

INTRODUCCION

El cultivo de organismos acuáticos en el mundo adquiere día con día mayor importancia por la creciente demanda de fuentes alimenticias que requiere la población. De acuerdo a la estadística mundial, la camaronicultura se ha convertido en una actividad sobresaliente, según Rosenberry (1997) y Jory (1998), la producción mundial de camarón en 1997 alcanzó 3,010,000 Tm. De esta cifra, 660,200 Tm (22 %) fueron cultivadas en granjas, con un abatimiento del 5 % con respecto a la producción de 1996. La producción en el Hemisferio Occidental se incrementó un 15 % con 198,200 Tm. Esta cifra récord correspondió al 30 % de la producción mundial, mientras que en el Hemisferio Oriental decreció un 11 % por tercer año consecutivo debido a varios problemas sanitarios, particularmente los virus cabeza amarilla (yellow head virus=YHV) y el de la mancha blancas (white spot baculovirus o white spot syndrome virus=WSBV, WSSV).

Existen granjas camaronícolas en 50 países de todo el mundo, pero la mayor producción en los últimos veinte años se centra en 10-12 países del Sudeste de Asia y América Latina donde fue dominada por dos especies, el camarón tigre (*Penaeus monodon* Fabricius, 60 %) y el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 27 %). En menor escala se cultivó a *Fenneropenaeus chinensis* Osbeck (= *orientalis* Kishinouye) (8 %), *Marsupenaeus japonicus* Bate (< 1%), *L. stylirostris* Stimpson (3 %) y *Fe. merguensis* de Man.

En el presente año, el camarón azul (*L. stylirostris*) fue la especie que predominó en el 95 % de las granjas de América Latina, en respuesta a la mayor resistencia natural al virus del síndrome de Taura (Taura syndrome virus=TSV), el cual abatió la producción de camarón blanco en el Hemisferio en 40-95 % durante el periodo comprendido de 1992 a 1996 (Lightner y cols., 1997).

Tailandia continúa siendo el líder en la producción camaronícola por sexto año consecutivo, pues a pesar de los serios problemas de enfermedades causados por virus, su producción disminuyó de 220,000 Tm a 160,000 en 1996, y en 1997 bajó hasta 150,000 Tm. El segundo mayor productor en 1997 fue Ecuador, con un récord anual de 130,000 Tm con 180,000 Ha en producción, aún después de sufrir severas pérdidas. México posee el segundo lugar (16,000 Tm, 8.1 %) en Latinoamérica, explotándose 20,000 Ha ocupadas por 220 granjas camaronícolas y 23 productores de larva, con el séptimo lugar a escala mundial. Incluso, el país podría ser uno de los líderes en el mundo, y estar en la cima de los productores, por lo cual se le llama uno de los "gigantes dormidos", junto con Brasil. Las expectativas en México son optimistas, quedando aún por explotar el 90 % de los litorales viables. Más, aunque el cultivo de camarón ha crecido considerablemente, los problemas sanitarios continúan siendo uno de los riesgos mayores en la pérdida potencial en la producción, pues desde el inicio de esta actividad, han surgido serios problemas patológicos, constituyéndose estos en factores determinantes en la evolución de la camaronicultura. (Jory, 1998).

Las especies mayormente cultivadas en la República Mexicana son *L. vannamei* y *L. stylirostris* (está última especie es la que se cultiva casi exclusivamente en el país en el presente año), figurando Sinaloa, Sonora y Nayarit como los Estados más productivos en cuanto a volúmenes y valor de producción (Rosenberry, 1997; SEMARNAP, 1998).

Paralelo al mejoramiento en las técnicas de cultivo con los sistemas de producción intensivos e hiperintensivos, existen factores de alto riesgo por las altas densidades poblacionales que se manejan, porque a pesar de ello, ocurren pérdidas notables por enfermedades bacterianas y virales en los cultivos comerciales (Couch, 1981; Lightner, 1985 y Luedeman y Lightner, 1992).

Las etiologías de mayor trascendencia por el impacto económico a escala mundial son las infecciones de los virus YHV y WSSV, introducidos de Asia a América. En Tailandia, el YHV causó la pérdida de 5,000 Tm en 1992, mientras que WSSV ocasionó pérdidas de 70,000 Tm (40 % de la producción) en 1996 (Dixon y Dorado, 1997; Lightner y cols., 1997; Wang y cols., 1999).

Los estudios sobre virus de camarón inician con el reporte de Couch (1974) sobre *Baculovirus penaei* (BP), este fue el primero de los virus que fue conocido en el camarón *Farfantepenaeus duorarum* Burkenroad del Golfo de México. A partir de ese estudio, la lista de virus se ha incrementado a casi 20 (y se espera la aparición de otros más), los cuales han sido reconocidos como patógenos importantes en las regiones donde se cultiva camarón (Lightner y cols., 1997).

Periódicamente ocho de ellos se han presentado regularmente en América y de ellos, cuatro han sido identificados como agentes etiológicos serios en una o más especies de camarones: el virus de la necrosis hematopoyética e hipodérmica infecciosa (infectious hypodermal and haematopoietic virus= IHNV), TSV, Parvovirus hepatopancreático (hepatopancreatic parvovirus= HPV) y BP. De estos, a dos de ellos, IHNV y TSV, se les reconoce por el impacto económico y mortalidad severa que han causado en las granjas camaronícolas, estableciéndose además en hospederos silvestres. HPV ha sido diagnosticado en *L. vannamei* y *L. stylirostris* silvestre, capturado en Perú, Ecuador y México, pero no se ha asociado a epizootias. Una de las regiones más severamente afectadas por el síndrome de Taura fue Ecuador, quien reportó pérdidas anuales que excedieron los 100 millones de dólares a partir de 1992 hasta 1996 (Brock y cols., 1995). En Texas, las pérdidas por esta enfermedad no han sido estimadas, pero las mortalidades alcanzaron del 80 al 90 % en el camarón blanco del Pacífico, el cual, irónicamente fue una cepa desarrollada para prevenir la aparición de otra enfermedad viral de carácter epizootico, substituyendo a la especie *L. stylirostris* la cual fue severamente afectada por IHNV (Dixon y Dorado, 1997).

El TSV fue encontrado recientemente en el Valle del Río Grande, Texas en 1995 en tanques de larvas de *L. vannamei*, así como en laboratorios de postlarva de Harlingen, Texas, en el condado Cameron County y dos granjas más en Matagorda. TSV también se ha detectado en cuatro granjas de South Carolina en junio de 1996. Todos los camarones de las granjas afectadas fueron destruidos. La importación de sementales y postlarvas son el riesgo más alto en la introducción de WSSV y YHV, similar a la introducción accidental del IHNV que abatió la producción del camarón azul en el Hemisferio Occidental. YHV, enzootico de China, Sudeste de Asia e India, ha sido detectado en camarones de Cameron County, Texas en 1995 (Lightner y cols., 1997; Alday-Sanz y Flegel, 1997).

En reunión de evaluación sanitaria de la industria camaronícola realizada en Monterrey N.L., la Dirección General de Acuicultura (SEMARNAP, 1996), estimó mortalidades de hasta el 80% en las granjas de Nayarit, durante el primer periodo de 1995-1996. Para el mismo período, el Estado de Sonora con 2,500 Ha en operación, registró pérdidas del 40% al 60 % en la producción. Desde 1984, cuando surgieron las epizootias por IHNV no se conocía otro patógeno mayor en el país. La necrosis cuticular se observó como causa de muerte en el 50 % de la producción de camarón en granjas de Nayarit. El síndrome invadió a 40 de las 90 granjas existentes (500 de las mil Tm que se estimaba cosechar). Al síndrome se le denominó "NEC" (necrosis del epitelio cuticular) y la causa o agente etiológico, permaneció sin identificarse (PINIAR, 1996).

A principios de marzo de 1999, se extiende la distribución geográfica del WSSV hacia Honduras y Nicaragua, donde causó serias epizootias en *L. vannamei* y *L. stylirostris*, este corresponde al tercer registro de WSSV en

América: Texas, South Carolina y Centro América (Lightner y cols., 1997; Alday-Sanz y Flegel, 1997).

La característica clínica macroscópica causada en común por los virus WSSV y TSV es la expansión de los cromatóforos, por lo cual, los ejemplares infectados se observan de color rojo o rosa en el primer y segundo mes de siembra y durante el proceso de muda (Sudha y cols., 1998).

1) IMPORTANCIA

1. La Oficina Internacional de Epizootias, clasificó a las enfermedades causadas por **virus del síndrome de Taura** y **virus de la mancha blanca** (además del **virus de la cabeza amarilla**), como certificables; las cuales a la fecha no han sido reportadas en el país, hasta la presentación del presente manuscrito (OIE, 1999).

2. La camaronicultura es una actividad importante por la derrama económica hacia los núcleos poblacionales en la zona costera del Pacífico y las divisas que genera. Ocupa 20 mil Ha en producción, representando éstas, solo al 10 % de los litorales susceptibles a explotar. Por este motivo, requiere el apoyo de estudios sobre agentes patógenos, que en un momento dado, pueden poner en riesgo la producción.

3. Las expectativas para la industria camaronícola son alentadoras, pero requiere del apoyo de la sanidad acuícola para generar nuevos conocimientos realizados mediante estudios sobre patógenos virales. Esto debido principalmente por su rápida diseminación, colaborando a establecer oportunamente medidas de control o prevención, y así, evitar epizootias y elevadas pérdidas económicas.

2) OBJETIVOS

1) Implementar métodos con bases moleculares, para la detección para las principales infecciones virales de importancia económica.

2) Establecer un diagnóstico sanitario con respecto a infecciones virales en la camaronicultura de México.

