clínico externo de la enfermedad de la cola blanca (WTD) . Camarones con apariencia sana (flecha negra).

##### 4.3.1.1. Hospederos

Hasta el momento, la especie *M. rosenbergii* ha demostrado ser el único hospedero natural susceptible a la infección de *MtNV*. Sin embargo, existen evidencias *in vitro* que señalan que este virus es capaz de replicarse parcialmente en líneas celulares de peces, lo cual constituye el primer estudio que reporta evidencias citopáticas en un hospedero no crustáceo (Hernández-Herrera *et al.*, 2007).

Por otro lado, recientes investigaciones tratan de determinar que la *Artemia* es un posible vector de este virus, que al ser utilizada como alimento para camarones podría provocar infecciones de *MtNV* (Sudhakaran *et al.*, 2006).

#### **4.3.1.2. Mecanismos de Transmisión**

Los mecanismos de transmisión del *MtNV* son de dos tipos: *horizontal* a través del agua, por canibalismo y *vertical*, producida por los individuos de una generación a su descendencia (Sahul Hameed *et al.*, 2004).

Sin embargo, estudios recientes tratan de determinar si el *MtNV* puede transmitirse de forma *vertical* en *M. rosenbergii* y *Artemia* (Sudhakaran *et al.*, 2007).

#### **4.3.1.3. Métodos de Diagnóstico**

Para el caso del *MtNV* las técnicas de diagnóstico más utilizadas son: el análisis de la Reacción de Polimerización en Cadena por Transcripción Reversa (RT-PCR) (Widada *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004), Dot-blot (Widada *et al.*, 2003; Widada *et al.*, 2004), ELISA (Romestand & Bonami, 2003), HIS (Widada *et al.*, 2003) y las observaciones de lesiones características a nivel histológico con microscopía óptica y MET (Qian *et al.*, 2003; OIE, 2007).

#### **4.3.2. El Virus de Mionecrosis Infecciosa (IMNV)**

El IMNV apareció por primera vez en el año 2002 en granjas de engorde de *P. vannamei*, localizadas en el municipio de Parnaíba, Estado de Piauí al noreste

de Brasil. Sin embargo, no fue hasta febrero del año 2004 cuando el Dr. Donald Lightner, profesor y científico de la Universidad de Arizona "UAZ", confirmó el origen viral de esta infección (Figura 2).

Posteriores estudios han permitido determinar sus características moleculares de este virus. El IMNV es de ARN de doble cadena, de simetría eicosaedral y de 40 nm de diámetro. Genoma de 7.5 Kpb. Además, ha sido tentativamente clasificado como miembro de la familia *Totiviridae* (Poulos *et al.*, 2006; OIE, 2007).



**Figura 2.** Camarones juveniles *P. vannamei*. Se observan signos clínicos externos de la enfermedad de la mionecrosis infecciosa (IMNV) reportada al noreste de Brasil. Tomado del Atlas de Histopatología de *P. vannamei*. Volumen I (Panchana, 2009).

#### **4.3.2.1. Hospederos**

La información disponible al momento sobre IMNV indica que éste no tiene una gran diversidad de hospederos. Las especies *P. stylirostris* y *P. monodon*, han sido consideradas como hospederos experimentales, ya que al ser sometidas a

pruebas de desafío han demostrado ser susceptibles a IMNV (Tang *et al.*, 2005).

La especie *P. vannamei* ha demostrado ser el único hospedero más susceptible a la infección del virus de manera natural.

#### **4.3.2.2. Mecanismo de Transmisión**

El mecanismo de transmisión del IMNV es de tipo *horizontal*, producido por canibalismo de animales enfermos y por las excreciones infectadas.

#### **4.3.2.3. Métodos de Diagnóstico**

En el caso de IMNV las técnicas de diagnóstico más utilizadas son: el análisis de la Reacción de Polimerización en Cadena por Transcripción Reversa (RT-PCR) (Senapin *et al.*, 2007); Real Time RT-PCR (Andrade *et al.*, 2007), HIS (Tang *et al.*, 2005), e Inmunohistoquímica; empleando Anticuerpos Monoclonales, específicos para las proteínas de IMNV (Kunanopparat *et al.*, 2009). Además, de las observaciones de lesiones características a nivel histológico con microscopía óptica y MET (Poulos *et al.*, 2006).

#### **4.3.3. El *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV)**

El PvNV apareció por primera vez en Belice en el año 2004, en granjas de engorde de *P. vannamei*. Sin embargo, no fue hasta el año 2007 cuando la Dra. Kathy Tang, científica de la Universidad de Arizona, confirmó esta nueva enfermedad de origen viral.

Recientemente, se han podido determinar las características moleculares de este virus. El PvNV es de ARN, de simetría eicosaedral y de 22 nm de diámetro. Ha sido clasificado como miembro de la familia *Nodaviridae* (Tang *et al.*, 2007).

#### **4.3.3.1. Hospederos**

Al ser un virus recientemente identificado poco se conoce de *PvNV*. Hasta el momento, solo se tiene evidencia que la única especie susceptible a una infección de este virus es *P. vannamei*.

#### **4.3.3.2. Mecanismos de Transmisión**

El mecanismo de transmisión del *PvNV* es de tipo *horizontal*, es decir, que se transmite entre los miembros de una misma población (canibalismo, heces y agua infectada).

#### **4.3.3.3. Métodos de Diagnóstico**

En el caso de *PvNV* las técnicas de diagnóstico más utilizadas son: el análisis de la Reacción de Polimerización en Cadena por Transcripción Reversa (RT-PCR) (Tang *et al.*, 2007) e HIS (Tang *et al.*, 2007). Además, de las observaciones de lesiones características a nivel histológico con microscopía óptica y MET (Tang *et al.*, 2007).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Material Biológico (población stock)**

En este estudio se utilizaron 400 camarones juveniles de la especie *P. vannamei* (peso promedio individual  $\approx$  7.5 g), provenientes de la Estación Experimental del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL), ubicada en la localidad de Palmar a 45 Km. de Santa Elena, los mismos que fueron mantenidos en una sala experimental del Centro (Anexo 1).

Finalmente, el material biológico fue examinado, utilizando análisis histopatológico. Al menos 2 muestras (n=10 camarones) tomadas aleatoriamente fueron fijadas con solución de Davidson y procesados para su observación directa al microscopio. Este análisis permitió confirmar la condición inicial de salud de la población stock, particularmente a nivel del tejido muscular estriado.

### **5.2. Recolección de tejidos de camarones sospechosos (Inóculo Original)**

Se realizaron 3 muestreos de camarones con necrosis muscular (Año 2008), particularmente con evidentes lesiones en la cola, los cuales provinieron de camaronerías con antecedentes de este problema ubicadas en la Provincia del Guayas. El material fue procesado (eliminación de hepatopáncreas), cortado en pedazos y almacenado a  $-80$  °C hasta su uso. Este inóculo original fue identificado como (IO).

### **5.3. Confirmación de signos clínicos en IO**

El material colectado IO fue examinado, utilizando análisis histopatológico. Al menos 2 muestras (n=10 camarones) fueron fijadas con solución de Davidson y procesados para su observación directa al microscopio.

La confirmación de la presencia de infiltración hemocítica junto a la necrosis muscular fueron los criterios para confirmar la utilidad del inóculo original.

#### **5.4. Protocolo de aislamiento del agente causal de la necrosis muscular por ultracentrifugación**

El aislamiento del eventual patógeno fue realizado mediante ultracentrifugaciones diferenciales en la ultracentrifuga “SORVALL” modelo Discovery 90SE (Figura 3). Inicialmente, 100 g del material proveniente del IO fueron macerados, homogenizados y centrifugados a 10.000 rpm (revoluciones por minuto) por 10 min. Este paso eliminó los restos celulares presentes en la suspensión preparada. El sobrenadante fue sometido a una ultracentrifugación de 25.000 rpm por 10 min y finalmente se realizó una fase de ultrasedimentación a 40.000 rpm por 20 min. Este material fue resuspendido en tampón TN (0.02 M Tris-HCl; 0.4 M NaCl, pH 7.4) y dividido en alícuotas para su almacenamiento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El almacenamiento en frío se realizó previo al uso de IO para el desafío vía inyección intramuscular de un grupo de camarones seleccionados a partir de la población stock para la elaboración de papilla con necrosis muscular.



**Figura 3.** Ultracentrifuga “Sorvall modelo Discovery 90SE”. Se observa que el material proveniente del IO es colocado en la ultracentrifuga para realizar el aislamiento del eventual agente causal de la necrosis muscular.

## **5.5. Protocolo para la elaboración de papilla (camarones cortados en pedazos) con necrosis muscular para los desafíos *per os* (Inóculo Experimental)**

Se sembraron 50 camarones (peso promedio  $\approx$  8 g) en acuarios de vidrio de 40 L distribuyendo 10 camarones por acuario, a temperatura ambiente, considerando un período de aclimatación de 3 días. Se suministró alimento pelletizado *ad libitum* desde el primer día de aclimatación hasta el final de la prueba. Se desafiaron los camarones con un inóculo viral (IO) vía inyección intramuscular con una dosis equivalente a 150  $\mu$ L en el segundo segmento abdominal. Se realizó la observación diaria de los camarones inyectados durante al menos 21 días post-desafío, hasta observar la aparición de regiones opacas focalizadas en los segmentos abdominales. Posteriormente, los camarones que mostraron necrosis muscular fueron colectados y almacenados en frío ( $-80$  °C), previo a su uso como inóculo experimental (IE) para los desafíos vía *per os*. Finalmente, se fijaron 2 muestras (n=10) de camarones individuales (tejido muscular) en solución de Davidson para el análisis histológico.

## **5.6. Bioensayos**

### **5.6.1. Bioensayo 1 (reproducción de la enfermedad)**

El bioensayo 1 consistió de un tratamiento (grupo desafiado *per os*) y un control negativo, los cuales fueron mantenidos durante 4 semanas en una sala experimental del CENAIM (Figura 4). Para el tratamiento/control se utilizaron 8 y 2 acuarios respectivamente, en donde se sembraron 10 camarones por acuario (peso promedio individual  $\approx$  7.5 g). Cada acuario con capacidad individual de 40 L representó una unidad experimental. Las unidades experimentales contenían agua de mar filtrada con filtros de piola (0.25  $\mu$ m) y esterilizada por luz U.V. (300.000  $\mu$ W.s/cm<sup>2</sup>), a temperatura ambiente 27.5 °C, salinidad 35 ‰ y provistos de aireación.



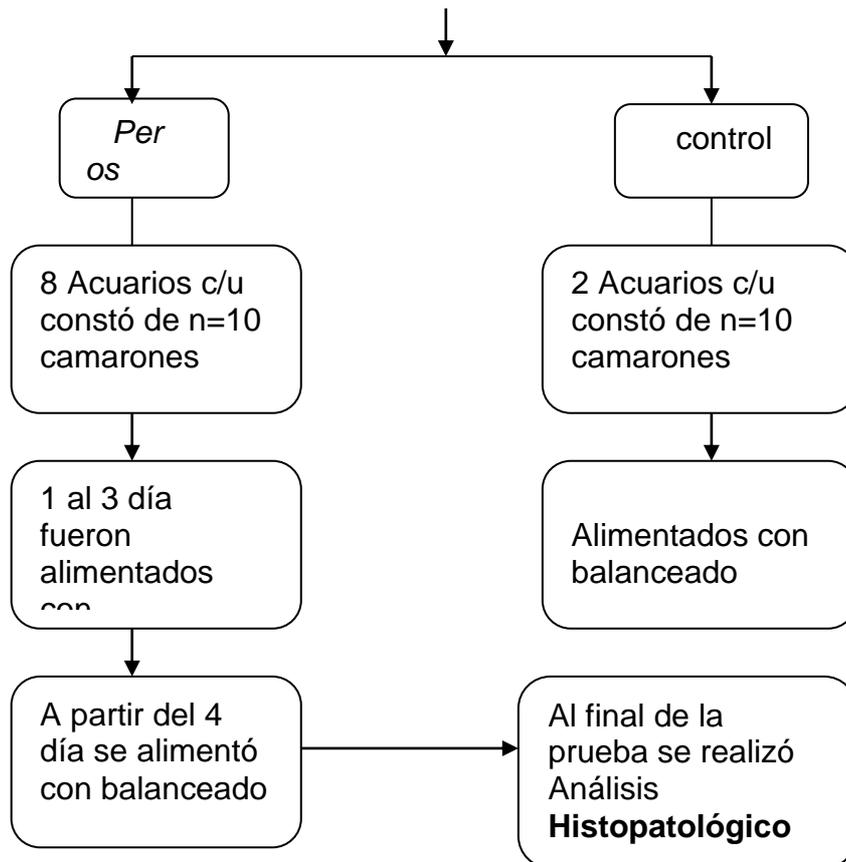
**Figura 4.** Sala experimental con bandejas de fibra de vidrio. Contienen acuarios con camarones para la siembra y pruebas tipo desafío de este estudio.

El grupo desafiado *per os* fue alimentado con IE (tejido de camarón cortados en pedazos) al tercer día post-aclimatación, utilizando una dosis equivalente al 10% de la biomasa cultivada, suministrada en dos raciones diarias sucesivamente por tres días. A partir del cuarto día luego de la entrega del IE, se proporcionó alimento balanceado hasta el final de la prueba.

El control negativo del bioensayo se les suministró alimento balanceado desde el inicio de la prueba.

Al final de la prueba, todos los camarones del tratamiento desafiado fueron cosechados y procesados para el análisis histopatológico prioritariamente, el mismo que determinó la confirmación de dos signos clínicos asociados típicamente a la necrosis muscular: la aparición de una opacidad focal a nivel del tejido muscular y la infiltración hemocítica.

Adicionalmente, se tomó al azar una muestra (n= 5 camarones) del control negativo para realizar el respectivo análisis histopatológico (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema del bioensayo 1 (reproducir la enfermedad).

### 5.6.1.1. Análisis Histopatológico

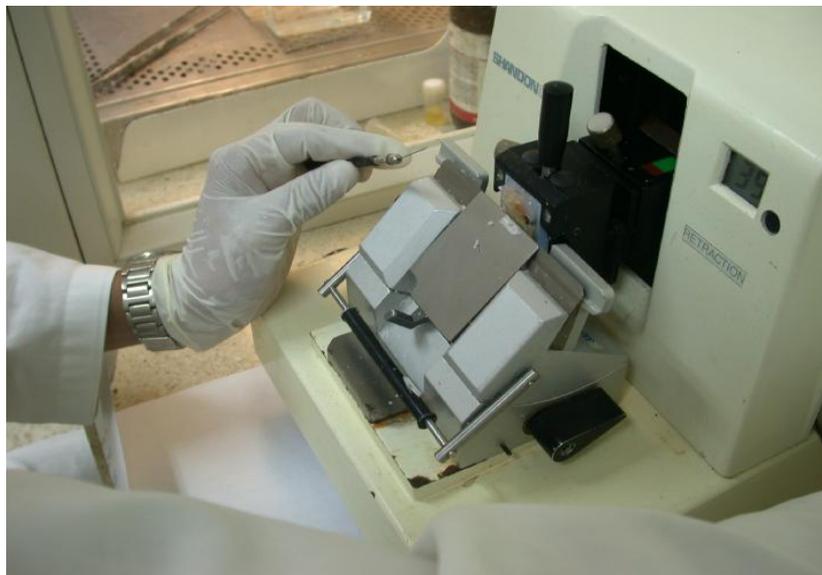
Todos los camarones sobrevivientes del tratamiento desafiado fueron fijados en Solución de Davidson y analizados individualmente para la detección de la necrosis muscular en cortes histológicos utilizando la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) según Bell & Lightner (1988).