3) Caracterizar las diferencias en las cepas virales involucradas en las enfermedades de penaeidos y establecer nuevos registros.

ANTECEDENTES

I. CLASIFICACION DE VIRUS.

Los estudios sobre virus patógenos de penaeidos¹ han sido dirigidos a determinar la distribución geográfica, dispersión y cambios histopatológicos o citológicos. En cambio, los estudios sobre biología molecular son relativamente escasos, encaminándose particularmente a identificar las proteínas que constituyen la cápside o el tipo de ácido nucleico que poseen y sitios de restricción del genoma viral.

Los agentes etiológicos virales, reconocidos en el mundo son las siguientes (la abreviación del nombre común aparece en paréntesis):

Tabla 1. Familias de DNA virus que infectan camarón.

Nombre común en extenso	Siglas	Descriptor	Nombre científico sugerido
Baculoviridae			
<i>Baculovirus penaei</i>	BP	Couch, 1974	<i>P. vannamei</i> single nuclear polyhedrosis virus= Pv SNPV
Baculovirus de <i>P. monodon</i>	MBV	Lightner y Redman, 1981	<i>P. monodon</i> single nuclear polyhedrosis virus= Pm SNPV
Necrosis baculoviral de la glándula del intestino medio (baculoviral midgut gland necrosis)	BMN	Sano y cols., 1981.	- - -
Baculovirus tipo C de <i>P. monodon</i> (type C baculovirus of <i>P. monodon</i>).	TCBV	Brock y Lightner 1990.	- - - -
Baculovirus no ocluido hemocito infectante (?) (hemocyte-infecting nonoccluded baculovirus)	PHRV	Owens, 1993	- - - -
Baculovirus de <i>P. plebejus</i> (Hess) (<i>P. plebejus</i> baculovirus)	PBV	Lester y cols., 1987	- - -
Baculovirus del síndrome de la mancha blanca	WSBV	Wongteerasupaya y cols., 1995	<i>P. monodon</i> non-occluded baculovirus type II= Pm NOBII).
Baculovirus ectodérmico y mesodérmico sistémico (systemic ectodermal and mesodermal baculovirus)	SEMBV	Wongteerasupaya y cols., 1995	- - - -

¹ Los géneros de los penaeidos han sido actualizados con base a las recomendaciones de Pérez-Farfante y Kensley (1977).

Virus en forma de varilla de <i>P. japonicus</i> Bate.(rod-shaped virus of <i>P. japonicus</i>)	RV-PJ	Takahashi y cols, 1994	----
Baculovirus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética (hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus).	HHNBV	Huang y cols., 1995	----
Iridoviridae			
Iridovirus de camarón(shrimp iridovirus)	IRDO	Lightner y Redman, 1993	----
Parvoviridae			
Parvovirus linfoidal (lymphoidal parvo-like virus)	LPV	Owens y cols., 1991	----
Virus de la necrosis hematopoyética e hipodérmica infecciosa	IHHNV)	Lightner, y cols., 1983a	----
Parvovirus hepatopancreático(hepatopancreatic parvovirus)	HPV	Lightner y Redman, 1985.	----

Tabla 2. Familias de RNA virus que infectan camarón.

Nombre común completo	Siglas	Descriptor	Nombre científico sugerido
Reoviridae			
Reovirus tipo III (type III reo-like virus).	REOIII	Tsing y Bonami, 1987.	----
Reovirus tipo IV(type IV reo-like virus).	REO IV	Adams y Bonami, 1991	----
Picornaviridae			
Virus del síndrome de Taura	TSV	Lightner y cols., 1995; Brock y cols., 1995; Hasson y cols., 1995	----
Rhabdoviridae			
Paramyxoviridae			
Rhabdovirus de penaeidos(rhabdovirus of penaeid shrimp)	RPS	Nadala y cols., 1992	----
Virus cabeza amarilla	YHV.	Boonyaratpalin y cols., 1993; Flegel y cols., 1995.	----
Togaviridae			
Virus de la vacuolización del órgano linfoide(lymphoidal organ vacuolization virus).	LOV	Bonami y cols., 1992.	----

En México existe relativamente escasa información referente a infecciones virales en el cultivo de camarón. Existen reportes de infecciones ocasionadas por el TSV, IHNV y WSSV (Lightner y cols., 1992b). Sin embargo, tal información está basada en sintomatología o semiología diversa, porque hasta la fecha, no ha existido un estudio con un protocolo metodológico que indique la ocurrencia de infecciones virales en las diferentes áreas camaronícolas del país.

A continuación se describe la epizootiología de los principales agentes virales que han impactado negativamente los cultivos de camarón a nivel mundial.

II. EPIZOOTIOLOGIA Y CARACTERIZACION DE LAS ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL Y SIMILARES EN LA CAMARONICULTURA MUNDIAL.

1) SINDROME DE TAURA

A.- Etiología controversial: Las primeras aportaciones concisas sobre el síndrome de Taura (TS) fueron aportadas por Jiménez (1992), quien la señaló como una nueva patología del camarón blanco, *L. vannamei* cultivado en granjas cercanas a la boca del Río Taura, Golfo de Guayaquil, Ecuador en Junio de 1992. Desde entonces, el TS se diseminó a otras granjas del Golfo de Guayaquil. En reunión emergente de expertos patólogos y camaronicultores -Taller sobre el Síndrome de Taura- (Lightner, Jones y Ware, 1994), se revisó el impacto negativo a la camaronicultura del Ecuador y la posible causa, pues el agente etiológico aún era desconocido. El síndrome inició con mortalidades de camarón cultivado en granjas cercanas al Río Taura durante Junio y Julio de 1992. En Noviembre del mismo año se determinó la ineffectividad del alimento medicado como control terapéutico para el TS y se planteó que una etiología tóxica podría ser la causa del TS. Durante Marzo y Abril de 1993 el TS se extendió hacia las localidades del Golfo de Guayaquil donde los camarones SPF (Specific pathogen free) fueron los más afectados en comparación con los silvestres. En Junio del mismo año la

distribución del TS abarcó hasta Tumbes, Perú. En Agosto la enfermedad se extendió a través de todas las granjas del Golfo de Guayaquil (Bahía de Caraquez, Provincia de Manibe), Tumaco, Colombia; Choluteca, Honduras y Oahu, Hawaii con efectos devastadores(Wigglesworth, 1994).

Se uniformizaron los signos macroscópicos del TS, estableciéndose de la siguiente manera: La fase aguda del TS tuvo un periodo incubación del 15-40 día de post siembra en las postlarvas (PL's) en estadios D tardíos, de la muda apreciándose un color rojizo por la expansión de los cromatoforos, acompañado de letargia y anorexia. Esta fase es seguida de la crónica, en la cual los ejemplares presentaron lesiones cuticulares melanizadas y múltiples y pueden estar activos con alimentación normal. Sin embargo, los episodios agudos pueden reaparecer en la siguiente muda. Los tejidos se observaron al microscopio con patologías de necrosis multifocal en el epitelio cuticular y subcutícula distribuidas en todo el cuerpo, agallas, apéndices, intestino anterior e intestino posterior. Las lesiones más características en la fase aguda fueron inflamación ausente o escasa, células necróticas con núcleos hipertrofiados o picnóticos, numerosos cuerpos de inclusión citoplásmicos esféricos, que van de eosinofílicos a basofílicos oscuros. En la fase crónica las lesiones mostraron infiltración hemocítica y melanización acompañada de colonización bacteriana de la cutícula, enfermedad de la "concha" y lesiones como las descritas en la fase aguda. A nivel ultraestructural los tejidos subcuticulares presentaron múltiples cuerpos de inclusión citoplásmicos, conteniendo agujas de cristales en una matriz amorfa, pero con ausencia de patógenos reconocibles (virus, bacterias o protozoarios). Los cristales en forma de aguja también se presentaron a nivel extracelular (Lightner y cols, 1994). Se concluye que la etiología del TS podría ser causada por:

- a.- Sustancias tóxicas debido a los resultados negativos en los estudios de infectividad, sin apreciarse patógenos al microscopio de luz (ML) o electrónico de transmisión (MET), porque las epizootias del TS iniciaron

regularmente en áreas que reciben drenes de la agricultura y son más comunes en época de lluvias. También, la filtración con carbón activado del agua de los estuarios redujo la prevalencia, además de que el TS puede ser inducido en bioensayos con mezclas de fungicidas.

b.- La segunda etiología probable fue la infecciosa, destacándose dos razones principales, una de ellas fue la dispersión a través de todo el Golfo y distante de los plantíos de la agricultura, la segunda observación derivó de la extrema susceptibilidad de los lotes SPF que fueron más seriamente afectados en comparación con las PL's silvestres. La inclinación principal del grupo se dirigió hacia la etiología tóxica, señalándose dos hipótesis principales, la primera sobre el uso de fungicidas en la agricultura (afinidad por las partículas sedimentadas) y la segunda, el uso de fungicidas que bloquean la hormona de la muda (el TS es frecuentemente más común en las mudas de PL/juveniles), el síndrome fue directamente proporcional a la frecuencia de la muda, pues la severidad disminuyó en organismos más viejos, la presencia de TS aguda en el estadio D tardío de la muda y los cristales en forma de aguja correspondieron al fosfato de calcio.

Hasta esta fecha, el TS ha destacado como la enfermedad más significativa económicamente para las granjas donde se cultivó a *L. vannamei* en el Hemisferio Occidental, pues las pérdidas estimadas excedieron los 100 millones de dólares únicamente en Ecuador (Rosenberry, 1993), disminuyendo el pico de producción en aproximadamente 100 millones de Tm en 1991 a 70 millones en 1993. Las pérdidas de 30 millones de Tm, traducidas a un 30 % en la reducción en la producción de camarón con el precio en 1993, permitió calcular en más de 120 millones de dólares las pérdidas anuales causadas por esta etiología de causa no determinada (Rosenberry, 1993, 1994a, b).

Boyd (1994) estudió los probables pesticidas sospechosos que causan mortalidad en masa en camarones de las granjas del Golfo de Guayaquil. Señaló que es difícil garantizar una conclusión definitiva debido a que existe insuficiencia de información sobre el fenómeno, porque la baja sobrevivencia y síntomas característicos del TS empiezan al mismo tiempo en que las bananas son rociados con pesticidas para controlar la sigatoka negra, asociando a dos de ellos como la causa principal: Calixin® (tridemprph, BASF) y Tilt® (propiconazole, Ciba-Geigy)- (propuesto asimismo por Lightner y cols., 1994 y Wigglesworth, 1994), de los cuales se conoce el efecto tóxico sobre los camarones, y que la combinación de ambos a bajas concentraciones producen síntomas (en camarones de prueba) similares a los observados en los camarones de las granjas afectados por el TS. Indicó que como no ha sido posible demostrar que el TS sea originado por una agente microbial, viral, metales pesados, disminución en el oxígeno disuelto o metabolitos tóxicos (nitrito, amonia y sulfuro de hidrógeno), parece razonable considerar la contaminación por pesticidas como la causa del problema. Por ello, recomendó realizar varios experimentos para aportar datos que confirmen esta sospecha, sugiriendo analizar agua filtrada y no filtrada, así como sedimento y camarones junto con pruebas de toxicidad de los pesticidas involucrados.

En Aqualab, una granja de Ecuador, se realizaron los ensayos de toxicidad con una mezcla de Tilt® (59.8 µg/l) y Calixin® (75 µg/l) adicionándolo al agua de los acuarios en concentraciones del 0 al 0.10 %. Al introducir juveniles de *L. vannamei* encontraron sobrevivencias del 50 % y 45 % en los ensayos de 0.05 % y 0.10 % de concentración en tres días de contacto. Realizaron repeticiones del experimento a diferentes concentraciones de salinidad, pesticidas y con alimento esterilizado y no esterilizado, concluyen que la causa se debía a los pesticidas. Otras hipótesis que fueron abordadas como la causa probable del TS fue una bacteria intracelular o rickettsia, el efecto de una degradación general del medio acuático de las granjas debido a la contaminación (Rosenberry, 1994) o bien, que exista más de un agente causal y que la causa varió con la región geográfica.

Brock y cols. (1995) presentaron los resultados concernientes a la posible causa del TS, sugiriendo un solo agente infeccioso y más específicamente a un probable virus, tentativamente llamado virus del síndrome de Taura. Reportan que el TS ocurrió en juveniles (0.1 a 5 g) de *L. vannamei* dentro de la segunda a cuarta semana en las salas de incubación ó de introducirse en los estanques. En los canales de corriente rápida (Hawaii), tardó de 9-23 días para que iniciaran las epizootias (19.7 ± 11.4 , n=6) en PL's 10-12. El curso de la enfermedad fue preagudo a agudo con picos de mortalidad de 5-7 días desde el inicio de la epizootia. La supervivencia de los cambios estimados debido al TS en los canales de corriente rápida en el cultivo intensivo (densidades elevadas de $\geq 1,000$ camarones/m²) con la cepa mexicana SPF de camarón blanco, mostró una disminución hasta del 30 % al tercer día, 10 % al cuarto y 1 % de supervivencia al séptimo día. En comparación, la mortalidad acumulativa de camarones en estanques alcanzó del 80 al 90%. Las PL's de laboratorio fueron más susceptibles en comparación con las PL's silvestres. *L. vannamei* SPF fue altamente susceptible al mostrar elevada mortalidad.

La definición de los signos macroscópicos, histopatología y ultraestructura fue descrita por Lightner y cols. (1995) para consolidar estudios futuros sobre la enfermedad. Emplearon en este estudio *L. vannamei* con signos macroscópicos característicos de TS en la fase peraguda y de recuperación o crónica, colectados de granjas situadas en Ecuador, Perú y Colombia. Transportaron a los ejemplares en envases con fijador AFA-Davidson para estudios por ML y glutaraldehido 6% en amortiguador de fosfatos para procesos de MET. El criterio que señalan para uniformizar las diferentes fases de TS fueron los siguientes: Los signos macroscópicos inician en la fase de postlarva de 14-40 días, por eso, los camarones con TS son típicamente pequeños juveniles de 0.1 g a menos de 5 g, pero los camarones más grandes también pueden contraer la enfermedad con menor frecuencia. Los ejemplares moribundos muestran expansión de los

cromatóforos rojos en los apéndices, pero especialmente en uropodos, telson, pleopodos y en la superficie del cuerpo. La inspección en los apéndices más delgados como bordes de uropodos y telson revelaron signos de necrosis epitelial focal, por lo cual en Guayas se le llama "colita roja". Los camarones que mostraron estos signos de TS preagudo estaban típicamente en el estadio D tardío del ciclo mudal y por eso presentaron una cutícula suave y el intestino vacío. El TS preagudo severo culmina con la muerte durante el proceso mudal. Las frecuencias más elevadas de muda en juveniles menores de 5 g comparados con los juveniles mayores sugieren que la muda es importante en la patogénesis del TS. Los sobrevivientes desarrollaron lesiones cuticulares melanizadas, similares a la enfermedad bacteriana del caparazón, con o sin la cutícula suave y expansión de los cromatóforos rojos con un comportamiento normal y buena alimentación. Se propuso que es la segunda fases de la enfermedad y que los camarones presentan signos de recuperación o una forma crónica de TS. La caracterización histopatológica en cortes de tejidos teñidos con H & E se estableció de la siguiente forma: Las lesiones se caracterizan por áreas multifocales de necrosis en el epitelio cuticular de la superficie general del cuerpo, todos los apéndices, branquias, intestino posterior, esófago y estómago. Rara vez el epitelio tubular de las glándulas antenales es afectado. Frecuentemente el tejido conectivo subcuticular y fibras musculares estriadas basales adyacentes al epitelio cuticular estuvieron involucradas. Fueron características las lesiones multifocales cuticulares y extremadamente abundantes los cuerpos de inclusión esféricos citoplásmicos (1 a 20 μm de diámetro). Estos últimos variaron en tinción observándose eosinofílicos a grisáceos o intensamente basofílicos. Los núcleos picnóticos o cariorécticos, no fueron teñidos por la reacción de Feulgen lo cual indica que no contienen cantidades significativas de DNA. Los cuerpos de inclusión le confieren a la lesión una apariencia de "pimentado" o "escopeteado" lo cual se considera patognómica en el TS. No se observó en las lesiones infiltración hemocítica u otros signos que señalen una respuesta inflamatoria del hospedero, lo cual distingue la fase peraguda de la fase crónica o de recuperación. La segunda etapa de la

enfermedad recuerda a la clásica enfermedad bacteriana del caparazón. Estas lesiones mostraron erosión de la cutícula, colonización superficial e invasión de las áreas afectadas por *Vibrio* spp. Frecuentemente se presentó un marcado infiltrado hemocítico, melanizado o no, basal a las lesiones. El estudio ultraestructural, de las lesiones focales en casos preagudos confirmó las observaciones realizadas por ML. Las inclusiones intracitoplásmicas esféricas fueron abundantes en los tejidos afectados (branquias y epitelio cuticular, subcutícula y músculo de apéndices) observándose de electrodensos a electrolúcidos. Se encontró que algunos contenían cristales en forma de aguja. Algunos especímenes examinados presentaron masas de estos cristales en el espacio hemocélico de las branquias, subcutícula y asociados a las fibras musculares adyacentes. En uno de los especímenes se detectaron los mismos cristales en el hemocele basal al epitelio y lumen de la grándula antenal. La morfología de estos cristales fue idéntica a la reportada para el fosfato de calcio en ciertos desórdenes metabólicos de vertebrados, por ello se presume que se trate de fosfato de calcio asociados a la patología de las lesiones causadas por TS. Consideran que en la etiología de está involucrado el metabolismo del calcio (calcificación y descalcificación de la cutícula durante la muda, según lo indicó la acumulación de cristales de fosfato de calcio en los tejidos y órganos afectados, lo cual apoya la hipótesis de la etiología tóxica. De esta manera, se crea una discordancia en la opinión de ambos expertos.