Esta técnica provee una visión global del estado de salud del camarón. Los animales seleccionados vivos para efectuar el examen de Histopatología fueron cortados sagitalmente, inyectados y sumergidos en Solución de Davidson (330 mL de alcohol etílico, 220 mL de formol, 115 mL de ácido acético glacial y 335 mL de agua destilada), el cual es tóxico por contacto e inhalación. Por ello, para la fijación se utilizaron guantes de látex y el procesamiento fue realizado en ambiente ventilado.

Se Inyectó al menos 1 mL de Solución de Davidson en cada una de las siguientes regiones del camarón utilizado: a cada lado del hepatopáncreas y a

cada lado de la cola en cada uno de los segmentos abdominales. Luego debieron ser sumergidos en Solución de Davidson durante 24-48 h y luego transferidos al etanol al 70%. Una vez que se completó este procedimiento de fijación, los tejidos fueron colocados en las canastas metálicas que permitieron su deshidratación por inmersión en varios alcoholes de diferentes concentraciones. La secuencia de alcoholes durante la deshidratación se presenta a continuación: alcohol al 70% por 1 h, al 80% por 1 h, al 90% por 1 h, al 95% por 1 h, al 100% por 1 h (dos veces) y en xileno por 1 h (dos veces).

La siguiente etapa del procesamiento de los tejidos deshidratados fue efectuar el embebido en parafina. Esta etapa se efectuó manteniendo la parafina a una temperatura entre 56 y 58 °C. Las muestras fueron mantenidas en estructuras plásticas denominadas “cassettes”, los cuales sirvieron de molde para conformar los bloques de parafina previo al corte de los tejidos y su observación. Para el corte de los tejidos, los bloques fueron desmoldados y cortados utilizando un equipo denominado micrótomo de marca “SHANDON” (Figura 6).



**Figura 6.** Micrótomo “Shandon”. Se observa el corte de un camarón en bloque de parafina.

Se colocó el bloque de parafina en el equipo, bajando el sujetador hacia adelante de forma lenta y rebanándolos con una cuchilla de acero inoxidable.

La medida del grosor que se utilizó para efectuar el corte fue 4  $\mu\text{m}$ . A medida que las muestras eran cortadas, se colocaban en portaobjetos y puestas en la plancha térmica “Electrothermal” para su posterior secado.

Finalmente, se efectuó el montaje de los cortes sobre placas portaobjetos y se procedió a su observación al microscopio.

### 5.6.2. Bioensayo 2 (confirmación de la reproducción de la enfermedad)

El bioensayo 2 consistió de un tratamiento (grupo desafiado *per os*) y un control negativo, los cuales fueron mantenidos durante 4 semanas en una sala experimental del CENAIM. Para el tratamiento/control se utilizaron 8 y 2 acuarios respectivamente, en donde se sembraron 10 camarones por acuario (peso promedio individual  $\approx 8.5$  g). Cada acuario con capacidad individual de 40 L representó una unidad experimental. Las unidades experimentales contenían agua de mar filtrada con filtros de piola (0.25  $\mu\text{m}$ ) y esterilizada por luz U.V. (300.000  $\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ ), a temperatura experimental de 32 °C, salinidad 35 ‰ y provistos de aireación (Figura 7).



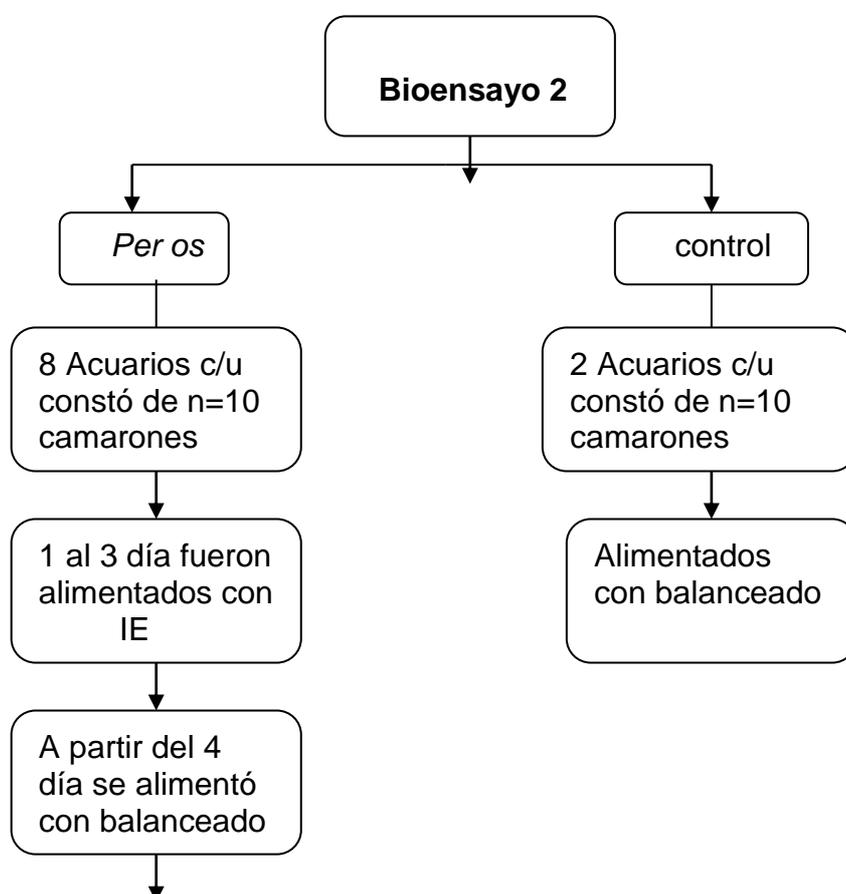
**Figura 7.** Sala experimental con bandejas de fibra de vidrio. Contienen acuarios con camarones para la siembra y pruebas tipo desafío de este estudio.

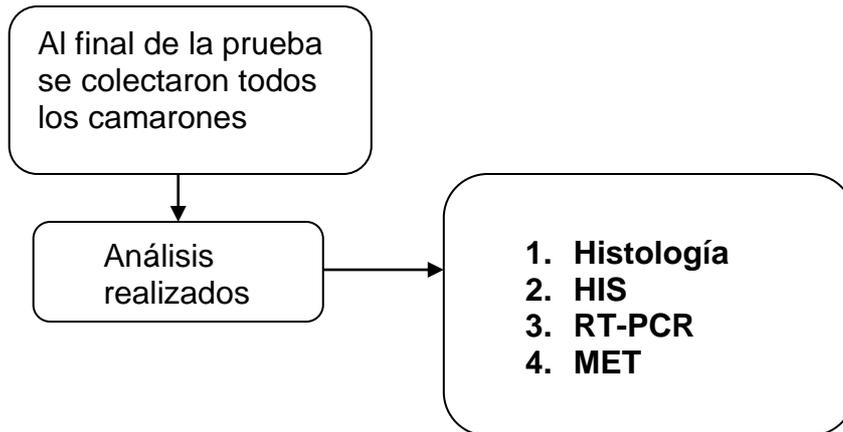
El grupo desafiado *per os* fue alimentado con IE al tercer día post-aclimatación, utilizando una dosis equivalente al 10% de la biomasa cultivada, suministrada en dos raciones diarias sucesivamente por tres días. A partir del cuarto día

luego de la entrega del IE, se proporcionó alimento balanceado hasta el final de la prueba.

El control negativo del bioensayo se les suministró alimento balanceado desde el inicio de la prueba.

Al final de la prueba, todos los camarones del tratamiento y del control fueron cosechados y procesados para los respectivos análisis. Los tejidos de todos los camarones provenientes del grupo desafiado fueron fijados para el análisis histopatológico prioritariamente, el mismo que determinó la confirmación de dos signos clínicos exclusivamente: la aparición de una opacidad focal a nivel del tejido muscular y la infiltración hemocítica. Posteriormente, solo los camarones que presentaban ambos criterios fueron procesados para 3 tipos de análisis: RT-PCR para la detección de IMNV según el protocolo del Kit comercial IQ2000™, HIS y MET que permitan identificar el agente involucrado. Adicionalmente, se tomó al azar una muestra (n= 5 camarones) del control negativo para realizar el respectivo análisis histopatológico (Figura 8).





**Figura 8.** Esquema del bioensayo 2 (confirmación de la reproducción de la enfermedad).

#### **5.6.2.1. Protocolo para la detección de agente etiológico de necrosis muscular en camarón marino mediante Hibridación *in situ* (HIS).**

Para la detección del agente etiológico de necrosis muscular en camarón marino, se procedió a deshidratar las muestras de camarón (secciones de tejidos) montadas en placas positivas pasándolas por dos baños de Xilol (6 min cada uno) y Etanol a diferentes concentraciones desde 100, 95, 90, 80 hasta 70% (3 min cada uno). Finalmente, las placas fueron bañadas con agua destilada durante 5 min.

Una vez deshidratadas cada una de las muestras, los cortes fueron bañados con PBS 1X (750  $\mu$ L) durante 15 min a fin de estabilizar los tejidos. Acto seguido, los tejidos fueron tratados con Proteinasa K (400  $\mu$ L), previamente disuelta (1 mL PBS + 8  $\mu$ L Proteinasa K por placa) por 18 min a 37.5 °C. Posteriormente, se realizó un baño de PBS glicina al 0.2% (600  $\mu$ L) durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de un baño de fijación con PBS paraformaldehído al 0.4% con el fin de fijar y reestructurar el esqueleto celular, durante 10 min a 4 °C. Durante este tiempo la sonda fue desnaturalizada en baño María a 100 °C. La sonda utilizada para HIS, se diseñó con un tampón de

hibridación de SSC (3 M NaCl, 300 mM Citrato de Sodio, pH 7.0) al 4% concentración final, formamida al 50%, solución de Denhart al 1% concentración final, 0.5 mg/mL de ADN de esperma de salmón, que contenía 0.2 µg/mL ADN marcado con Dig\_oxigenina (Roche™), amplificado a partir de iniciadores que generan un fragmento de 328 pb, basado en el siguiente par: 328F (5'-CGACGCTGCTAACCATACAA-3') y 328R (5'-ACTCGGCTGTTTCGATCAAGT-3').

Posteriormente, las placas fueron drenadas recibiendo un baño de agua destilada por 5 min a 4 °C, para luego colocar 60 µL de sonda diseñada para reconocer IMNV, previamente marcada con *Dig-oxigenina*, cubriendo las secciones con un cubreobjetos y sometidas a ebullición 100 °C durante 8 min permitiendo así la hibridación. Las placas fueron incubadas toda la noche a una temperatura de fusión de 42 °C en cámara húmeda.

Al día siguiente, las placas recibieron dos baños sucesivos de 5 min cada uno en SSC 2X, SSC 1X y SSC 0.5X respectivamente, con el fin de permitir la acomodación y fijación de la sonda. Posteriormente, las placas fueron equilibradas en dos baños con tampón TBS 1X (500 µL) durante 5 min y bloqueadas durante 15 min utilizando 500 µL de solución de bloqueo "*Blocking Buffer*" por placa, previo a la aplicación del anticuerpo.

Una vez drenadas las placas procurando no secar las secciones, se añadió 500 µL del anticuerpo antidigoxigenina "*Anti\_Dip AP conjugate*" llevándolas a incubar durante 45 min a 37 °C. Concluido el tiempo de incubación, las placas recibieron dos baños de TBS 1X durante 5 min, para después ser reveladas empleando, NBT/BCIP en Solución de Fosfatasa Alcalina (100 mM Tris HCL pH 9.5; 100mM ClNa; 0.5 mM NBT; 0.46 mM BCIP), para la posterior incubación de 3 h a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

Las placas fueron bañadas con solución "*Stop Buffer*" durante 5 min permitiendo parar la reacción de revelado. Además, se realizó un baño rápido con agua destilada durante 5 min y uno con solución de contracoloración "*Bismarck Brown Y*", durante 1 min. Finalmente, cada una de las secciones fueron deshidratadas y montadas según el protocolo rutinario de histología.

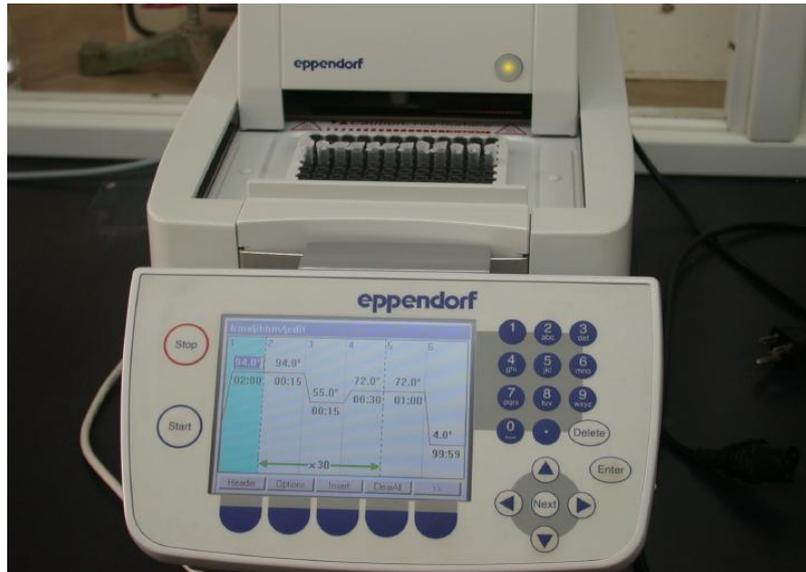
### **5.6.2.2. Extracción de ARN**

La aplicación de los protocolos de PCR requirió de una fase previa de extracción de ARN de las muestras a utilizar.

Las muestras (pleópodos) individuales fueron lavadas con agua destilada. Se les adicionó 400 µL de una solución de Isotiocianato de Guanidina. Las muestras fueron maceradas hasta destruir por completo el tejido. A continuación, fueron incubadas a 60 °C por 30 min y luego fueron dejadas a temperatura ambiente por 5 min. Se centrifugaron a 8.000 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante. Se adicionó un volumen equivalente de Isopropanol frío y se centrifugó por 15 min a 14.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se agregó un volumen de Etanol al 70% para centrifugar a 13.000 rpm por 5 min. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, se secaron a 40 °C por 30 min y se agregó 50 µL de agua estéril para resuspender el pellet de ARN. Finalmente, el material genético fue resuspendido a -20 °C.

#### **5.6.2.2.1. Protocolo del Kit IQ2000™ para detección de IMNV**

El protocolo de RT-PCR para la detección de IMNV es el descrito por el Kit comercial IQ2000™, el cual efectúa una conversión previa del material genético inicial ARN a ADN. La amplificación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, las cuales estaban basadas en las siguientes condiciones: 1 ciclo a 42 °C por 30 min y 94 °C por 2 min respectivamente, seguidos de 20 ciclos de 94 °C por 20 s, 62 °C por 20 s y 72 °C por 30 s, con una extensión final de 72 °C por 30 s y 20 °C por 30 s. Finalmente, una segunda etapa (Nested RT-PCR) de 30 ciclos con 94 °C por 20 s, 62 °C por 20 s y 72 °C por 30 s, con una extensión final de 72 °C por 30 s y 20 °C por 30 s (Figura 9).



**Figura 9.** Termociclador “Eppendorf” . Se observan las muestras de camarones sospechosos que fueron amplificadas por RT-PCR para la detección de IMNV (Kit IQ2000™).

El resultado de la amplificación fue migrado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL) y visualizado por transiluminación con luz U.V.

Finalmente, el criterio utilizado por el Kit comercial IQ2000™ para el diagnóstico de cada una de las muestras amplificadas se basó en los siguientes perfiles: Las muestras resultaron negativas cuando presentaron un amplicón de 680 pb, exclusivamente. Muestras positivas severas para IMNV presentaron amplicones de 284 y 476 pb. Finalmente, muestras positivas leves para IMNV presentaron un amplicón de 284 pb.

### **5.6.2.3. Protocolo para Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

Las muestras de tejido muscular fueron cortadas y fijadas en solución de Glutaraldehído al 2% en 0.1 M de solución tampón fosfato (PSB, pH 7.4). Posteriormente, fueron sometidas a tetróxido de osmio al 1%. A continuación, las muestras fueron deshidratadas y embebidas en resina de Spurr, seccionadas y teñidas con ácido fosfotungstico (APT) al 2%. Finalmente, las secciones fueron observadas y fotografiadas en un Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL, JEM 1010. El Dr. Yasuji Amano, investigador responsable del análisis MET y del equipamiento requerido para este análisis, forma parte

del Instituto Nacional de Higiene (INH-Guayaquil) y colaboró en esta investigación.

### **5.6.3. Bioensayo 3 (Aplicación de estrés ambiental e inóculo bacteriano)**

#### **5.6.3.1. Aislamiento y caracterización bioquímica de bacterias (inóculo bacteriano)**

Se realizó el aislamiento y caracterización bioquímica de cepas bacterianas (26119, 26122, 26126, 26128, 26129) colectadas en campo a partir de camarones con necrosis muscular. Los criterios bioquímicos utilizados para su caracterización fueron: fermentación de las descarboxilasas (Arginina, Lisina y Ornitina) y caracterización Indol y Voges.

#### **5.6.3.2. Preparación de Inóculo Bacteriano e Inyección**

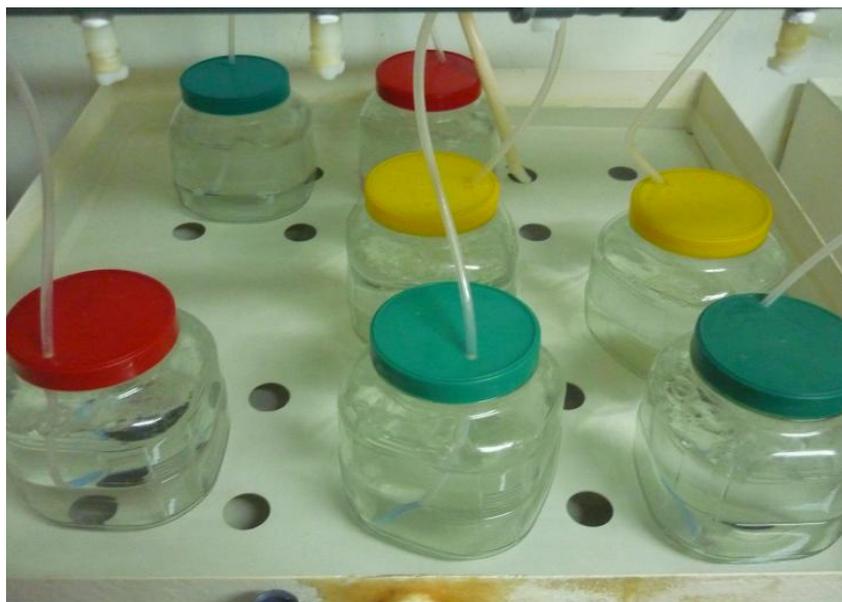
Las cepas bacterianas aisladas a partir de camarones con necrosis muscular colectados en campo, se cultivaron en placa de Agar TSA (2% NaCl) por rayado y se incubaron por 24 h a 28-30 °C. Posteriormente, para la preparación del inóculo bacteriano se empleó solución salina al 0.85% para resuspender el cultivo y realizar el ajuste de la suspensión bacteriana a la densidad deseada.

Una vez preparada la suspensión bacteriana a la densidad deseada ( $1 \times 10^4$  UFC/camarón) se procedió a inyectar a todos los camarones de los tratamientos ventralmente, a nivel del segundo segmento abdominal (50  $\mu$ L/camarón) con jeringuillas de insulina. Los camarones fueron distribuidos en la caramelera correspondiente a medida que se iba aplicando la inyección con el inóculo bacteriano. Finalmente, los camarones de los controles fueron inyectados con igual volumen de solución salina al 0.85%.

#### **5.6.3.3. Bioensayo**

Se realizó un bioensayo tipo prueba de desafío (bacteriano) vía inyección, el cual incluyó factores de estrés ambiental (variación de temperatura y baja concentración de oxígeno disuelto). Se utilizaron 6 tratamientos los cuales fueron: T1= bacterias + alta temperatura (30 °C), T2= bacterias + baja temperatura (17 °C), T3= bacterias + baja concentración de oxígeno (1 mg/L)

(Anexo 2), T4= bacterias + alta temperatura (30 °C) + baja concentración de oxígeno (1 mg/L), T5= bacterias + baja temperatura (17 °C) + baja concentración de oxígeno (1 mg/L), T6= bacterias y 6 controles sin infección (uno por cada tratamiento), los cuales fueron mantenidos durante 7 días en una sala experimental. Para cada tratamiento/control se utilizaron 5 carameleras, en donde se sembró un camarón (peso promedio individual  $\approx$  8.0 g) por caramelera (Figura 10).

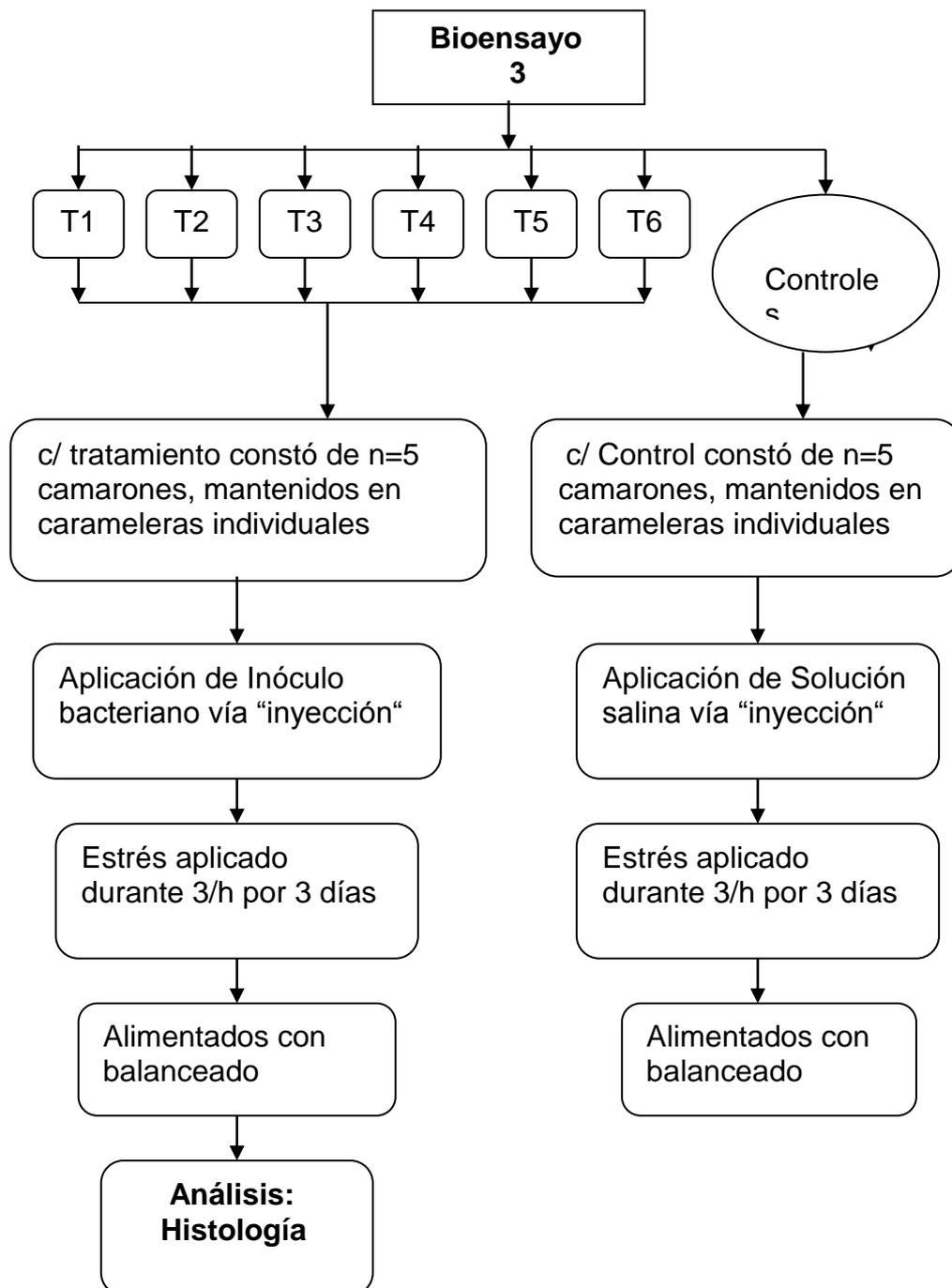


**Figura 10.** Sala experimental con bandejas de fibra de vidrio. Contienen carameleras con camarones para la siembra y prueba tipo desafío (bacteriano) de este estudio

Cada caramelera con capacidad individual de 2 L representó una unidad experimental. Las unidades experimentales contenían agua de mar filtrada con filtros de piola (0.25  $\mu\text{m}$ ) y esterilizada por luz U.V. (300.000  $\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ ), a temperatura ambiente 23 °C, salinidad 35 % y provistas de aireación.

Los camarones de los tratamientos y controles fueron expuestos a las fuentes de estrés mencionadas, durante 3 h al día por 3 días consecutivos para todos los casos. Los camarones fueron observados durante 6 días. Posteriormente, solo los camarones que presentaban regiones opacas focalizadas en los segmentos abdominales fueron procesados para el análisis histopatológico. Todos los animales de los tratamientos fueron colectados al final de la prueba para su fijación con solución de Davidson para el análisis histopatológico.

Se colectó una muestra que representó el 10% de la población del grupo control para el respectivo análisis (Figura 11).

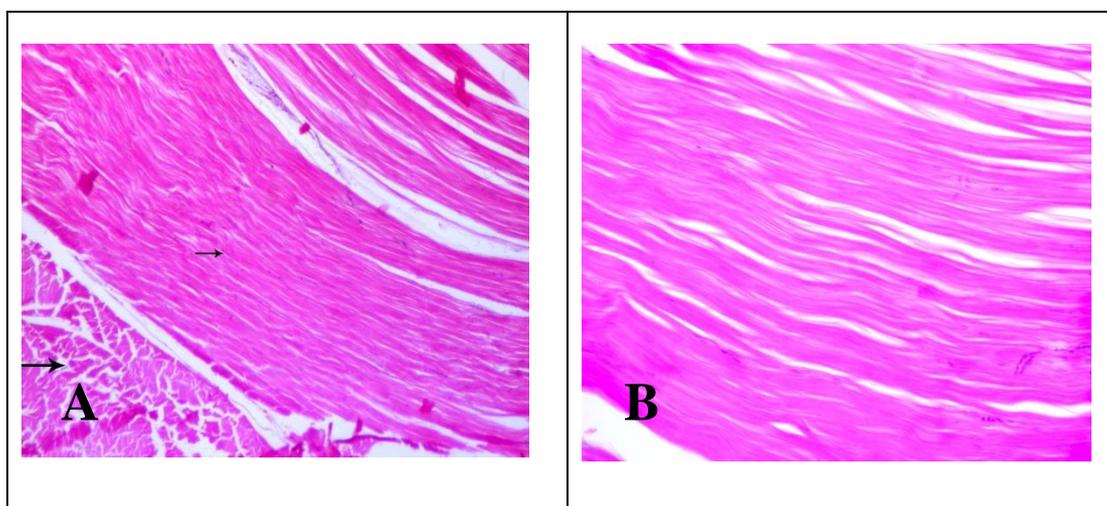


**Figura 11.** Esquema del bioensayo 3 (estrés ambiental e inóculo bacteriano).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Análisis histopatológico del material biológico

El análisis histopatológico de 10 camarones *P. vannamei* tomados aleatoriamente de la población stock (n=400) utilizada para este estudio, mostró que el 100% de los camarones analizados no presentaron lesiones (aparición normal) en tejido muscular, lo cual confirmó el buen estado de salud de la población stock (Figura 12).



**Figura 12.** Secciones longitudinales de tejido muscular de camarones *P. vannamei*. **A-B.-** Observación de estructuras sarcoméricas normales (ver flechas). Tinción de H&E. Objetivo de 10X.

### 6.2. Observación macroscópica de camarones sospechosos

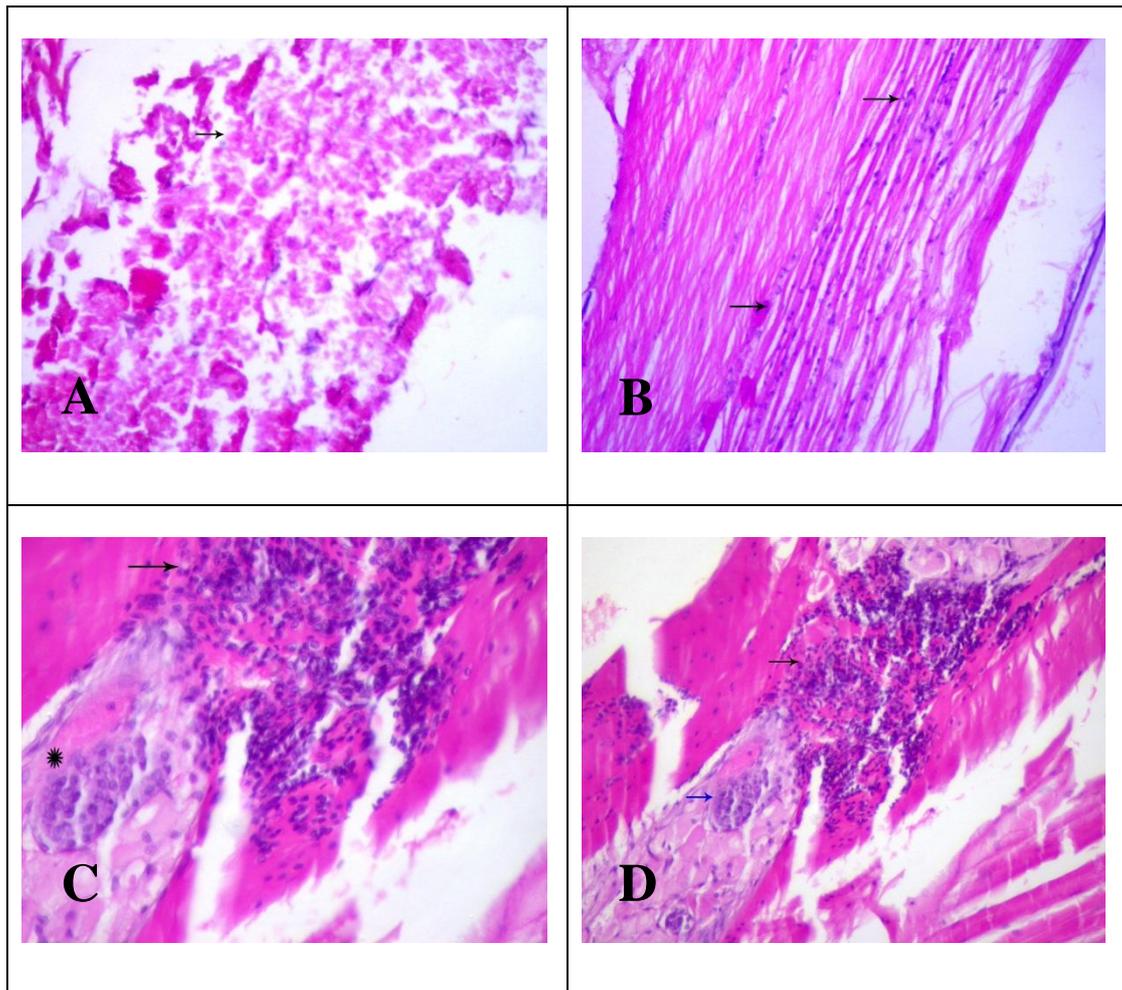
Se recolectaron 40 camarones juveniles *P. vannamei* con signos externos (Figura 13) de necrosis muscular (opacidad de los segmentos abdominales), provenientes de granjas camaroneras, los cuales fueron utilizados como inóculo original (IO) durante la prueba de desafío vía Inyección intramuscular.