B.- Origen viral del síndrome de Taura: Los primeros indicios certeros de la etiología del TS fueron indicados Brock y cols. (1995); en una serie de experimentos donde transfirieron el agente Taura a camarones juveniles sanos, alimentados con camarones positivos macerados, colectados en un brote epidémico. Los ejemplares inoculados mostraron la coloración característica de los cromatóforos, entre el día 4 y 5 de exposición al alimento infectado. Los camarones moribundos se apreciaron débiles, desorientados y con los cromatóforos expandidos. La histopatología patognómica de las lesiones se observó en la epidermis cuticular de los grupos de camarones expuestos, a

diferencia del grupo control. El porcentaje de la supervivencia en los ensayos fue del 20 y 25 % en cada grupo experimental de 20 *L. vannamei*, de los cuales los signos patológicos al TS se diagnosticaron en el 75 % y 80 % de cada grupo. En los dos grupos control encontraron supervivencias del 90 y 95 % con ausencia de positividad al diagnóstico microscópico del TS. Indicaron que el proceso de esterilización inactiva al agente TS en una segunda serie de experimentos con alimento esterilizado y no esterilizado. La tercer serie de experimentos tuvo el objetivo de conocer la susceptibilidad de las cepas mexicanas SPF de camarón blanco y azul, observaron que la primera fue altamente susceptible, mientras que la segunda fue considerablemente más resistente, con supervivencias del 20 % en *L. vannamei* y del 87 % en *L. stylirostris*. La cuarta serie de experimentos fue realizada por inoculación de tejido infectado desde 10^{-4} a 10^0 , prefiltrado en membranas de 45 μm . Observaron mortalidades en el grupo inoculado con 10^0 en el primer periodo de 24 h de post inoculación (PI) con los mayores picos de mortalidad acumulativa a las 48 h en todos los grupos experimentales. De acuerdo a estos resultados, concluyeron que:

- a.- el agente causal estuvo presente en forma activa en los tejidos de camarón colectados de las epizootias de TS,
- b.- el agente conserva la actividad después de congelarlo y almacenarlo a 0 °C,
- c.- el agente TS es fácilmente transmitido y resulta en signos patológicos típicos por ingestión oral, inoculación o exposición a los tejidos infectados con TS;
- d.- el agente puede transmitirse a juveniles de *L. stylirostris* ocasionándole las lesiones histopatológicas patognómicas, más sin embargo es mucho menos patogénico a esta especie de camarón;
- e.- la dilución de 10^{-4} a 10^0 no disminuye significativamente la patogenicidad del TS;
- f.- el TS es inactivado por el calor y
- g.- el TS es más pequeño de 45 μm .

Basándose en estas conclusiones, indicaron que el agente TS es un agente biótico, descartando los argumentos anteriores donde se indicaba una causa tóxica. La principal evidencia que aportaron estos investigadores en apoyo a la hipótesis, fue la observación ultraestructural de los casos preagudos a agudos de las lesiones en epizootias ocurridas en Honduras y Oahu, Hawaii. Los cristales minerales no fueron observados, siendo los cuerpos de inclusión la característica más prominente junto con cambios nucleares y citoplásmicos no específicos que indican degeneración y necrosis celular. En lugar de los cristales observaron partículas presumiblemente de virus individuales o en arreglos irregulares de racimos localizados en el citoplasma de las células epidérmicas y subepidérmicas necrosadas y dentro de los restos celulares en espacios intercelulares. Las partículas tenían un "core" opaco de 20 nm de diámetro y una superficie electrolúcida. El diámetro aproximado de los probables viriones fue de 30 nm, semejando a los virus Nodamura, sin embargo, el arreglo paracristalino típico de los Nodamura no fue observado.

Hasson y cols. (1995) demostraron por ML, MET y bioensayos el origen viral del TS. En el estudio utilizaron 5000 *L. vannamei* de la cepa mexicana SPF, manteniéndolos en acuarios con agua de mar sintética y alimento Rangen No 4. En el bioensayo 1 emplearon un homogeneizado crudo de camarón blanco ecuatorianos con TS, para inocular a los SPF, los cuales se sacrificaron en la fase aguda, homogeneizando los tejidos y purificando los agentes virales en sacarosa y CsCl. El segundo bioensayo se realizó con un inculo del primerro en la misma cepa de camarones, realizando ensayos de densidad flotante, tamaño de partículas, histopatología y MET. El tercer y último bioensayo se realizó con inoculación de un tercer lote de camarones SPF con fracciones purificadas del primer y segundo bioensayo. Los resultados obtenidos por este grupo de investigadores indicaron picos de mortalidad entre las primeras 24 y 48 h PI con declinación rápida. La mortalidad acumulativa osciló del 73 al 87 % entre cada población tratada. En contraparte, no ocurrieron mortalidades en el grupo control,

inoculado con solución salina 2 % o el inóculo control preparado con tejidos de la cepa SPF. Los signos clínicos observados en el grupo inoculado fueron letargia, nado lento, intestino vacío, opacidad muscular, cutícula suave (sugiriendo que la muda había ocurrido, sin embargo, no se observaron mudas en el acuario) y postura lateral previos a la muerte entre otros. Al final de los bioensayos, del 25 al 100 % de los sobrevivientes al tratamiento desarrollaron lesiones cuticulares multifocales, melanizadas similares a los casos de epizootias de las granjas. El análisis histológico de los ejemplares moribundos del día 1-3 PI reveló lesiones en grado moderado a severo con tres o más tejidos como blanco, incluyendo epitelio cuticular general del cuerpo, apéndices, branquias, boca, esófago, estómago e intestino posterior. Las lesiones fueron caracterizadas por picnosis nuclear y necrosis de las células del epitelio cuticular y subcutícula. Presentes en las lesiones estaban múltiples esferas basofílicas claras a oscuras de diámetro variable, interpretadas como cuerpos de inclusión intracitoplásmicos y núcleos cariorécticos. Ninguno de los camarones analizados en la declinación del pico de la mortalidad o desarrollo de las lesiones melanizadas externas presentó lesiones TS activas, sin embargo, las lesiones de la fase crónica, tipificadas por melanización focal e infiltrado hemocítico, fueron notadas en algunos de los sobrevivientes del tratamiento. Las lesiones al órgano linfoide fueron de moderadas a severas, caracterizándose por esferoides vacuolados en escaso o alto número. Al MET, las suspensiones virales purificadas por gradientes de sacarosa contenían numerosas partículas virales hexagonales, indicativas de una simetría cúbica y morfología icosaédrica. Los purificados de los casos hawaianos y ecuatorianos median 31 nm (punta a punta) con una media de 27-28 nm (lado a lado) con la técnica de difracción en réplica. Utilizando como referencia al virus del mosaico del tabaco (VMT) mostraron valores algo más grandes, con una longitud de punta a punta de 32 nm y 28 nm de longitud (lado a lado). El índice de refracción calculado para el virus ecuatoriano fue de 1.337 g ml^{-1} como promedio para la densidad flotante. Estos resultados llenaron los requisitos del postulado de River, señalando a los viriones de forma icosaédrica, de 31-32 nm de diámetro como al agente infeccioso

causal del TS, descartando la etiología tóxica de la enfermedad, llamándolo virus del síndrome de Taura, tal como había sido propuesto por Brock (1994).

Con este patógeno sumaron 20 los virus que afectan a los camarones peneidos, descubiertos a raíz de sus efectos negativos en la acuicultura (Lightner, 1996). Dos de ellos con efecto sumamente desbastador en América, han sido el IHNV y el TSV.

Ambos se han propagado extensamente debido al movimiento de los reproductores infectados utilizados para la acuicultura. El TSV y otros virus recientemente descubiertos en camarón silvestre y cultivado tienen el potencial para infectar los lotes de camarones americanos y causar un daño significativo hasta de \$ 9 billones en la camaronicultura y la industria acuícola, según estimaciones del Commerce Department's National Oceanic and Atmospheric Administration (United States Department Of Commerce 1997). Los Estados Unidos de Norteamérica importaron aprox. 2.5 billones de este producto en 1996, capturándose en el mismo año 224 millones de libras valuadas en 463 millones. La pesca de camarón en el Golfo de México osciló en el 82 % del total capturado, casi 202 millones de libras, equivalente a 392 millones de dólares. De ahí, el riesgo que podría ser catastrófico al introducir enfermedades virales (Smullen, 1997).

C.- Distribución geográfica del TSV en América: En 1997 se actualizó la distribución del TSV en granjas camaronícolas del Continente Americano, la cual se extendió a las siguientes zonas: Ecuador (1992), Colombia, Ecuador, Perú (1993), Brasil, Colombia, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras y EUA (Oahu, Hawaii y Florida) (1994), Belice, Ecuador, El Salvador, Honduras y México (Sonora, Sinaloa, Guerrero y Chiapas) (1995) y Belice, Costa Rica, Guatemala, México (Sonora, Sinaloa y Tamaulipas), Panamá y EUA (Texas y South Carolina) (1996). El diagnóstico utilizado por Hasson y cols (1997) incluyó el examen histológico e hibridación *in situ* de 98 muestras de *L. vannamei* constituidas de 1 a 50

ejemplares. Con los resultados obtenidos por hibridación concluyen que se apoya la distribución geográfica determinada anteriormente solo por histología indicando que se trata del mismo virus o cepas virales relacionadas, responsables de las epizootias ocurridas en el Continente Americano durante los cinco años anteriores.

Lotz (1997) sugirió que la pandemia causada por el TSV pudo ser controlada aplicando tácticas compensatorias, como son ajustar la alcalinidad y el pH e introducir a la estanquería larvas de mayor tamaño y edad manteniéndolas hasta antes de su introducción en sistemas de bioseguridad. Estudió la posibilidad de aumentar la resistencia incrementando el tamaño de *L. vannamei* o bien, determinar si la resistencia disminuye al incrementar el tamaño. En el experimento utilizó poblaciones SPF originarios de Sinaloa, México y conservados en Hawaii. La cepa de virus que empleó fue recuperada de una epizootia ocurrida en Texas en 1995. Los camarones fueron infectados *per os* permitiendo que los camarones se alimenten de tejido infectado o bien, inoculados por vía intramuscular con un extracto acuoso libre de células inyectado en el músculo abdominal. En los cuatro experimentos realizados concluyó que la resistencia al virus no se incrementa al incrementar el tamaño. La variante que encontró en el experimento 4 fue que la virulencia del TSV en camarones no solo dependía del tamaño entre 0.1 a 5 g , sino en un rango superior de 2 g en juveniles a adultos de 30 g.