**Figura 13.** Camarones *P. vannamei* del IO. **A-D.-** Se observa opacidad muscular en diferentes segmentos intermedios y distales de la cola (flecha), la cual es un signo clínico externo que está asociado con necrosis muscular.

### **6.3. Análisis histopatológico de tejidos de camarones sospechosos (IO)**

El análisis histopatológico de 10 camarones *P. vannamei* del IO confirmó que el 70% de los camarones analizados (7/10) mostraron necrosis muscular e infiltración hemocítica, con diferentes grado de lesión (Figura 14).



**Figura 14.** Secciones longitudinales de tejido muscular de camarones *P. vannamei* del IO. **A.-** Necrosis coagulativa con grado de lesión medio. Objetivo de 4X. **B.-** Infiltraciones hemocíticas con grado de lesión leve. Objetivo de 4X. **C-D.-** Extensas infiltraciones hemocíticas (flecha) y pérdida de la estructura sarcomérica normal. Sección de parafina 4 µm de grosor. Tinción H&E. Objetivo de 10X.

El diagnóstico histopatológico de cada una de las muestras de camarones estuvo basado en la descripción visual de las lesiones (daños) observadas a nivel de las regiones utilizadas para este estudio (cefalotórax y abdomen), con particular énfasis en la presencia de los dos signos clínicos de una necrosis muscular infecciosa. Una vez detectadas las lesiones, se elaboraron índices histopatológicos que permitieron cuantificar el grado de lesión causado por los dos signos antes mencionados.

El grado de lesión se basó en la técnica descrita por Lightner (1996), cuya valoración (1-4), fue establecida según el número de células observadas por campo: menor de 3 células / campo = Muy Leve (1); 3-20 células / campo =

Leve (2); 20-60 células / campo = Medio (3) y 60 ó más células / campo = Severo (4) (Tabla 1).

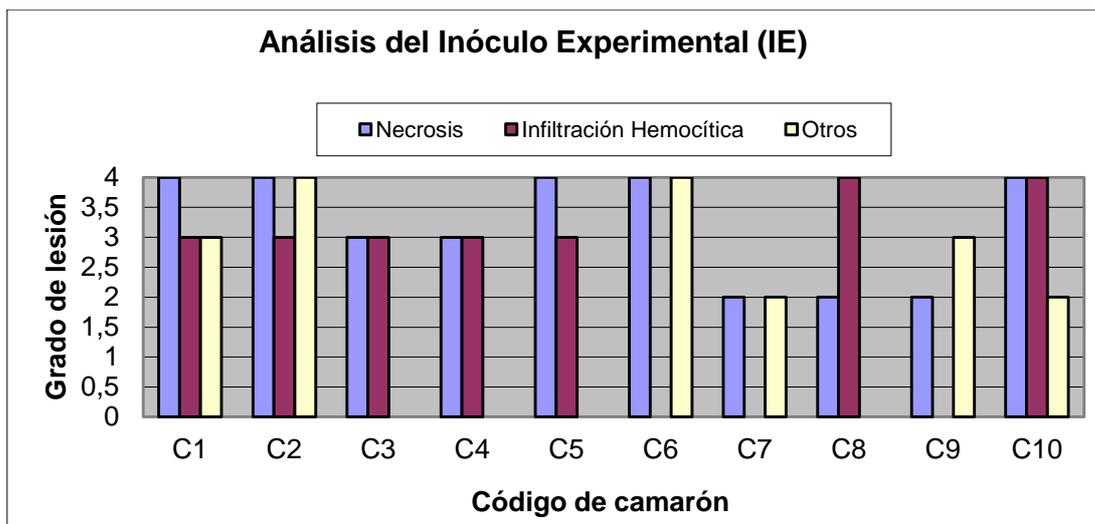
**Tabla 1.** Niveles histopatológicos que cuantifican los grado de lesión que muestran los camarones *P. vannamei* en cada una de las pruebas tipo desafío.

<b>Niveles Histopatológicos</b>	<b>Grado de Lesión (1-4)</b>
Menor de células/campo	Muy Leve
3-20 células /campo	Leve
20-60 célula/campo	Medio
60 o más células/campo	Severo

#### **6.4. Análisis histopatológico del Inóculo Experimental (IE)**

La figura 15 detalla el grado de lesión que presentaron los camarones del IE respecto a los dos signos clínicos asociados a necrosis muscular infecciosa. De los 10 camarones analizados, 7 exhibieron ambos signos clínicos, específicamente el 57% de los camarones (4/7) mostraron un grado de lesión severo, 29% de los camarones (2/7) un grado de lesión medio y 14% de los camarones (1/7) un grado de lesión leve.

Estas evidencias obtenidas a partir del análisis histopatológico del IE, permitieron confirmar su utilidad en las pruebas de desafío del bioensayo 1 y 2 respectivamente.



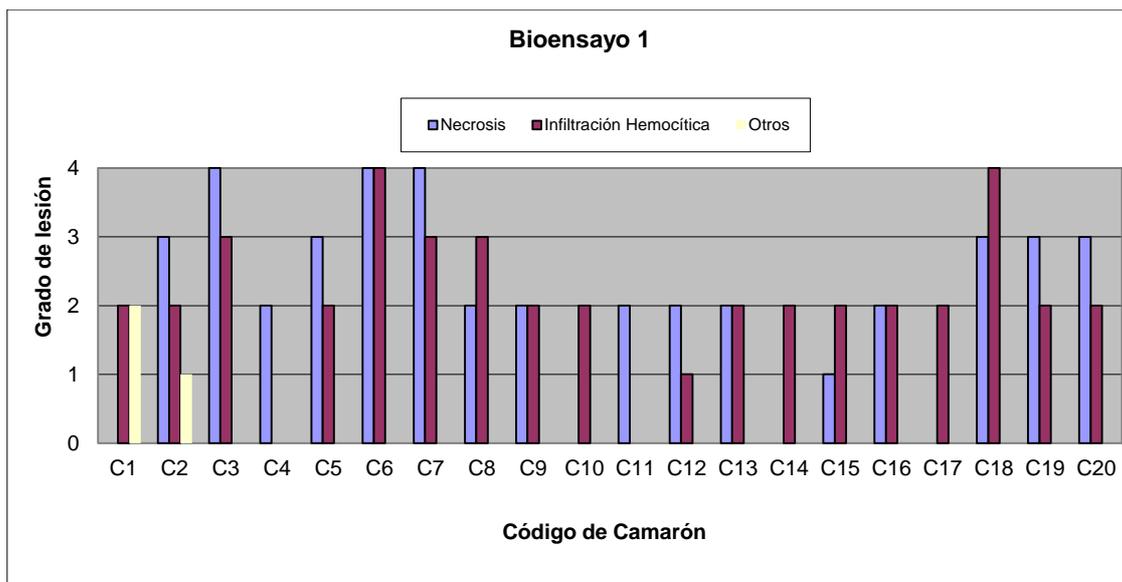
**Figura 15.** Grado de lesión que mostraron los camarones *P. vannamei* del IE respecto a los dos signos clínicos asociados a necrosis muscular infecciosa: Escala 1= Muy Leve; 2= Leve; 3= Medio y 4= Severo.

## 6.5. Bioensayo 1 (reproducción de la enfermedad)

### 6.5.1. Histología

En concordancia con los postulados de Koch y Rivers que establecen como condición esencial que animales sanos desarrollen enfermedad luego de ser expuestos al IE (agente sospechoso), los resultados histopatológicos de este bioensayo señalaron que el 70% de los camarones analizados (14/20) mostraron la sintomatología típica de una necrosis muscular infecciosa (Figura 16).

El bioensayo 1 estuvo basado en una prueba de desafío (bioensayo en el que bajo dosis y períodos determinados, un hospedero es expuesto a un agente infeccioso, el cual puede ser bacteriano, viral, fúngico, etc).



**Figura 16.** Grado de lesión que presentaron los camarones *P. vannamei* del bioensayo 1 respecto a los dos signos clínicos asociados a necrosis muscular infecciosa (necrosis muscular e infiltración hemocítica).

Por otro lado, no se observaron signos clínicos de necrosis muscular en la muestra de 5 camarones correspondiente al control negativo de este bioensayo.

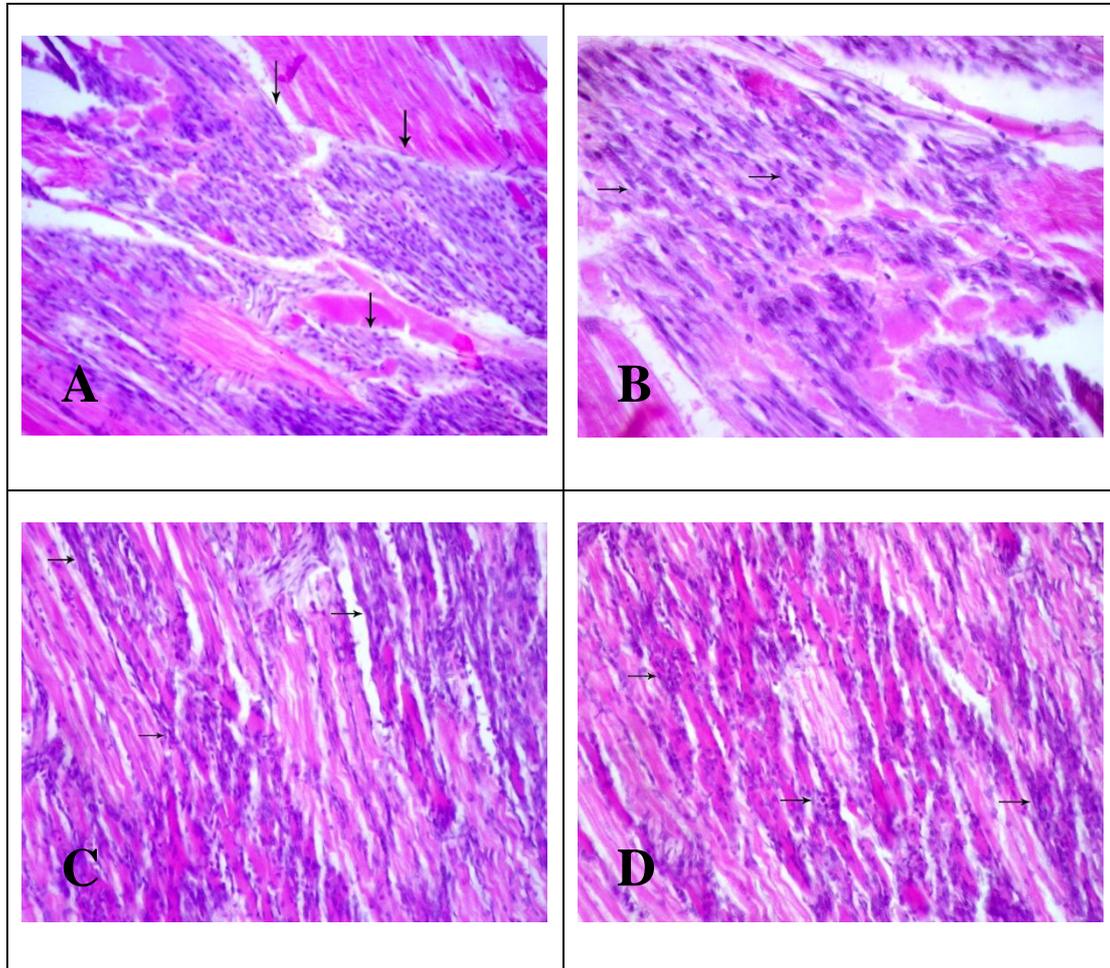
## 6.6. Bioensayo 2 (confirmación)

En el bioensayo 2 se hicieron 4 tipos de análisis para determinar la etiología del agente causal de la necrosis muscular en camarón *P. vannamei* cultivado a nivel local:

1. Histología.
2. PCR por Transcripción Reversa (RT-PCR).
3. Hibridación *in situ* (HIS).
4. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

### 6.6.1. Histología

En este bioensayo se observó que el 70% (48/69) de camarones *P. vannamei* presentaron los dos signos clínicos de la necrosis muscular infecciosa (Figura 17).



**Figura 17.** Secciones longitudinales de tejido muscular de camarones *P. vannamei*. **A-D.-** Se observan grado de lesión severo de necrosis coagulativa y extensas infiltraciones hemocíticas (flecha). Además, de la pérdida de la estructura sarcomérica normal. Sección de parafina 4  $\mu$ m de grosor. Tinción H&E. Objetivo de 10X.

El diagnóstico histopatológico realizado a este grupo de camarones mostró que el 44% (21/48) presentaron daños en tejido muscular (necrosis e infiltración hemocítica) con grado de lesión 4 (severo), 37% (18/48) mostraron grado de

lesión 3 (medio) y 19% (9/48) grado de lesión 2 (leve). En promedio, el  $71 \pm 18.7\%$  de la población desafiada mostró necrosis muscular infecciosa (Tabla 2).

**Tabla 2.** Grado de lesión que mostraron los camarones *P. vannamei* del bioensayo 2 expuestos a prueba de desafío vía “per os”.