D.- Caracterización molecular del TSV en casos de Hawaii y Ecuador:

El TSV se considera un miembro más de los Picornaviridae o Nodaviridae, basándose estrictamente en las características morfológicas limitadas que se conocen. Bonami y cols. (1997) desarrollaron un protocolo de investigación para determinar las características físico químicas y morfológicas de dos aislados virales separados, purificados de *L. vannamei* originarios de Ecuador (Ec-TSV) y Hawaii (Hi-TSV), en brotes epizooticos ocurridos entre 1993 y 1994. Por MET determinaron la morfología icosaédrica del virus en rangos de 31 a 32 nm. La

densidad del virus determinada después de graficar los valores derivados del índice de refracción fue de $1.338 \pm 0.001 \text{ g ml}^{-1}$. La composición proteínica del virus analizada por electroforesis en geles estándar de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), fue de tres péptidos principales (24, 40 y 55 kD) en cantidades iguales de acuerdo a la misma intensidad de las bandas, además de un péptido menor (58 kD). La constitución genómica del TSV en los purificados de Ecuador y Hawaii fue RNA de acuerdo a los análisis espectrofotométricos y la relación $A_{260} : A_{280}$ mayor a 1.9. En los geles desnaturalizantes estimaron una longitud aproximada de 9 kb al compararse con marcadores ss RNA (ácido ribonucléico de una sola cadena), siendo este sensible a la digestión con MBN y RNasa A y resistente a la DNasa en los purificados Hi-TSV y Ec-TSV sin observar diferencias en los patrones de migración.

Mari y cols. en 1998, lograron la clonación del genoma viral en purificados de Ecuador y Hawaii, para la elaboración de sondas a partir del ssRNA viral, transcribiéndolo en una doble hebra para producir cDNA de extremos romos y construir librerías en el plásmido pUC 18 o pBluescript II KS. Seleccionaron doce plásmidos recombinantes y los analizan con enzimas de restricción para determinar el tamaño de los insertos y el mapa de restricción. Seleccionaron a dos de ellos, el pP15 y pQ1 para el desarrollo de sondas. Marcan con DIG (digoxigenina-11 deoxiuridinotri-fosfato) los insertos de 1500 y 1300 pb denominados pP15 y pQ1, las cuales hibridaron con los purificados del virus y camarones infectados naturalmente.

El inserto de la clona TSV P15 obtenido en el estudio anterior, fue secuenciado por Nunan y cols. (1998), seleccionando dos iniciadores de acuerdo al análisis vertido del programa Primer 2. Los iniciadores denominados 9195 y 9992 fueron utilizados para realizar una reverso transcripción del RNA viral en

camarones *L. vannamei* SPF infectados experimentalmente utilizando 1 μ l de hemolinfa como templado de RNA viral. En las reacciones de amplificación utilizan el "kit" Gene Amp EZ rTth RNA PCR (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT). Analizaron los resultados de la técnica desde el día 0 al 9 PI determinando la efectividad de la prueba, confirmada por "Southern blot" con sondas digoxigeniladas. En esta técnica obtuvieron productos amplificados de 231 pb en todos los casos estudiados.

E.- Situación del Síndrome de Taura en México: Los informes científicos sobre este problema en México no existen, solo algunas publicaciones informales en los diarios nacionales. Durante 1995-1997 se detectaron casos agudos y crónicos de un síndrome semejante en granjas camaronícolas de la República Mexicana, sin embargo, autoridades sanitarias (SEMRNAAP) negaron que se tratara del TSV, identificándola como NEC (necrosis del epitelio cuticular) y "síndrome similar al Taura". La enfermedad afectó al 50 % de la producción en Nayarit, invadiendo 40 de las 90 granjas que operaron en la entidad. A causa del NEC se afectaron 500 de las mil toneladas que se estimaban cosechar en el transcurso de las seis semanas que permaneció la situación (PINIAR, 1996). En Noviembre de 1995 también surgió un problema similar en San Blas, Pimientillo y Rosamorada, afectando a 200 toneladas del producto de camarón blanco. (PINIAR, 1996). Sinaloa y Sonora fueron otras dos entidades donde se abatió la producción del camarón blanco en porcentajes del 40 al 70 % de las granjas cultivadas. En Sinaloa, la enfermedad se presentó en camarones de 1 a 15 g durante el proceso de muda, la diferencia fue que esta última solo se había reportado en animales menores de 5 g. Mencionan que las causas de esta nueva enfermedad en el país pueden ser

- 1) cambios bruscos en la temperatura,
- 2) calidad de la semilla de laboratorio,
- 3) mala calidad de los alimentos,

- 4) calidad del agua y
- 5) presencia de agroquímicos en el agua.

El Colegio de Camaronicultores de Sinaloa A.C. (1995) informa que las 22 granjas representaron un total de 3,000 hectáreas y considerando que la producción promedio es de 700-800 Kg/Ha (\$ 30,000/tonelada) el valor estimado de pérdidas para el primer ciclo de 1995 sería de 45 a 65 millones de nuevos pesos (Abril a Julio de 1995).

2.- VIRUS DE LA NECROSIS HEMATOPOYÉTICA E HIPODÉRMICA INFECCIOSA (IHHNV):

A.- Descripción y distribución del IHHNV: Lightner y cols. (1983a) describieron una nueva enfermedad de tipo viral a la cual llamaron necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa en *L. stylirostris*, *L. vannamei* y *P. monodon* capturados en Ecuador, Panamá, Costa Rica, Honduras, Texas, Florida, México y Tahití. Hasta esa fecha solo se conocían tres enfermedades de origen viral, *BP*, *MBV* y *BMN*.

Lightner y cols. (1992a), documentaron la introducción y diseminación del IHHNV a cultivos de camarón en las industrias del Noroeste de México y áreas del Golfo de California. En los casos de rutina provenientes de Puerto Peñasco, diagnosticados por la Universidad de Arizona desde 1973 a 1980, señalaron la ausencia de IHHNV en 1603 ejemplares de *L. stylirostris*, *Fa. californiensis* Holmes y *L. vannamei*. También revisaron 22 *L. stylirostris* y 2 *L. vannamei* en 1980-1985 del Golfo de California y 1500 ejemplares SPF de camarón azul capturados en México y criados en Marine Culture Enterprise durante 1980-1986 en Hawaii.

Todos ellos resultaron negativos. Sin embargo, en 1987 detectaron el primer caso de IHNV en *L. vannamei* de esta región en una granja en la Paz, Baja California. En el periodo de 1989-1990 identifican al virus en granjas de camarón azul ubicadas en Guaymas, Sonora y Mazatlán, Sinaloa. Incluso hicieron hincapié en que durante 1973-1990, el cultivo de camarón azul superintensivo en canales de corriente en Puerto Peñasco, no padecía de esta infección hasta mediados de 1990. Los camarones importados fueron - de acuerdo al criterio del autor- la fuente del IHNV que causó la epizootia en 1989-1990. En esta ocasión, los camarones importados provenían de Estados Unidos de América y América Central, y a su vez, distribuidos a varias granjas de las costas del Golfo de California.

Lightner y cols. (1992b) señalaron que la introducción de camarón para cultivo desde áreas remotas hacia Hawaii, México, Brasil y Norte América, mostró que ciertos patógenos de camarón principalmente el IHNV, MBV y HPV pueden ser fácilmente transportados con el envío de camarones vivos. Señalan que estas introducciones han causado enfermedades catastróficas. Por ejemplo, el MBV fue reconocido y descrito primero en *P. monodon* importado de Taiwán a Puerto Peñasco en 1976. Después, el MBV fue encontrado en *P. monodon* importado por Hawaii desde Taiwán, Tahití y Filipinas. De igual manera, el IHNV se descubrió en *L. vannamei* y *L. stylirostris* importado a Hawaii en 1980-1982 de granjas ubicadas en Florida, Panamá, Costa Rica, Ecuador y Thaiti. Señalaron a esta última especie como la más altamente susceptible con mortandades de hasta el 90.0 % y *L. vannamei* como portador asintomático. A HPV y MBV lo diagnostican en granjas del Norte y Sur América en camarones importados de Asia. El camarón blanco se encontró infectado por ambos virus.

B.- Caracterización del IHHNV: Bonami y cols. (1990), purificaron y caracterizaron el IHHNV con base en bioensayos, infectando a la especie susceptible *L. stylirostris* con *L. vannamei* positivos. Purificaron al virus en gradientes de sacarosa, CsCl, Celite 235 y Freon. Extrajeron el ácido nucleico en cloroformo-álcohol isoamílico y lo separaron por electroforesis en geles de agarosa. La densidad del ácido nucleico (AN) en CsCl la calculan en 1.3-1.4. Por tinción negativa, y empleando como comparador al VMT determinaron un tamaño de 20-23 nm con 5-6 lados, indicando que es un virus icosaédrico. Por SDS-PAGE separaron cuatro polipéptidos de 74, 47, 39 y 37.5 kD. Únicamente se presentó un tipo de AN en base al examen en un medio de disociación calentado a 60°C por tres min y corridos en SDS al 0.7% en geles de agarosa. Así mismo, detectaron una sola banda en el material tratado con metil-mercurio. El AN fue RNasa resistente y sensitivo a la nucleasa SI, por tanto, se dedujo que este era DNA de un solo filamento (ssDNA). Estos datos se corroboraron por la ausencia de hipercromicidad a 260 nm cuando se calentó suavemente. El tamaño calculado fue de 4.1 kb con marcadores dsDNA en agarosa al 0.7 %. De acuerdo a estas características se ubicó en la familia Parvoviridae.

Bonami y Lightner (1991) ubicaron al IHHNV como un Picornaviridae, al cual detectan en penaeidos marinos cultivados en América, Asia y Medio Oriente. Mencionaron que el virus afecta al camarón azul y blanco del Pacífico Americano y *P. monodon* y *P. semisculatus* De Haan del Indopacífico, pero solamente en el camarón azul causó pérdidas serias, mientras en el blanco no ocasiona alguna sintomatología aparentemente. Diagnosticaron al virus en camarones silvestres cautivos únicamente de Malasia y Filipinas. Hasta entonces, caracterizaron al IHHNV como un virus sin envoltura, tolerante a glicerol, de 20-22 nm, icosaédrico, replicación en citoplasma con una densidad en gradiente de CsCl de 1.34-1.40 g/ml

⁻¹. Por electroforesis se cree que existen tres proteínas de cápside, dos menores y una mayor, de 36, 49 y 35 kD, respectivamente. Los análisis de AN obtenidos los consideraron inconsistentes, sugiriendo que no es DNA. Entrevén la posibilidad de que se trate de un Picornaviridae, pero no excluyen a Parvoviridae.

C.- Caracterización molecular de IHNV y otros parvovirus relacionados: El grupo de los Parvoviridae se incluye en la Clase II, donde se concentran aquellos que poseen un genoma de DNA monocatenario (ssDNA), de acuerdo a la clasificación de Baltimore y al International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, ver para mayores detalles a Voyles, 1993). Al filamento de DNA de los Parvovirus se le denominó banda negativa, o *minus*, debido a que su AN tiene secuencias que son el complemento del mRNA quien por convención en biología molecular, se le define como una banda positiva. Así, el mRNA es la figura central de la clasificación Baltimore. En los DNV (Densovirus, que es el género al que más se acerca el IHNV a la fecha) estudiados, ocurre la encapsidación separada en proporciones equimolares de bandas de cada polaridad (*plus* y *minus*) mostrando cada una capacidad codificante equivalente (Giraud y cols., 1992; Dumas y cols., 1992). A diferencia de estos DNV's, el IHNV no ocasiona tanta hipertrofia en los núcleos durante la infección y no encapsida filamentos de ambas polaridades en igual frecuencia, según considera Mari y cols. (1993).

En Parvoviridae se encuentran los géneros Densovirus, Dependovirus y Parvovirus. El género DNV incluye únicamente a los parvovirus autónomos de invertebrados a los cuales casi no se les ha investigado. En *Parvovirus* se encuentran los virus autónomos que se reproducen en mamíferos y en el género *Dependovirus* se incluyen a los virus adeno-asociados (AAV) con replicación

defectuosa los cuales requieren que la célula hospedante se infecte simultáneamente con otro DNA virus como Adenovirus o Herpevirus, auxiliándolos para la replicación. Por esta razón, al IHNV se le ubica como miembro de los Densovirus (Mari y cols.; 1993).

Los DNV's identificados en invertebrados, causan enfermedades letales en grupos de Lepidópteros, Dípteros, Orthópteros, Dictyoptera y Odonata caracterizadas por la acumulación de partículas DNV en el compartimento nuclear. En los DNV's secuenciados, se han demostrado largas secuencias palindrómicas terminales (ITR, para el rescate del DNA viral de los plásmidos y para su replicación) y lo mismo se ha postulado para varios de ellos de acuerdo al análisis con enzimas de restricción. Estos *termini* contienen secuencias especiales autocomplementarias que le permiten plegarse sobre sí mismas para formar dos horquillas lobuladas dándole apariencia de "Y" ó "T", donde las secuencias en los extremos 3' y 5' difieren una de otra (Giraud y cols., 1992; Dumas y cols., 1992; Voyles, 1993). Todos los parvovirus secuenciados hasta 1991 presentan dos marcos de lectura abierta (ORF's) mayores dentro de la banda *plus*, de los cuales el ORF izquierdo codifica para proteína(s) no estructurales importantes para la replicación viral y el derecho para la mayoría de las secuencias expresadas en proteínas de la cápside (Anton y Lane, 1986).

Lu y cols. (1989) reconocieron la falta de un protocolo para el aislamiento, recuperación y purificación de grandes cantidades de virus en camarones infectados con IHNV. Desarrollaron un método aplicado en branquias y gnatotorax de *L. vannamei* y *L. stylirostris* provenientes de Hawaii y Ecuador. Prepararon una solución homogeneizada al 33.0 % en amortiguador de fosfatos salino (PBS) pH 7.5, centrifugan y el sobrenadante lo tratan con trifluoro-tricloro-

etano (Genetron 113). La purificación final consistió en un bandeo isopícnico en CsCl. Colectaron las fracciones registrando las lecturas a $A_{260-280}$ nm. Determinaron el tipo de AN por la prueba colorimétrica de orcinol y difenilamina como RNA, en cantidades de 4.7% considerándolo como un miembro de Rhabdoviridae. La densidad de la única banda la calcularon en 1.33 g ml^{-1} . El radio de las partículas virales fue de 0.69-0.77 lo cuál según ellos, revelan una población homogénea de partículas isométricas con un diámetro de 19 ± 1 nm. al MET. Los intentos para infectar PL's de *P. stylirostris* y *P. monodon* con el producto purificado fueron negativos.

Loh y Brock (1990) encontraron que la línea celular de peces llamada *epitelioma papillosum cyprini* (EPC) de la carpa *Cyprinus carpio* Linnaeus es susceptible al virus del camarón penaeido IHNV. Reportaron crecimiento exitoso del virus lo cual, mencionan, promete servir como un sistema celular sensitivo al aislamiento y detección del IHNV. Conforme a sus observaciones, determinaron que el virus presenta RNA como AN y para confirmarlo, sometieron al virus a la presencia de BuDR (5'- bromo-2-deoxiuridinal), un antagonista del DNA. Como controles emplean al CCV (DNA del virus del bagre) y al genoma del virus SVCV (Viremia primaveral de la carpa, que presenta RNA). Observaron que la inhibición se presentó en la muestra de CCV, más no en la del SVCV y en el IHNV por estar constituido por RNA.

Lu y cols. (1991), infectaron la línea celular EPC con un homogeneizado libre de células provenientes de camarones infectados con IHNV. Al MET lo describieron como un virus cilíndrico con un extremo redondo y el otro plano, con una envoltura rodeando la nucleocápside y una estructura en forma de perilla en el extremo distal. Determinaron el diámetro de las partículas virales entre 65-77 nm.

Infectaron *L. stylirostris* y *L. vannamei* al inocularlos con 0.2 μ l del filtrado de camarones enfermos y lisados de células infectadas. Consideraron a la línea celular altamente sensitiva para la proliferación del virus.

Luedeman y Lightner (1992) desarrollaron un método para cultivos celulares primarios de camarones penaeidos. Evaluaron la hemolinfa de langosta, extracto de músculo de camarón, suero fetal bovino, hibridoma-suero bovino fetal, entre otros. Los mejores resultados fueron obtenidos con el medio de insectos Grace suplementado con hibridoma-suero bovino fetal. Las condiciones óptimas de osmolaridad para las células de camarón en este medio fueron de 700-750 mmol/kg a una temperatura de 25-28°C con incubación en una atmósfera normal. Con el método desarrollado, las monocapas de los cultivos primarios de células epiteloides de ovario de *L. stylirostris* y *L. vannamei* mostraron rutinariamente una confluencia del 80.0% en un periodo de dos días.

Mari y cols. (1993), investigaron la estructura genómica del IHHNV para determinar la posible diferencia entre las cepas del virus, conocer su efectividad como cepa de referencia después de clonarla y diseñar una prueba de diagnóstico específico. El genoma purificado fue tratado con MBN, RNasa A y calor (94°C min.). Determinaron el peso molecular con los marcadores *Hind*III e *Hind*III/EcoRI. En geles de agarosa al 1% observan 3 bandas: (1) La banda A con 6.5-7 Kpb (no resistió a la digestión con MBN, es ssDNA, sensible al calor y es una banda *plus*), (2) la banda B con 4 Kpb (resiste la digestión con MBN, es dsDNA, sensible al calor, y se cree que es el resultado de 2 o mas moléculas de DNA asociadas por extremidades complementarias o secuencias palindrómicas) y (3) la banda C (no resiste la digestión con MBN, es ssDNA, y es el DNA encerrado mayormente en el virus apareciendo como una marca fuerte en el gel de

electroforesis, se considera una banda *minus*). con 2.6-1.5 Kpb. La digestión con RNasa no afectó a las bandas. Para clonación en el plásmido pUC18 emplearon solo la banda B obteniendo 500 colonias de *Escherichia coli* DH5 α transformantes. Efectuaron el mapeo de los insertos con enzimas de restricción para determinar la similitud entre los fragmentos. Localizaron el sitio de restricción *AccI*, *Bgl* II, *Eco* RI, *Hinc* II, *Kpa* I y *Pst* I. El DNA se insertó en el sitio *Sma* I del pUC18, flanqueado en la clonación múltiple por *Bam* HI y *Sac* I. Llamaron al inserto completo BS4.5 (productos de la digestión con *Sac* I/*Bam* HI) y a sus 3 fragmentos los llaman BE1.0, BE2.3 y BE1.3, obtenidos de la doble digestión con *Eco* RI y *Bam* HI (presentaron un tamaño de 1.0, 2.3 y 1.3 kpb, respectivamente). Los fragmentos con IHHNV a concentraciones de 1.5 y 0.5 ng hibridaron con el fragmento B54.5 marcado con DIG, lo cual indicó que el DNA clonado correspondió al menos con una parte del genoma marcado. Los fragmentos BE1.3 y BE1.0 no hibridan, pero el BE2.3 si lo hace, señalando la presencia de secuencias homólogas. El B54.5 también hibridó con el producto de digestión (*Bam*HI/*Eco*RI) de los plásmidos BA401, BA402, pero no con BG45 y DR22.