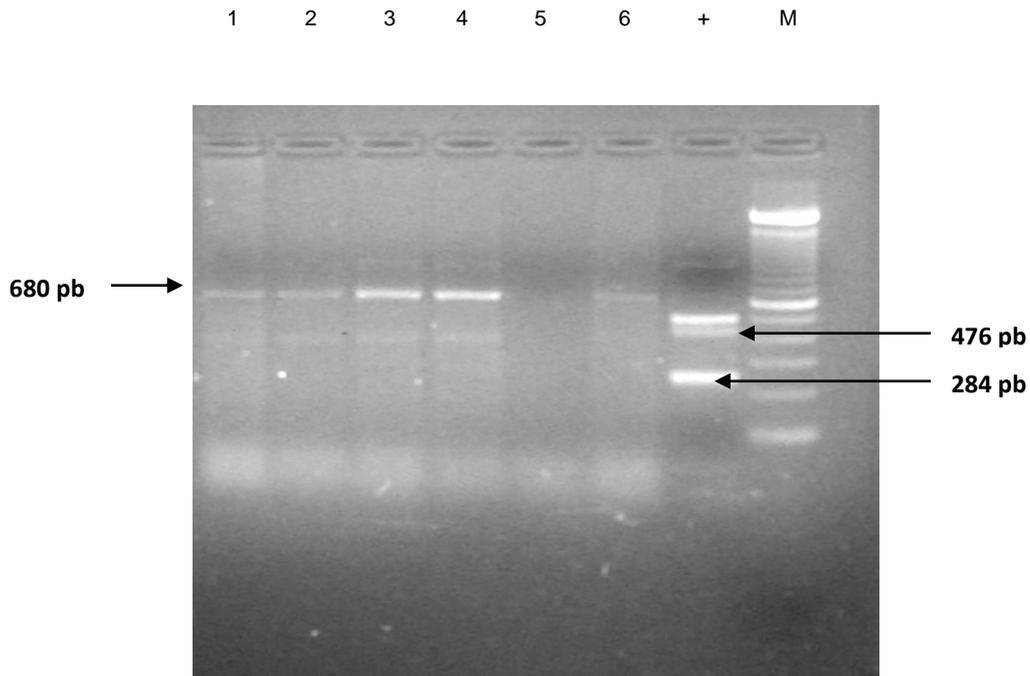
No. de acuario	Total de camarones fijados (CF) Post-desafío	Camarones con signos clínicos de necrosis muscular infecciosa (CNMI)	Grado de Lesión (GL) Post-desafío
1	9	4/9 (45%)	Leve
2	9	5/9 (56%)	Medio
3	10	6/10 (60%)	Medio
4	8	5/8 (63%)	Leve
5	10	7/10 (70%)	Medio
6	7	6/7 (86%)	Severo
7	8	7/8 (88%)	Severo
8	8	8/8 (100%)	Severo
<b>Promedio</b>		<b>71%</b>	
<b>Desviación Estándar</b>		<b>18,7</b>	

**CF:** Número total de camarones colectados y fijados post-desafío para el respectivo análisis histopatológico. **CNMI:** Número total de camarones que mostraron evidencias histopatológicas de una necrosis muscular Infecciosa (necrosis e infiltración hemocítica) con diferente grado de lesión. **GL:** Grado de lesión que se observó en tejido muscular de los camarones con los dos signos clínicos de una necrosis muscular infecciosa.

Finalmente, evidencias del análisis histopatológico de los camarones del control negativo (5/5) utilizado para este bioensayo revelaron la ausencia de signos clínicos característicos de necrosis muscular.

### 6.6.2. PCR por Transcripción Reversa (RT-PCR)

El resultado del análisis de RT-PCR para la detección de IMNV (Kit IQ2000™), mostró que al ser amplificadas las muestras de camarones sospechosos (n=25) recolectados durante la prueba tipo desafío, todas resultaron negativas para este virus (Figura 18).



**Figura 18.** Gel de electroforesis presenta los productos amplificados por RT-PCR para la detección de IMNV (kit IQ2000™). Pozos 1-6: camarones negativos con un amplicón de 680 pb (Control interno). Control positivo (+) corresponde a ARN de camarón infectado con IMNV, el cual presenta dos amplicones de 284 y 476 pb, respectivamente. El marcador de peso molecular (M) es de 1 Kb (Invitrogen™).

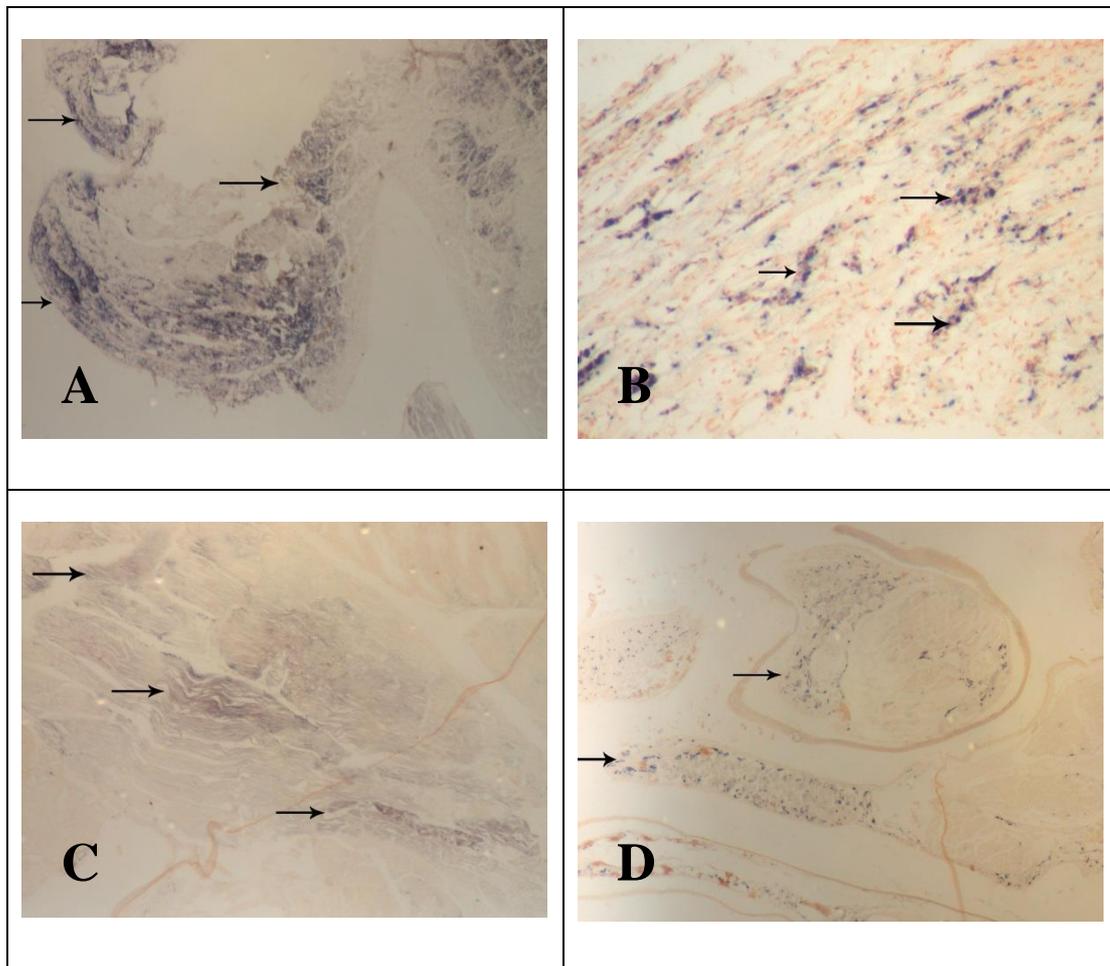
### 6.6.3. Hibridación *in situ* (HIS)

Las muestras utilizadas para la detección de IMNV mediante el análisis de HIS fueron seleccionadas en base a presentar los dos signos clínicos, confirmados por Histología.

Se analizaron 25 camarones en total, de los cuales el 52% (13/25) presentó señal positiva (precipitados de color azul) en sus tejidos (cefalotórax y abdomen). Específicamente, 7 presentaron señal en el tejido muscular (abdomen) y 6 mostraron señal en el tejido conectivo del cefalotórax (Figura 19).

La sonda utilizada para HIS, se diseñó con un tampón de hibridación de SSC al 4% concentración final, formamida al 50%, solución de Denhart al 1% concentración final, 0.5 mg/mL de ADN de esperma de salmón, que contenía 0.2 µg/mL ADN marcado con Dig\_Oxigenina (Roche™), amplificado a partir de iniciadores de 328 pb, basado en el siguiente par 328F (5´-

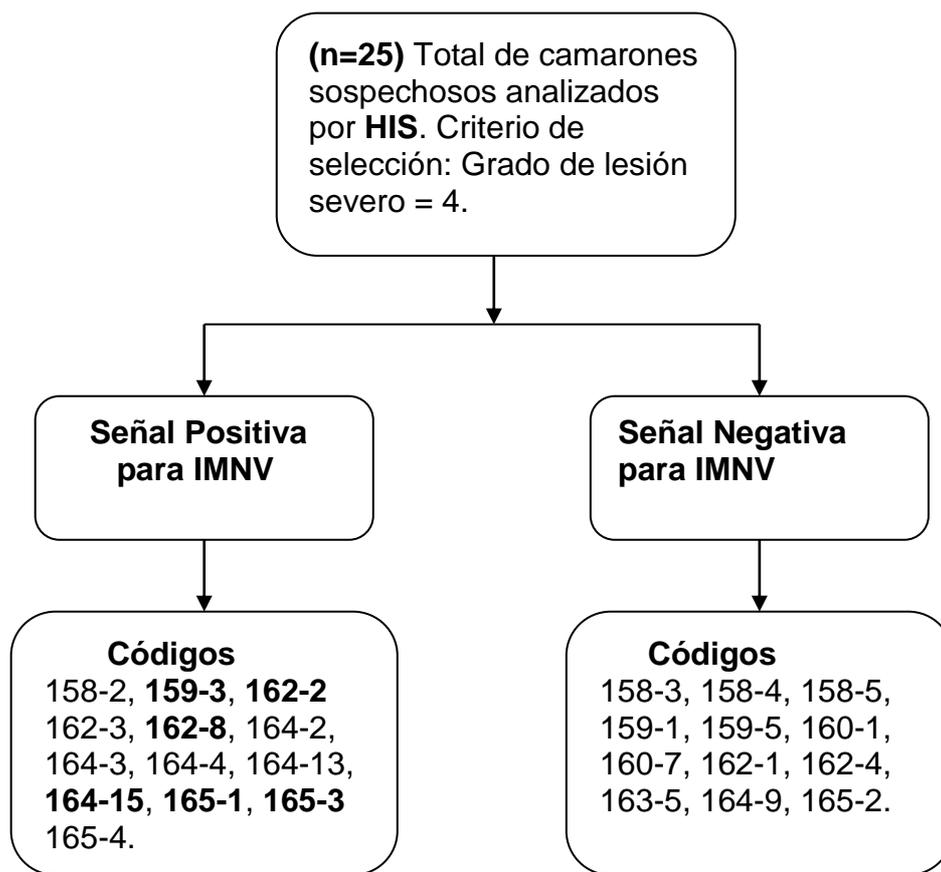
CGACGCTGCTAACCATACAA-3') y 328R (5'-ACTCGGCTGTTCGATCAAGT-3'), para la detección de IMNV.



**Figura 19.** Hibridación *in situ* (HIS) en secciones longitudinales de tejidos de camarones *P. vannamei*. **A.-** Señal positiva en músculo del control positivo de IMNV. Objetivo de 10X. **B-C.-** Tejidos musculares de camarones desafiados localmente muestran señal positiva para IMNV. Objetivo de 10X. **D.-** Tejido conectivo del cefalotórax muestra señal positiva de IMNV en camarones desafiados localmente. Objetivo de 10X.

Los resultados obtenidos por HIS, condujeron a realizar un segundo análisis para la confirmación de las señales positivas mostradas en 13/25 camarones analizados. Por tal motivo, se decidió tomar aleatoriamente (6/13) camarones cuyos códigos fueron (159-3, 162-2, 162-8, 164-15, 165-1, 165-3, 165-4), para realizar dicha confirmación (Figura 20).

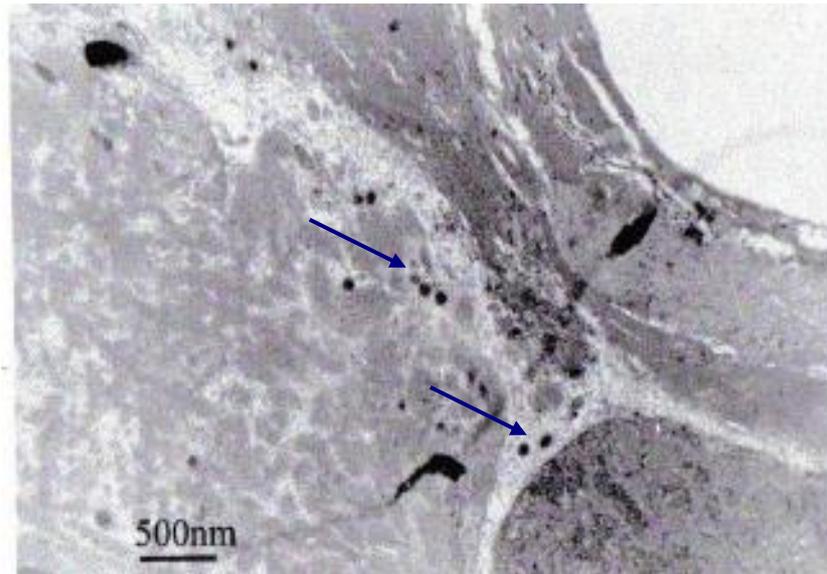
Finalmente, los 6 camarones analizados por segunda ocasión mostraron nuevamente la señal positiva para IMNV (Anexo 3).



**Figura 20:** Esquema del número total de muestras analizadas por HIS. Los códigos marcados con negrillas corresponden a los camarones analizados 2 veces consecutivas por el mismo método.

#### 6.6.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

En las muestras de tejido muscular de 6 camarones sospechosos (colectados del IE) analizados por MET, no se encontró partícula viral alguna asociada con la familia *Totiviridae* (Figura 21).



**Figura 21.** Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Se observa tejido muscular necrosado con presencia de viriones de WSSV (ver flecha), vistos transversalmente con tinción negativa.

Finalmente, la tabla 3 muestra el número total de camarones (n= 25) del bioensayo 2 analizados por las 4 técnicas de laboratorio (histología, RT-PCR, HIS y MET) utilizadas en este estudio para la determinación del agente causal de la necrosis muscular. El criterio de selección fue la presencia de necrosis e infiltración hemocítica a nivel de los dos tejidos de estudio (cefalotórax y abdomen) con grado de lesión severo (4).

**Tabla 3.** Tipos de análisis para la detección de IMNV, que se realizaron a los camarones que presentaron signos clínicos de necrosis muscular infecciosa (necrosis e infiltración hemocítica).

No. de camarones	Tipos de Análisis			
	Histología	RT-PCR	HIS	MET
1	+	-	+	-
2	+	-	+	-
3	+	-	-	-

4	+	-	+	-
5	+	-	-	-
6	+	-	+	-
7	+	NA	-	NA
8	+	-	+	NA
9	+	-	+	NA
10	+	-	-	NA
11	+	-	+	NA
12	+	-	-	NA
13	+	NA	-	NA
14	+	-	-	NA
15	+	-	+	NA
16	+	-	-	NA
17	+	-	+	NA
18	+	-	+	NA
19	+	NA	-	NA
20	+	-	+	NA
21	+	-	-	NA
22	+	-	-	NA
23	+	-	+	NA
24	+	-	-	NA
25	+	-	+	NA

(1-25): Total de camarones analizados por histología, RT-PCR, HIS y MET debido a la presencia de necrosis e infiltración hemocítica a nivel de los dos tejidos de estudio (cefalotórax y abdomen). **(+)**: Diagnóstico y señal positiva para el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV), presente en los camarones seleccionados en base a presencia de los dos signos clínicos antes mencionados. **(-)**: Diagnóstico y señal negativa para el virus del IMNV. **(NA)**: muestras no analizadas.

### 6.7. Bioensayo 3 (Aplicación de estrés ambiental e inóculo bacteriano)

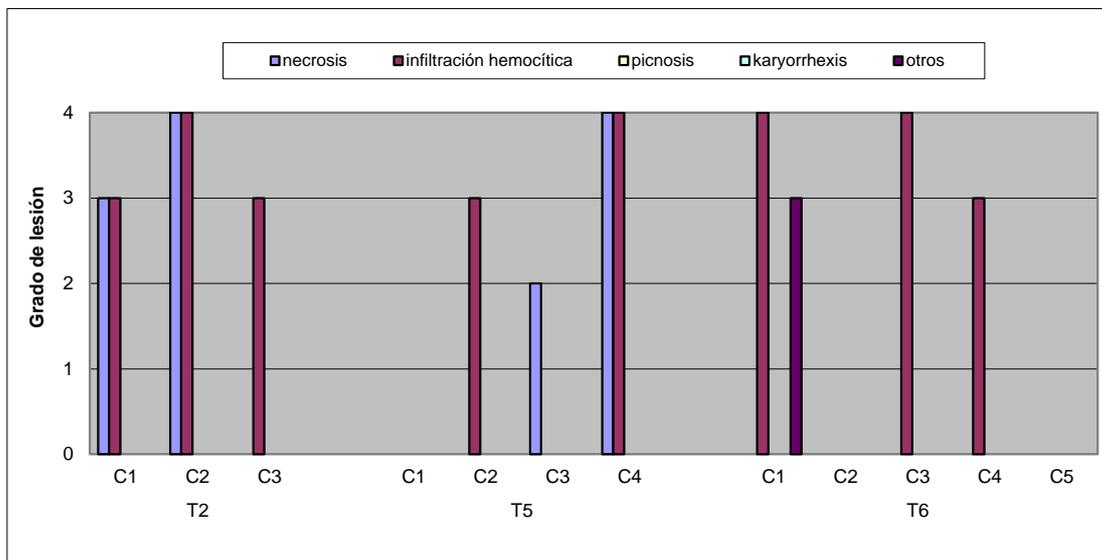
En este bioensayo se realizó 1 tipo de análisis:

1. Histología.

#### 6.7.1. Histología

El análisis histopatológico reveló que 2/3 camarones sobrevivientes del tratamiento T2 (bacterias + baja temperatura 17 °C), mostraron los dos signos clínicos de necrosis muscular infecciosa, mientras que 1/4 camarones del tratamiento T5 (bacterias + baja temperatura 17 °C + baja concentración de oxígeno disuelto 1 mg/L) mostraron tales signos. En el tratamiento T6 (solo

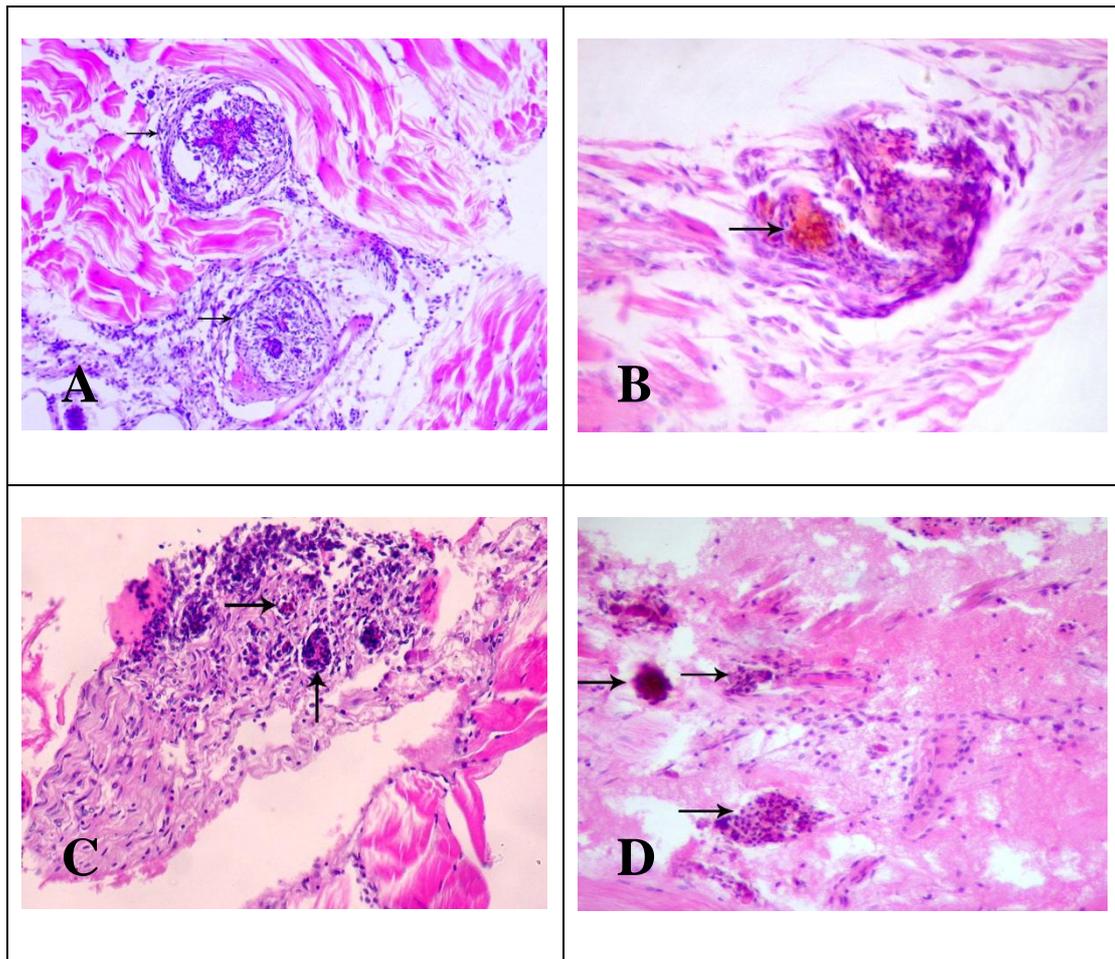
bacterias), no se observaron los dos signos clínicos en tejido muscular (Figura 22).



**Figura 22.** Grado de lesión que presentaron los camarones *P. vannamei* del bioensayo 3. En el T2 (bacterias + baja temperatura 17 °C), 2/3 camarones mostraron los dos signos clínicos de necrosis muscular infecciosa. T1= bacterias + alta temperatura (30 °C), T2= bacterias + baja temperatura (17 °C), T3= bacterias + baja concentración de oxígeno disuelto (1 mg/L), T4= bacterias + alta temperatura (30 °C) + baja concentración de oxígeno disuelto (1 mg/L), T5= bacterias + baja temperatura (17 °C) + baja concentración de oxígeno disuelto (1 mg/L), T6= bacterias.

Complementariamente, se determinó que el grupo de camarones analizados de T2 mostraron la presencia de lesiones típicas producidas por bacterias a nivel del tejido muscular, como: nodulación hemocítica, melanización e infiltración hemocítica, acompañadas de la pérdida de la estructura sarcomérica normal (Figura 23).

Los tratamientos T1 (bacterias + alta temperatura 30 °C), T3 (bacterias + baja concentración de oxígeno disuelto 1 mg/L) y T4 (bacterias + alta temperatura 30 °C + baja concentración de oxígeno disuelto 1 mg/L) no mostraron tales signos clínicos.



**Figura 23.** Secciones longitudinales de tejido muscular de camarones *P. vannamei* del T2 (bacterias + baja temperatura 17 °C). **A.-** Presencia de nódulos hemocíticos (ver flechas), con pérdida de la estructura sarcomérica normal. Objetivo de 10X **B.-** Presencia de nódulos hemocíticos con melanización interior. Objetivo de 10X. **C.-** Pérdida de la estructura sarcomérica normal con grandes infiltraciones y nodulaciones hemocíticas. Objetivo de 4X. **D.-** Presencia de melanización, nodulación e infiltraciones hemocíticas. Sección de parafina 4 µm de grosor. Tinción H&E. Objetivo de 4X.

Finalmente, los camarones de los controles negativos correspondientes a cada tratamiento no mostraron lesiones en tejido muscular.

## DISCUSIÓN

El camarón marino *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* es la especie más cultivada a nivel mundial, con un incremento de 1000% en su producción total,

al pasar de 145.387 T en el año 2000 a 1'599.423 T al concluir el año 2005 (FAO, 2006).

Al ser la especie de camarón más relevante con fines acuícolas, se ha establecido un gran énfasis en la identificación y control de los agentes patógenos causantes de enfermedades que afectan su cultivo. Según lo reportado en la literatura científica, al menos 8 virus han sido asociados con su producción: *Baculovirus penaei* (BP) (LeBlanc & Overstreet, 1990), Hepatopancreatic parvovirus (HPV) (Lightner & Redman, 1992; Bonami *et al.*, 1995), Infectious Hypodermal and Haematopoietic necrosis virus (IHHNV) (Bonami *et al.*, 1991), Taura Syndrome Virus (TSV) (Hasson *et al.*, 1995; Bonami *et al.*, 1997), White Spot Syndrome Virus (WSSV) (Lightner, 1996), Yellow Head Virus (YHV) (de la Rosa-Vélez *et al.*, 2006), Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) (Poulos *et al.*, 2006) y *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV) (Tang *et al.*, 2007).

En los sistemas de producción de camarón cultivado en Ecuador, la mayoría de tales patógenos han sido reportados, con excepción de YHV, IMNV y PvNV. Respecto a los reportados, el WSSV sigue siendo notorio por estar asociado con mortalidades en los cultivos de camarón, las cuales han pasado de ser frecuentes y considerablemente altas a esporádicas y moderadas. Los registros de camarón exportado durante los últimos años corroboran este comportamiento (CNA, 2009).

En este panorama de evidente bienestar, se aprecia poco interés del sector productor para estar preparado ante posibles eventos de problemas infecciosos emergentes (ingreso de patógenos exóticos), lo cual podría tener serias repercusiones sobre la producción nacional actual.

En 2006 se produjo el hallazgo y descripción inicial de signos clínicos asociados con un trastorno denominado *necrosis muscular* en cultivos de camarón marino al sur de la provincia del Guayas. Por las consecuencias derivadas de la presencia de patógenos virales asociados a la expresión de necrosis muscular en Brasil (Poulos *et al.*, 2006) y Belice (Tang *et al.*, 2007), se volvió imprescindible plantear y desarrollar una investigación científica para

determinar la etiología de la necrosis muscular observada localmente en cultivos de *P. vannamei*.

Para este propósito se planificaron y ejecutaron 2 bioensayos a fin de realizar la demostración de la reproducción de la enfermedad en una población sana de camarones *P. vannamei* bajo condiciones experimentales, complementada con la aplicación de técnicas de laboratorio para dilucidar el tipo de agente etiológico involucrado. En forma adicional se realizó un tercer bioensayo, el cual consistió en un desafío bacteriano (cepas de *Vibrios* aislados a partir de camarones con necrosis muscular) y dos fuentes de estrés asociadas con la aparición de este trastorno: variación de temperatura y reducción de la concentración de oxígeno disuelto.

Los resultados obtenidos en el Bioensayo 1, desarrollado en un período de 4 semanas, muestran que la enfermedad pudo ser reproducida en hospederos sanos (determinados por Histología) por medio de un desafío *per os* con tejidos de camarones con necrosis muscular provenientes del inóculo experimental (IE). De 80 camarones desafiados, 20 (25% de la población total) mostraron signos clínicos externos de la enfermedad (necrosis muscular), confirmándose por análisis histopatológico el estado de necrosis en 14 camarones (17.5% del total).

En el Bioensayo 2, efectuado en iguales condiciones que el anterior, se encontró un mayor número de camarones enfermos (69/80 = 86% del total), confirmándose por análisis histopatológico los signos clínicos asociados a necrosis muscular en 48 camarones (60% del total). Para la identificación del patógeno se emplearon 3 técnicas de laboratorio de amplio uso en investigación patológica: Reverse-transcriptase PCR (RT-PCR), *in situ* Hybridization (HIS) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

El protocolo de RT-PCR para IMNV, basado en el Kit comercial IQ2000™, se utilizó para evaluar el ARN de los camarones individuales desafiados, siendo negativas todas las muestras. Aunque estos resultados deben ser considerados como correctos, existen circunstancias que podrían explicar lo obtenido. Por una parte, los virus son el grupo de organismos que evolucionan

más rápidamente por los procesos de selección natural y mutación (Suttle, 2005). En tales circunstancias, los genomas virales experimentan cambios en sus secuencias que pueden ocasionar alteraciones importantes en sitios genómicos utilizados por los iniciadores durante el proceso de construcción de los amplicones de IMNV. Al respecto, Senapin *et al.* (2007) reportaron que al analizar mediante Kit IQ2000™ para IMNV a 4 camarones *P. vannamei* con evidente necrosis muscular cultivados en Indonesia, se obtuvieron resultados negativos en 3 de 4 casos. Los autores consideraron la necesidad de desarrollar un protocolo alternativo basado en iniciadores diseñados sobre la región del ARN polimerasa dependiente de ARN, enzima utilizada por el IMNV para su proceso de proliferación. Se trata de una región idónea para esta aplicación al ser altamente conservada. Los resultados obtenidos luego de la aplicación del protocolo permitieron obtener 100% de resultados positivos, comprobándose que el Kit IQ2000™ produjo falsos negativos.

Un protocolo de HIS fue desarrollado para la detección de IMNV utilizando como sonda nucleica un fragmento de 328 pb, el cual provino del protocolo de RT-PCR desarrollado por Poulos *et al.* (2006). A partir de 25 muestras (camarones individuales) seleccionadas por su grado de severidad de lesiones asociadas con necrosis muscular, se obtuvo un total de 13 muestras positivas por HIS, 6 de las cuales fueron analizadas por segunda ocasión para confirmar los resultados previos. Las restantes 12 muestras resultaron negativas. En todos los casos, se aplicaron controles positivos y negativos adecuados de acuerdo con lo establecido por la técnica.

Para el caso de MET, es necesario señalar que su aplicación se efectuó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto Nacional de Higiene (INH) Leopoldo Izquieta Pérez en Guayaquil, único lugar en el país donde se realiza la aplicación de la técnica en Salud Humana y Animal. El Dr. Yasuji Amano, experto en MET, colaboró con la examinación de 6 muestras (tejido muscular necrosado). En todos los casos no se registró presencia de viriones de IMNV. El uso de esta técnica ha permitido desarrollar estudios ultraestructurales de IHNV (Bonami *et al.*, 1991), TSV (Bonami *et al.*, 1997), WSSV (Huang *et al.*, 2001; Amano *et al.*, 2010), entre otros. Para este estudio, un problema ligado con los análisis constituyó el limitado número de muestras observadas, lo cual

estuvo intrínsecamente ligado a la disponibilidad de tiempo del investigador del INH.