3.- BACULOVIRUS QUE INFECTAN CAMARON

A.- Subgrupos y distribución en hospederos: La familia Baculoviridae está dividida en tres subgrupos: (1) Virus de la polihedrosis nuclear (nuclear polihdrosis virus= NPV) o Tipo A, (2) Virus de la granulosis denominados (granulosis virus=GV) o Tipo B y por último, (3) baculovirus no formadores de cuerpos de oclusión (non occluded baculovirus= NOB) llamados Tipo C.

En insectos se conocen más de 50 virus NPV que poseen una acentuada especificidad hospedatoria en plagas de importancia económica, por ello, actualmente numerosos estudios están orientados a emplearlos en el control

integral de insectos plaga. En el subgrupo de los NPV se encuentran aquellos virus cuyo cuerpo de oclusión poliédrico contiene nucleocápsides sencillas con envoltura y se denominan como SNPV, mientras que el otros virus desarrollan oclusiones virales que contienen múltiples nucleocápsides con envoltura y se designan como MNPV (Adams y Clintock, 1991). BP es el único baculovirus (no patógeno de insectos) caracterizado suficientemente a la fecha como para ser aceptado por el ICTV. Este se conoce desde 1974, cuando Couch lo diagnosticó por vez primera en *Fa. duorarum*. Es un baculovirus ocluido que desarrolla cuerpos de oclusión poliédricos en el núcleo de las células tubulares del epitelio hepatopancreático y en células epiteliales del intestino medio.

La familia se caracteriza porque los viriones presentan forma de varilla con envoltura, el cual encierra un genoma de DNA bicatenario o de doble filamento circular. En el caso particular de *BP*, las investigaciones señalan que este debe llamarse *PvSNPV* debido al hospedero donde desarrolla la forma más típica, *L. vannamei*, y por presentar los viriones con una cubierta o envoltura sencilla de acuerdo al ICTV. (Adams y Clintock, 1991; Bruce, 1993). En este escrito, aún se le seguirá denominando *BP* debido a que es el nombre con el que se conoce más comúnmente. Los baculovirus de hospederos no insectos, principalmente de Crustácea, como camarones, langostinos y cangrejos, se conocen desde 1972. Las baculovirosis se han reportado de ocho especies de camarones penaeidos en diversas localidades, como el Golfo de México, Hawaii, Japón, Sudamérica y Australia. Las infecciones baculovirales en no insectos, ocasionan significativos cambios citopatológicos. *BP* fue el primero que se describió en hospederos no insectos. Este, aunque no produce signos clínicos de infección en adultos o larvas de penaeidos, los cuerpos de oclusión tetraédricos pueden observarse en las

células hepatopancreáticas y cuando la infección es fuerte, los cuerpos de oclusión aparecen en heces.

La infección causada por *BP* afecta la glándula digestiva (hepatopáncreas) y trae como resultado la producción controlada de cuerpos tetraédricos de oclusión que contienen múltiples viriones embebidos. Los viriones presentan una nucleocápside rodeada por una envoltura de forma trilaminar. La nucleocápside mide aprox. 260 nm de longitud y 44.2 nm de diámetro. En los cortes ultraestructurales se observa una protrusión en forma de perilla desde la base de la nucleocápside, la cual también ha sido observada en el Baculovirus del insecto *Autographa californica* Speyer. El virion inyecta su DNA en el núcleo de la célula hospedante a través del poro nuclear después de entrar al hepatopáncreas presumiblemente por viropexis o por fusión del virión en sitios específicos de la membrana. Una vez integrado en el genoma de la célula hospedante, el virus dirige una serie de cambios morfológicamente reconocidos al MET. Estos cambios caracterizan la infección celular durante la producción de viriones maduros y cuerpos de oclusión tetraédricos. Los estadios son (1) hipertrofia nuclear y disminución de la cromatina, segregación del nucleoplasma en regiones del estroma fibrilar, (2) aparición de viriones con y sin envoltura, proliferación de la membrana nuclear externa y aparición de una extensiva membrana laberíntica contigua al retículo endoplásmico y (3) en las infecciones avanzadas ocurre el crecimiento, coalescencia, y paracristalización de los cuerpos de oclusión tetraédricos que miden desde 0.5 a 12 μm (Couch, 1974). Los viriones no ocluidos y los cuerpos de oclusión tetraédricos se liberan de las células epiteliales lisadas y llegan al lumen del intestino medio para salir por el ano junto con las heces fecales (Bruce, 1993).

B.- Distribución y epizootiología de BP en México: Lightner y Redman (1989) reportaron el primerr hallazgo de *BP* en México y describen características únicas en los crustáceos infectados, *L. stylirostris*. Encontraron cuerpos poliédricos de oclusión en larvas cultivadas cerca de Guaymas, Sonora relacionadas con mortandades hasta del 100.0 % en estanques. La infección apareció primero en protozoaeas y se incrementó en el estadio de misis hasta PL´s con una frecuencia del 80-100.0 %. Posteriormente la prevalencia y severidad decreció en los juveniles de 45 días hasta que fue indetectable. Las características al MET concordaron con las descripciones anteriores en *Fa. duorarum*, *Fa. aztecus* y *P. marginatus* Randall . Las características únicas que presentó la infección fue la gran afinidad de los viriones por los micro filamentos nucleares.

Overstreet y cols. (1988) mencionaron que las infecciones por *BP* han impactado históricamente la producción camaronera de larvas a nivel de laboratorio y de estanques, debido a las alteraciones histopatológicas y mortandad en al menos cuatro especies de camarones incluyendo a *L. vannamei*. Para corroborar la patogenicidad de este virus, infectaron experimentalmente a *L. vannamei* de laboratorio en las fases de PL₁ y PL₂ con rotíferos libres del virus alimentados con algas y a los estadios de misis M₂, M₃ y PL₁ con tejidos de camarón sano y algas. Por otra parte, alimentaron a los estadios PL₃ con rotíferos infectados con *BP* y a M₁ y PL₁ con tejidos de camaron infectado. Cuando la fuente de infección fueron adultos y juveniles para alimentar a PL₃, los camarones mostraron una infección patente con núcleos hipertróficos y oclusiones poliédricas virales a los 5-6 días PI. El examen al MET y ML mostraron infección viral extensiva en muchas células del intestino anterior y casi el 80-90.0 % de las células tubulares hepatopancreáticas mediales y proximales. La prevalencia obtenida en el

bioensayo fue del 100 %, pero en los estadios larvarios de *L. vannamei* el virus fue especialmente patógeno.

Krol y cols. (1990), observaron un reovirus en el intestino medio y epitelio de hepatopáncreas durante un estudio sobre el efecto de *BP* en larvas de camarón blanco. El reovirus solo se presentó en ejemplares infectados experimentalmente con *BP*. Durante su investigación, infectaron primero a los rotíferos *Brachionus plicatis* con *BP* y transfirieron la infección a 14 nauplios de *L. vannamei* en los conos Imhoff en períodos de 26 h de contacto. Nueve de los crustáceos desarrollaron la infección con evidencias clínicas y 5 de ellos una infección por Reovirus. El *BP* se presentó al ML en cuerpos poliédricos de oclusión y viriones en el núcleo de las células epiteliales del hepatopáncreas e intestino medio. Mientras, la infección por el reovirus se manifestó en racimos de viriones en el citoplasma del hepatopáncreas y células epiteliales del intestino medio anterior pero más frecuentemente en las células de reserva R y células fibrilares F. De acuerdo a la forma, tamaño y localización, este último correspondió al grupo de los Reovirus pero mencionaron que es necesario realizar estudios de aislamiento, purificación y análisis del AN para confirmarlo. Por otra parte, consideraron que la infección experimental con *BP* muestra una patogenicidad limitada debido quizá al escaso tiempo de desarrollo. Indicararon que el reovirus es uno de los factores que predisponen la adquisición de enfermedades.

Le Blanc y Overstreet (1990), concluyeron que la edad influencia la infección con *BP* de acuerdo a los experimentos realizados en 7 grupos de edad. Los *L. vannamei* más viejos (PL's mayores de 63 días) fueron menos susceptibles a desarrollar infecciones patentes en comparación con los jóvenes. La prevalencia de las infecciones nuevas disminuyó con la edad, algunas veces hasta cero. El período

prepatente se incrementó unos días en las infecciones de los grupos con mayor edad. El número relativo de células hepatopancreáticas afectado fue del 75-80% en las PL's de 3 días hasta menos del 5% en los individuos entre 63-157 días. Las infecciones no fueron detectables en los crustáceos entre 325-454 días de edad.

Le Blanc y cols. (1991), reportaron la relativa susceptibilidad que presentó *Fa. aztecus* a la infección experimental con *BP*, en base a reportes anteriores en 13 especies de penaeidos del Continente Americano, en los cual varió la severidad de las epizootias, no solo de acuerdo a la especie, sino también al estadio y condiciones de cultivo. Además realizaron este trabajo al observar que *P. setiferus* Linnaeus, originarios de los estuarios de Mississipi no habían presentado infecciones por *BP* en contraste con los juveniles de *Fa. aztecus* de la misma localidad, quienes exhibieron infecciones leves o moderadas, lo cual tentativamente sugirió que *P. setiferus* fue una especie más resistente al virus. En su estudio infectaron experimentalmente a *Artemia franciscana* para dosificar las infecciones en *Fa. aztecus* y *P. setiferus*. La primer especie presentó un 25% de infección mientras que la segunda no desarrolló signos de la virosis. Concluyeron que *L. stylirostris* no es un hospedero natural aunque el resultado no fue contundente debido a lo pequeño de la muestra (n=18).