Finalmente, el Bioensayo 3 se extendió por 7 días y utilizó dos fuentes de estrés: variación de temperatura y reducción de la concentración de oxígeno disuelto, y un inóculo bacteriano (*Vibrio pelagicus*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*) suministrado vía inyección. Los análisis histopatológicos revelaron que 2 camarones sobrevivientes del tratamiento T2 (bacterias + baja temperatura), mostraron signos clínicos característicos de una necrosis muscular de origen infeccioso, debido a la infiltración hemocítica y destrucción del tejido muscular estriado del camarón. De los resultados obtenidos, también se desprende que los factores de estrés utilizados o el inóculo bacteriano por sí solos no bastaron para inducir los signos clínicos característicos de la necrosis muscular en *P. vannamei*. Por otra parte, estos resultados son interesantes porque ofrecen la posibilidad de señalar a otros agentes involucrados (bacterias) en el desarrollo de esta enfermedad. Al respecto, existen evidencias que señalan la presencia de elevadas cargas bacterianas en hepatopáncreas y hemolinfa de camarones infectados previamente con IMNV, lo cual demostraría que luego de producirse la inmunodepresión de los camarones infectados por el virus, quedarían propensos a ser vulnerados por patógenos oportunistas, promoviendo el proceso de mortalidad (Vieira *et al.*, 2006).

La literatura especializada señala que existen 2 tipos de necrosis muscular: la de origen no infeccioso y la infecciosa (Evans *et al.*, 1999). Estos autores han estudiado la necrosis muscular en crustáceos y han determinado que existen dos tipos de necrosis muscular: la necrosis acompañada de una extensa infiltración hemocítica (respuesta inflamatoria) y la necrosis que no presenta respuesta inflamatoria. Complementariamente, esta investigación ha aseverado que la necrosis muscular sin respuesta inflamatoria ocurriría como consecuencia de estrés de origen ambiental, mientras que la infiltración hemocítica se presentaría en respuesta al daño causado por patógenos.

En el caso de la necrosis no infecciosa, como expresión metabólica causada por algún parámetro ambiental como la temperatura y/o concentración de

oxígeno disuelto, de efecto reversible y sin mortalidad asociada, tenemos lo ocurrido con poblaciones de camarón *Penaeus aztecus* en la Bahía de Galveston (Texas) que al ser sometidos a bajas concentraciones de oxígeno, se observaron áreas de color blanco irregular en diferentes segmentos del abdomen (Rigdon & Baxter, 1970). Un caso similar se presentó en *Macrobrachium rosenbergii*, debido a que en los tanques de cultivo los camarones eran mantenidos con bajos niveles de oxígeno (Nash *et al.*, 1987).

En cuanto a la necrosis muscular causada por agentes infecciosos se pueden citar casos en donde han intervenido *microsporidios* (Ramasamy, 1985; Ramasamy *et al.*, 2001); bacterias, como las *Pseudoalteromonas spp* y *Vibrio spp* identificadas en la langosta *Nephrops norvegicus* (Rigdway *et al.*, 2007) y los virus *Macrobrachium rosenbergii nodavirus* (MrNV) (Arcier *et al.*, 1999); el Virus de Mionecrosis infecciosa (IMNV) (Poulos *et al.*, 2006) y el *Penaeus vannamei nodavirus* (PvNV) (Tang *et al.*, 2007).

En definitiva, este estudio demostró que la necrosis muscular manifestada en *P. vannamei* es de origen infeccioso, y por las evidencias obtenidas a partir de HIS se sugiere la presencia de IMNV en 13 muestras analizadas. Por otra parte, la aplicación de factores de estrés ambiental bajo nuestras condiciones de trabajo no inducen la aparición de la necrosis muscular en camarón *P. vannamei*. Sin embargo, el estrés por baja temperatura (17 °C) acompañado de un desafío bacteriano (*Vibrio*) pueden inducirla. Las implicaciones derivadas de la presencia de un patógeno no reportado en los sistemas locales de producción de camarón marino vuelven imprescindible una verificación ulterior de los resultados de HIS con el mismo material analizado en esta investigación. Tal verificación deberá realizarse en un laboratorio externo que cuente con la aprobación de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), para confirmar los resultados obtenidos.

## CONCLUSIONES

- Este estudio ha permitido obtener la reproducción de la enfermedad (necrosis muscular), bajo condiciones de laboratorio, en el camarón blanco *P. vannamei*.
- En base a la reproducibilidad de la enfermedad, la necrosis muscular observada en el cultivo de camarón blanco *P. vannamei* en Ecuador es de origen infeccioso.
- Las evidencias histopatológicas concernientes a las lesiones observadas en el tejido muscular de los camarones desafiados

experimentalmente, son muy similares a las causadas por el Virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV).

- Las evidencias obtenidas por HIS, bajo nuestras condiciones de trabajo, sugieren que las muestras locales de camarones con necrosis muscular, son positivas para IMNV.
- Los análisis de RT-PCR por Kit IQ2000™ y MET no detectaron la presencia del virus IMNV en los camarones enfermos.
- Bacterias del género *Vibrio* junto al estrés por baja temperatura (T = 17 °C) inducirían la expresión de necrosis muscular en *P. vannamei* bajo condiciones experimentales.
- Las fuentes de estrés o el inóculo bacteriano no son suficientes por sí solos para inducir los signos clínicos característicos de la necrosis muscular en *P. vannamei*.

## RECOMENDACIONES

- Implantar un protocolo alternativo de RT-PCR, tal como el sugerido por Senapin *et al.* (2007), para disponer de una herramienta molecular de diagnóstico que permita confirmar los resultados obtenidos por el Kit IQ2000™. En particular, la confirmación correspondería a los resultados negativos.
- Realizar una confirmación posterior de los amplicones obtenidos por RT-PCR, mediante su secuenciación.

- En el caso de MET, será necesario analizar exclusivamente el Órgano Linfoide (OL) de otro grupo de muestras, más amplio que el analizado en este estudio.
- Realizar la confirmación del diagnóstico por ISH de las muestras positivas para IMNV, en un laboratorio externo que cuente con la aprobación de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, T. P. D., Srisuvan, T., Tang, K. F. & Lightner, D. V. 2007. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of *infectious myonecrosis virus* (IMNV). *Aquaculture* **264**: 9-15.
- Arcier, J. M., Herman, F., Lightner, D. V., Redman, R. M., Mari, J. & Bonami, J. R. 1999. A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal Diseases of Aquatic Organisms* **38**: 177-181.
- Bell, T. A. & Lightner, D. V. 1998. *A Handbook of Normal Shrimp Histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.

- Bonami, J. R., Shi, Z., Qian, D. & Widada, J. S. 2008. White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* : separation of the associated virions and characterization of *MnNV* as a new type of nodavirus. *Journal of Fish Diseases* **31**: 23-31.
- Bonami, J. R., Hasson, K. W., Mari, J., Poulos, B. T. & Lightner, D. V. 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *Journal of General Virology* **78**: 313-319.
- Bonami, J. R., Mari, J., Poulos, B. T. & Lightner, D. V. 1995. Characterization of hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. *Journal of General Virology* **76**: 813-817.
- Boyd, C. E. & Tucker, C. S. 1998. *Pond Aquaculture Water Quality Management*. Kluwer Academic Publishers. Pp: 700.
- Calderón, J., Bayot, B., Betancourt, I. & Alday de Graindorge, V. 1999. Monitoreo del Virus de la Mancha Blanca en Ecuador. *El Mundo Acuícola* **5**: 211-214.
- CNA (Cámara Nacional de Acuicultura). 2009. Acuicultura del Ecuador. *Revista de la Cámara Nacional de Acuicultura* **77**: 52-53.
- CNA (Cámara Nacional de Acuicultura). 2001. Acuicultura del Ecuador. *Revista de la Cámara Nacional de Acuicultura* **45**: 60-63.
- 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*. *Diseases of Aquatic Organisms* **36**: 163-168.
- Chang, P. S., Lo, C. F., Wang, Y. C. & Kou, G. H. 1996. Detection of white shrimp syndrome associated virus (WSSV) in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobster 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).
- Chou, H. Y., Huan, C. Y., Lo, C. F. & Kou, G. H. 1998. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. *Aquaculture* **164**: 263-276.

- Chou, H. Y., Huan, C. Y., Wang, C. H., Chiang, H. C. & Lo, C. F. 1995. Pathogenicity of baculovirus infection causing White Spot Syndrome in cultured penaeid shrimps in Taiwan. *Journal Diseases of Aquatic Organisms* **23**: 165-173.
- de la Rosa-Vélez, J., Cedaño-Thomas, Y., Cid-Becerra, J., Méndez-Payán, J. C., Vega-Pérez, C., Zambrano-García, J. & Bonami, J. R. 2006. Presumptive detection of yellow head virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and dot-blot hybridization in *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* cultured on the Northwest coast of Mexico. *Journal Fish Diseases* **29**: 717-726.
- Durand, S. V. & Lightner, D. V. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal Fish Diseases* **25**: 381-389.
- Durand, S. V., Lightner, D. V., Nunan, L. M., Redman, R. M., Mari, J. & Bonami, J. R. 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* **27**: 59-66.
- Evans, L. H., Fotedar, S., Fan, A. & Jones, B. 1999. Investigation of idiopathic muscle necrosis and circulating haemocytes in the freshwater crayfish *Cherax tenuimanus* to acute and chronic stressors. *Freshwater Crayfish* **38**: 177-181.
- FAO (Food & Agriculture Organization of the United Nations). 2006. <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2006/1000391/index.html>.
- FAO (Food & Agriculture Organization of the United Nations). 2002. <http://www.fao.org/REGIONAL/LAmerica/prior/rechnat/recursos/pesca/virus.htm#top>.
- Flegel, T. W. 2006. Detection of major penaeid shrimp virus in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* **258**: 1-33.
- Flegel, T. W., Boonyartatpalin, S. & Withyachumnankul, B. 1998. Current status research on yellow head virus and white spot virus in Thailand. 285-295 en: Flegel, T. W. & MacRae, I. H. *Diseases in Asia Aquaculture, Asian Fisheries Society, China*.

- Flegel, T. W. 1997. Special topic review: major viral disease of the black tiger prawn *Penaeus monodon* in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**: 433-442.
- Hasson, K. W., Lightner, D. V., Poulos, B. T., Redman, R. M., White, B. L., Brock, J. A. & Bonami, J. R. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei* demonstration of a viral etiology. *Journal Diseases of Aquatic Organisms* **23**: 115-126.
- Hernández-Herrera, R. I., Chappe-Bonnichon, V., Roch, P., Widada, J. S. & Bonami, J. R. 2007. Partial susceptibility of the SSN-1 fish cell line to a crustacean virus: a defective replication study. *Journal of Fish Diseases* **30**: 673-679.
- Holthius, L. B. 1980. Shrimps and prawns of the world: an annotated catalogue of species of interest to fisheries. In *FAO Species Catalogue: FAO Fisheries Synopsis* 12(1). Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Huang, C. H., Zhang, L. R., Zhang, J. H., Xiao, L. C., Wu, Q. J., Chen, D. H. & Li, J. K. 2001. Purification and characterization of White Spot Syndrome Virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkii*. *Journal of Virus Research* **76**: 115-125.
- Jiménez, R., Barniol, R., de Barniol, L. & Machuca, M. 1999. Infection of IHNV virus in two species of cultured penaeoid shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) in Ecuador during El Niño 1997-98. *Aquaculture Research* **30**: 695-705.
- Jiménez, R. 1992. Síndrome de Taura. *Acuicultura del Ecuador* . p: 1-16.
- Kautsky, N., Ronnback, P., Tedengren, M. & Troell, M. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* **191**: 145-161.
- Kimura, T., Amano, K., Nakano, H., Momoyama, K., Hiraoka, M. & Inouye, K. 1996. Detection of penaei rod-shaped DNA virus (PRDV) y PCR. *Journal Fish Pathology* **31**: 93-98.

- Koch, R. 1891. Ueber bakteriologische Forschung. Verhandlungen des X International en Medichinischen Congresses, Berlin, 1890, 1, 35, august Hirschwald, Berlin.
- Kunanopparat, A., Chaivisuthangkura, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Sridulyakul, P., Senapin, S. & Sithigorngul, P. 2009. Production of monoclonal antibodies against infectious myonecrosis virus capsid protein. *35th Congress on Science and Technology of Tailand* p: 1-4.
- LeBlanc, B. D. & Overstreet, R. M. 1990 Prevalence of *Baculovirus penaei* in experimentally infected white shrimp (*Penaeus vannamei*) relative to age. *Aquaculture* **87**: 237-242.
- Lightner, D. V., Pantoja, C. R., Redman, R. M., Noble, B. L., Schofield, P. J. & Tang, K. F. 2008. White Tail Disease in Shrimp Mimics Infectious Myonecrosis. *Global Aquaculture Advocate* p 44-46.
- Lightner, D. V. & Chen. P. 2000. Enfermedad de la Cabeza Amarilla. <http://www.oie.int> 1-3p.
- Lightner, D. V. & Chen. P. 2000. Enfermedad de las Manchas Blancas. <http://www.oie.int> 1-3p.
- Lightner, D. V. & Chen. P. 2000. Síndrome de Taura. <http://www.oie.int> 1-3p
- Lightner, D. V. 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies. *Aquaculture* **9**: 27-52.
- Lightner, D. V. & Redman, R. M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* **164**: 201-220.
- Lightner, D. V. 1996. *A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp*. Baton Rouge, LA.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Hasson, K. W. & Pantoja, C. R. 1995 Taura Syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) : gross signs, Histopathology and ultrastructure. *Journal of Aquatic Organisms* **21**: 53-59.
- Lightner, D. V. 1993. Diseases of cultured Penaeid shrimp. Pp. 393-486. In: James P. McVey, ed. *CRC Handbook of Mariculture*, 2nd Edition, Volume I, Crustacean Aquaculture, Boca Raton, Florida, CRC press.
- Lightner, D. V., Bell, T. A., Redman, R. M., Mohney, L., Natividad, J. M., Rukyani, A. & Poernomo, A. 1992. A review of some major diseases of

- economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indopacific. In: Diseases in Aian aquaculture, pp. 57 c 80. Edited by Shariff, I. M., Subasinghe, R. P.& Arthur, J.R. Manila, Philippines: Fish Health Section, Asian Fisheries Society.
- Lightner, D. V. & Redman, R. M. 1992. Penaeid virus diseases of the shrimp culture industry of the Americas. In *Marine Shrimp Culture: Principles and Practicles*, pp. 569-588. Edited by A. W. Fast & L. J. Lester. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Lightner, D. V. 1988. Muscle necrosis of penaeid shrimp. In : Sindermann C.J., & Lightner, D. V. Disease diagnosis and control in north America marine aquaculture. Developments in aquaculture and fisheries science. Vol 17, *Elsevier Press, New York*, p 122-124.
- Lo, C. F., Ho, C. H., Chen, C. H. & Liu, K. F. 1997. Detection and tissue tropism of white of spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodom* with a special emphasis on reproductive organs. *Journal Diseases of Aquatic Organisms* **30**: 53-72.
- Lo, C. F., Leu, J. H., Chen, C. H., Peng, S. E., Chen, Y. T., Chou, C. M., Yeh, P. Y., Huang, C. J., Chou, H. Y., Wang, C. H. & Kou, G. H. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* **25**: 133-141.
- Lotz, M. J. & Soto, A. M. 2002. Model of White Spot Syndrome Virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* **50**: 199-209.
- Melena, J. 2007. Evidencias sobre la necrosis muscular en *Penaeus vannamei* cultivado en Ecuador. *Boletín CENAIM informa* No. 142.
- Meyer, F. P. 1991. Aquaculture disease and health management. *Journal of Animal Science* **69**: 4201-4208.
- Mohan, C. V., Shankar, K. M., Kulkarni, S. & Sudha, P. M. 1998. Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Diseases of Aquatic Organisms* **34**: 9-12.

- Mohan, C. V., Sudha, P. M., Shankar, K. M. & Hegde, A. 1997. Vertical transmission of white spot baculovirus in shrimps – A possibility? *Current science* **73 (2)**: 109-110.
- Morales-Covarrubias, M. S. 2004. *Enfermedades del Camarón: Detección mediante análisis en fresco e histopatología*. Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV). p: 43-44.
- Morales-Covarrubias, M. S. 2004. *Enfermedades del Camarón: Detección mediante análisis en fresco e histopatología*. Virus del Síndrome de Taura (TSV) p: 51-54.
- Nakano, H., Koube, H., Umezaca, S., Momoyama, K., Hiraoka, M., Intuye, K. & Oseko, N. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in 1993: epizootiological survey and infection trial. *Fish Pathology* **29**: 135-139.
- Nash, G., Chinabut, S. & Limsuwan, C. 1987. Idiopathic muscle necrosis in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, cultured in Thailand. *Journal of Fish Diseases* **10**: 109-120.
- Nunan, L. M. & Lightner, D. V. 1997. Development of a non-radioactive gene by PCR detection of white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Virological Methods* **63**: 193-201.
- OIE (Aquatic Animal Disease Cards). 2007. Infectious myonecrosis.
- OIE (Aquatic Animal Disease Cards). 2007. White tail disease.
- OIE (Aquatic Animal Disease Cards). 2006. Informe de la Reunión de la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos: Enfermedad de la Cola Blanca Causada por infección por MNV (un nodavirus) & XSV (un virus ssRNA muy pequeño). p: 239-240.
- OIE (Aquatic Animal Disease Cards). 2006. Informe de la Reunión de la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos: Mionecrosis Infecciosa. p: 233-234.
- Panchana, 2009. *Atlas de Histopatología de P. vannamei*. Volumen I (Virus). Virus de la Mionecrosis Infecciosa. p: 67.

- Poulos, B. T., Tang, K. F. J., Pantoja, R. C., Bonami, J. R. & Lightner, D. V. 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology* **87**: 987-996.
- Poulos, B. T., Pantoja, R. C., Bradley-Dunlop, D., Aguilar, J. & Lightner, D. V. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* **47**: 13-23.
- Qian, D., Shi, Z., Zhang, S., & Cao, Z. 2003. Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Fish Diseases* **26**: 521-527.
- Ramasamy, P., Jayakumar, R. & Brennan, G. P. 2001. Muscle degeneration associated with cotton shrimp disease of *Penaeus indicus*. *Journal of Fish Diseases* **23**: 77-81.
- Ramasamy, A. & Pandian, A. P. 1985. Diseases, parasites, commensals and Fouling of commercial penaeid prawns of the Porto Novo Coast of South India , In; Taki, V., Primavera, J. H., Llobrera, J. A. Proceedings of the first international conference on the culture of penaeid prawns/shrimps southeast Asian fisheries development center, Iloilo City, Philippines.
- Ridgway, I. D., Stentiford, G. D., Taylor, A. C., Atkinson, R. J., Birkbeck, T. H. & Neil, D. M. 2007. Idiopathic muscle necrosis in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.): aetiology, pathology and progression to Bacteraemia. *Journal of Fish Diseases* **30**: 279-292.
- Rigdon, R. H. & Baxter, K. N. 1970. Spontaneous Necroses in muscles of Brown Shrimp, *Penaeus aztecus* Ives. *Transactions of the american fisheries society* **99**: 583-587.
- Rivers, T. M. 1937. Viruses and Koch's postulate. *Journal Bacteriology* **33**: 1-12.
- Rodríguez, J., Bayot, B., Amano, Y., Panchana, F., de Blas, I., Alday, V. & Calderón, J. 2003. White spot syndrome virus infection in cultured

- Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and Ultrastructure. *Journal of Fish Diseases* **26**: 439-450.
- Romestand, B. & Bonami, J. R. 2003. A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-Elisa) for detection of *MrNV* in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Journal of Fish Diseases* **26**: 71-75.
- Rosenberry, B. 1993. Taura Syndrome hits farms in Ecuador. *Shrimp News Int.* **18**: 6.
- Sahul Hameed, A. S., Yoganandhan, K., Widada, J. S. & Bonami, J. R. 2004. Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus like-particles in *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms*. **62** : 191-196.
- Sahul Hameed, A. S., Yoganandhan, K., Widada, J. S. & Bonami, J. R. 2004. Etudies on the ocurrence and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* in India. *Aquaculture* **238** : 127-133.
- Senapin, S., Phewsaiya. K., Briggs, M. & Flegel, T. W. 2007. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture* **266**: 32-38.
- Stern, S. 1995. Swimming through troubled waters in shrimp farming: Ecuador country review. *Proceedings of the special session on shrimp farming*. Edited by Browdy, C. L. & Hopkins, J. S. 1995. The World Aquaculture Society. p. 35-37.
- Sudhakaran, R., Ishaq Ahmed, V. P., Haribabu, P., Mukherjee, S. C., Widada, J. S., Bonami, J. R. & Sahul Hameed, A. S. 2007. Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *Journal of Fish Diseases* **30**: 27-35.
- Sudhakaran, R., Yoganandhan, K., Ishaq Ahmed, V. P. & Sahul Hameed, A. S. 2006. *Artemia* as a possible vector for *Macrobrachium rosenbergii*

nodavirus (*MnNV*) and extra small virus transmission (XSV) to *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* **70**: 161-166.

- Supamattaya, K., Hoffmann, R. W., Boonyaratpalin, S. & Kanchanaphum, P. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Journal Diseases of Aquatic Organisms* **32**: 79-85.
- Suttle, C. A. 2005. Viruses in the Sea. *Nature* **437** : 356-361.
- Sonnenholzner, S., Rodríguez, J., Pérez, F., Betancourt, I., Echeverría, F. & Calderón, J. 2002. Supervivencia y respuesta inmune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. *El Mundo acuícola* **8(1)** : 50-56.
- Tang, K. F. J., Pantoja, C. R., Redman, R. M. & Lightner, D. V. 2007. Development of *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (*PnNV*) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Journal Diseases of Aquatic Organisms* **75**: 183-190.
- Tang, K. F. J., Pantoja, C. R., Poulos, B. T., Redman, R. M. & Lightner, D. V. 2005. *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. Stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Diseases of Aquatic Organisms* **63**: 261-265.
- Tang, K. F. J., Durand, S., White, B., Redman, R., Mohny, L. & Lightner, D. V. 2003. Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus – a preliminary study. *Aquaculture* **216**: 19-29.
- Tang, K. F. J. & Lightner, D. V. 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture* **189** : 11-21.

- Tang, K. F. J. Durand, S., White, B., Redman, R., Pantoja, R. & Lightner, D. V. 2000. Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture* **190** : 203-210.
- Thrusfield, M. 1995. Veterinary Epidemiology. Ed Blackwell Science Ltd. Second Edition 483.
- Vidal, O. M., Granja, C. B., Brock, J.A. & Salazar, M. 2001. A profound effects of hipertermia on the survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected whit White Spot Syndrome Virus. *Journal of the World Aquaculture Society* **4**: 364-372.
- Vieira, R. H. S. F., Menezes, F. G. R., Lima, A. S., Aragao, J. S., Sousa, O. V., Gesteira, T. C. V. & Hofer, E. 2006. Prevalence of *Vibrio spp.* In Infectious myonecrosis virus (IMNV) infected shrimp *Litopenaeus vannamei* cultivated in Brazilian Northeast. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases* **36**: 311-316.
- Vijayan, K. K., Stalin Raj. V., Alavandi, S. V., Thillai Sekhar, V., Santiago, T. C. 2005. Incidence of white muscle disease, a viral like disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* ( De Man) from the south-east coast of India. *Aquaculture Research* **36**: 311-316.
- Wang, Y. G., Hassan. M. D., Shariff, M., Zamri, S. M. & Chen, X. 1999. Histopathology and cytophatology 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.
- Wang, Q., White, B. L., Redman, R. M. & Lightner, D. V. 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.
- Widada, J. S., Richard, V., Shi, Z., Qian, D. & Bonami, J. R. 2004. Dot-blot hybridization and RT-PCR detection of extra small virus (XSV)

associated with white tail disease of prawn *Macrobrachium rosenbergii*.  
*Diseases of Aquatic Organisms* **58**: 83-87.

- Widada, J. S., Durand, S., Cambournac, I., Qian, D., Shi, Z., Dejonghe, E., Richard, V. & Bonami, J. R. 2003. Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* : dot-blot, in situ hybridization and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases* **26**: 583-590.
- Wigglesworth, J. 1994. "Taura syndrome" hits Ecuador farms. *Fish Farmer* **3**: 30-31.
- 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 vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* **21**: 69-77.
- Wu, J. L., Namikoshi, A., Nishizawa, T., Mushiake, K., Teruya, K. & Muroga, K. 2001. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Diseases of Aquatic Organisms* **47**: 129-135.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1

### **Protocolo para mantenimiento de camarones juveniles *P. vannamei* (población stock) para el estudio de la necrosis muscular en Ecuador**

Se sembró una población stock conformada por 400 camarones juveniles *P. vannamei* en tanques plásticos de 200 L, con un volumen operacional de 150 L por tanque. En total, la población de camarones fue distribuida en 8 tanques a razón de 50 camarones/tanque.

Se efectuó el sifoneo y recambio de agua (10%) diariamente, para remover el exceso de alimento, mudas y heces.

Se realizaron controles diarios de mortalidad en cada uno de los tanques y se alimentó con peletizado comercial *ad libitum*. Las raciones fueron intercaladas cada 8 horas.

Complementariamente, se efectuaron muestreos de crecimiento a partir de la segunda semana de cultivo. Estos muestreos fueron realizados semanalmente por 5 semanas consecutivas hasta llegar al tamaño adecuado (7.5 g) para cada una de las pruebas de desafío de este estudio.

Finalmente, el agua de desecho, mudas y restos de alimento fue tratada con una solución de cloro (100 ppm) diariamente.

## **ANEXO 2**

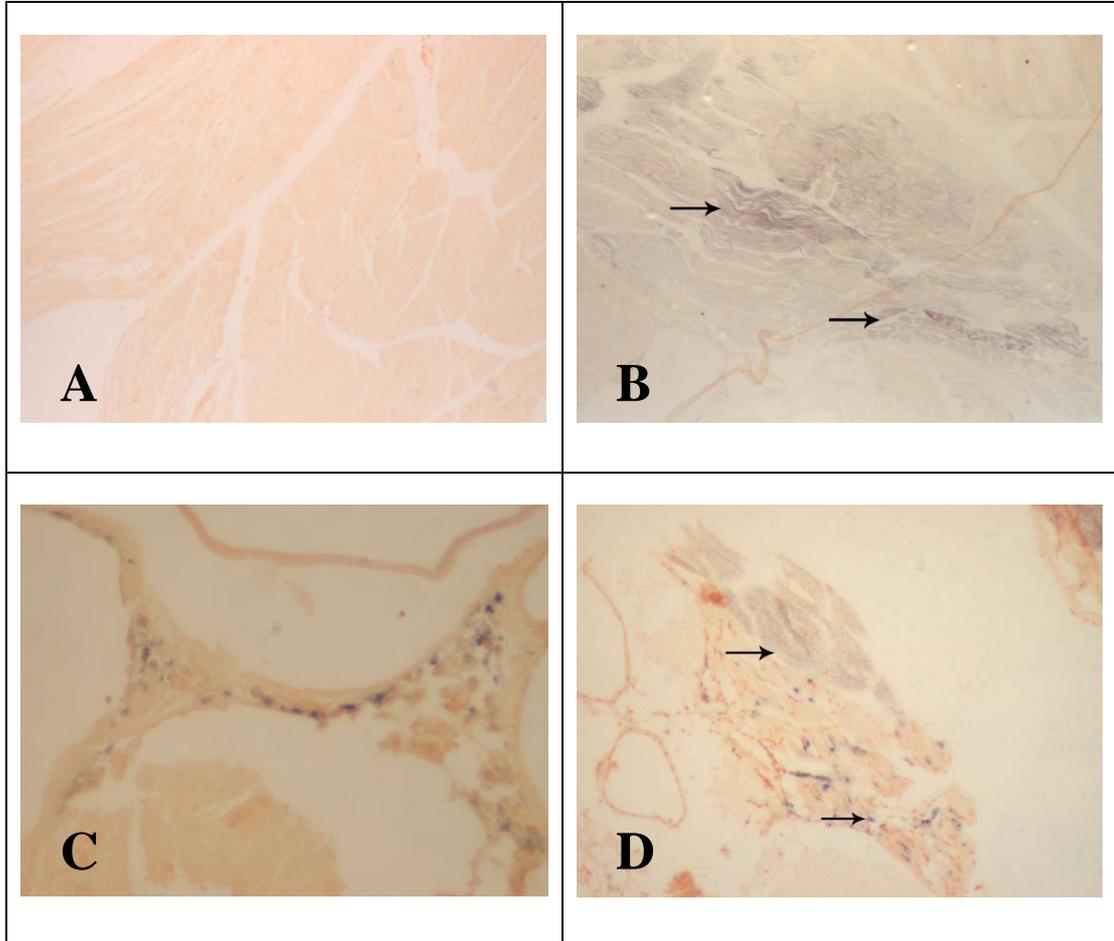
### **Protocolo para reducir la concentración de oxígeno disuelto**

Para la reducción de la concentración de oxígeno disuelto (protocolo según Boyd, 1998), se procedió a colocar 500 L de agua de mar en un tanque plástico con capacidad de 1 T previamente tomando la medición del valor de oxígeno presente (7.5 mg/L) en ese volumen operacional.

Se agregó sulfito de sodio: 8-10 mg/L por cada ppm (mg/L) de oxígeno disuelto presente en el volumen de agua utilizado durante 2 h, hasta llegar a un nivel de 1 mg/L y luego con ayuda de un recipiente se llenó cada una de las carameleras (2 L). Posteriormente, se colocaron los camarones tanto de los tratamientos y controles, para ser expuestos durante 3 h al día por 3 días consecutivos.

### ANEXO 3

#### Hibridación *in situ* en camarones juveniles *P. vannamei* desafiados localmente



Hibridación *in situ* (HIS) en secciones longitudinales de tejidos de camarones *P. vannamei*. **A.-** Control negativo para IMNV. Objetivo de 10X. **B.-** Tejido muscular de camarón desafiado localmente muestra señal positiva para IMNV. Objetivo de 10X. **C-D.-** Tejido conectivo del cefalotórax muestran señales positivas de IMNV en camarones desafiados localmente. Objetivo de 10X.