Lightner (1993), reportó que los baculovirus son entéricos, con excepción de HB (Baculovirus hemocito infectante de *P. monodon* y *P. esculentus* Haswell, Haswell; ahora PHRV) que se presenta en hemocitos. Los baculovirus causaron severas epizootias en PL's, larvas y juveniles. Sugirió que el diagnóstico de *BP* se debe fundamentar en la observación de las oclusiones tetraédricas en hepatopáncreas, intestino medio o heces. Mencionó que los cuerpos de oclusión son eosinofílicos, triangulares, de 17 μm , ocurrió dentro de los núcleos

hipertrofiados de los túbulos epiteliales del hepatopáncreas, células epiteliales del intestino medio y su distribución geográfica incluyó a Ecuador (*L. vannahae*), Golfo de México (*Fa. aztecus* y *Fa. duorarum*) y Hawaii.

C.- Caracterización molecular de *Baculovirus penaei* : El genoma de BP ha sido bastante estudiado en el ámbito biológico, bioquímico y genético. Incluso se conoce la composición bioquímica de la polihedrina de los cuerpos de oclusión. Summers y Smith (1987), determinaron la conformación de la polihedrina y su relación con los baculovirus de insectos encontrando algunas reacciones cruzadas con la del baculovirus de *Autographa californica* y de *Trichoplusia ni* (Hübner), lo cual confirma la presencia de secuencias primarias similares o de sitios antigénicos entre la polihedrina de BP y de la de otros baculovirus de insectos (Vialard y Richardson, 1993).

El ds DNA de BP, posee un tamaño de 114 kb y características estructurales similares al DNA de los baculovirus de insectos. El DNA presenta 50-100 genes, los cuales, durante la infección de una célula inician un ciclo de transcripción en cascada, gobernado por genes tempranos, tardíos y muy tardíos. La transcripción temprana es mediada por la RNA polimerasa II de la célula hospedante y empieza antes del inicio de la replicación del genoma. La transcripción tardía, en contraste, ocurre después de la replicación y depende de la presencia de una RNA polimerasa que es α -amanitina e inicia la transcripción desde dentro de una secuencia promotora y contribuye a la transcripción de la polihedrina y del gen p10. En esta fase también se transcriben las proteínas estructurales de la envoltura viral. Otro de los productos de los genes tardíos es la glicoproteína viral gp64 y la proteína mayor de la cápside. Ambos son genes esenciales. (Volkman y Keddie, 1990; Bishop, 1992; Glocker y cols., 1993).

Mari y cols. (1993) realizaron la caracterización y clonación parcial del genoma del Baculovirus de *P. monodon* (PmSNPV=MBV), el cual es un virus ocluido, enzootico en camarones silvestres y cultivados del Sureste de Asia. Aislaron y purificaron al MBV determinando que este presentó forma de varilla, con envoltura y tamaño de 265-282 nm de longitud x 68-77 nm de diámetro. Observaron que presenta además un único apéndice en cada extremidad. La superficie presentó un aspecto estriado con una estructura en forma de gorra en cada extremo. Encontraron que las subunidades del cuerpo de oclusión midieron 22-23 nm de diámetro con forma de icosaedro. Estas subunidades, que es polihedrina, exhibieron al menos un polipéptido mayor de 58 kD por SDS-PAGE. El AN presentó forma superenrollada al MET y demostraron que es DNA mediante enzimas de restricción, pero debido al superenrollamiento de las moléculas de DNA no fue posible medir el peso total del genoma. Obtuvieron cinco fragmentos de restricción (21 o más, 9, 6.5, 3.5 y 2.8 kpb denominándolos con las letras A, B, C, D y E, respectivamente) con la endonucleasa *Bam*HI, separándolos en geles de agarosa para clonarlos en el sistema pUC18-DH5 α . Determinaron el número de sitios de restricción para los fragmentos B, C, D y E con las enzimas *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Bg*III, *Xba*I, *Hinc*II, *Sal*I y *Sac*I. Establecieron el mapa de restricción para los insertos que presentaron de 8.5 a 2.8 kb correspondiendo al fragmento de restricción clonado *Bam*HI. Por esta característica proponen que se incluya en el subgrupo A, subtipo SNPV de la familia Baculoviridae y se nombre *Pm*SNPV de acuerdo a la guía del ICTV.

Bruce (1993) realizó la caracterización y clonación parcial del genoma de *BP*y además determinó la aplicación de la sonda genética para detectar al virus en muestras de camarón mediante hibridación "dot blot" y en cortes histológicos. Caracterizó los fragmentos de DNA obtenidos de la clonación del genoma clonado

y digerido con las endonucleasas de restricción *Bam*HI en el vector pUC18. Determinó ocho fragmentos de restricción, los cuales presentaron 11.7, 8.2, 8.2, 4.8, 4.0, 4.0, 2.9 y 1.1 kpb con sitios de digestión *Eco*RI/*Hind*III. Entre las características físicas encontró que las subunidades de polihedrina midieron 17-19 nm; nucleocápside de 306-312 nm de longitud por 62-68 nm de diámetro. Las partículas envueltas midieron 312-320 nm de longitud y 75-87 nm de diámetro. Designó a la prueba génica B1.23; B3.9, B4.9, B8.4a y B8.4b, con un tamaño aproximado de 1.23, 3.9, 4.9, 8.4 y 8.4 kpb, respectivamente. La sonda génica mostró reacción positiva con el DNA de BP obtenido de especímenes en Hawaii y Mississippi, con los cuerpos de oclusión de cepas provenientes de Hawaii, Mississippi y Ecuador y con muestras de heces y tejidos de camarones infectados con BP, pero no reaccionó con los virus REO, HPV e IHHNV. El fragmento de restricción que mostró reacción en cortes de tejidos fue el B1.23. Mientras, las pruebas con los fragmentos B8.4A y B8.4B mostraron reacciones moderadas. El resto de los fragmentos presentaron reacción leve. Esta técnica fue altamente específica para camarones de varias especies, observando reacciones negativas con los virus MBV, Tipo C, HPV, cabeza amarilla e IHHNV.

D. Complejo de virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, WSBV, etc.): Inicialmente conocido como WSBV, este virus fue clasificado en el género NOB, dentro de la subfamilia Nudivaculovirinae, familia Baculoviridae, según el 5° Reporte del ICTV (Francki y cols., 1991). Sin embargo, en el 6° Reporte de la ICTV la subfamilia y el género citados, no se agregan a la lista, quedando como virus de invertebrados sin asignación (Murphy y cols., 1995).

Otros nombres que le han sido asignados han sido: Baculovirus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética (IHHNBV), causante de la enfermedad epidérmica explosiva del langostino ocurrida en 1993-1994 en China, (Huang y cols., 1994; Cai

y cols., 1995) Virus en forma de varilla de *Ma. japonicus* Bate (Inouye y cols., 1994; Takahashi y cols., 1994)) Baculovirus sistémico ectodérmico y mesodérmico (SEMBV) del camarón tigre *P. monodon* de Tailandia (Wongteerasupaya y cols., 1995). Baculovirus de la mancha blanca (WSBV), asignado por Wang y cols. (1995) y Lo y cols. (1996). Los agente (s) virales de esta enfermedad son muy similares en tamaño (80 a 120 x 275 a 360 nm), rango geográfico, signos macroscópicos y microscópicos, por lo cual, las enfermedades causadas por estos baculovirus no ocluidos se agrupan junto con los diversos miembros del grupo WSBV, bajo el nombre de síndrome de la mancha blanca (WSSV), de acuerdo a la recomendación de Lightner (1996).

a) Caracterización del complejo WSSV: Debido a la amplia distribución geográfica y de hospederos que actualmente presenta, así como a la variación morfológica ultraestructural y secuenciación génica, en el complejo WSSV se reconocen aproximadamente 15 variedades (aislados geográficos o cepas), con el mismo número de iniciadores reportados en la literatura. Inouye y cols. (1994) describieron al agente causal como virus no ocluidos, en forma de varilla, con envoltura. El virion maduro midió 404 x 152 nm. El genoma viral fue identificado como DNA no segmentado de doble cadena, aproximadamente de 163 kpb. Con esta base, sugirieron que sea ordenado dentro de los Baculoviridae, subfamilia Nudivaculovirinae. Redesignaron al virus como PRDV (Penaeid rod-shaped DNA virus, anteriormente RV-PJ). Wongteerasupaya y cols. (1995) describieron viriones como SEMBV, los cuales midieron 276 ± 121 nm. la nucleoclápside de lo viriones completos de 201 ± 89 nm y las cápsides vacías de 302 ± 85 nm. Park y Lee (1996) refirieron un estudio más, derivado de epizootias en camarón, en el cual encontraron viriones con un tamaño de 375 x 167 nm; la nucleocápside midió de 290 x 75 nm. Takahashi y cols. (1996) observaron al MET un agente viral que

causó patología similar a los mencionados. En este caso, la longitud y anchura al MET fue de 375 x 167 nm y la nucleocápside de 290 x 75 nm. Consideraron que este difirió morfológicamente al RV-PJ estudiado en Japón. Durand y cols. (1997) estudiaron la ultraestructura de un aislado tailandés de WSSV originario de *P. monodon*, inoculándolo en *L. vannamei* y *L. stylirostris*. Al MET, los viriones fueron observados de forma cilíndrica, con una extensión apical de la envoltura. La nucleocápside fue cilíndrica, con extremos asimétricos y apariencia segmentada. Indicaron que la morfogénesis viral inicia con la formación de membranas *de novo* en el nucleoplasma y por la elaboración de túbulos largos, segmentados, vacíos. Estos túbulos se rompen después en fragmentos para formar las nucleocápsides vacías. Después de eso, las membranas envuelven las cápsides, dejando una extremidad abierta. Las nucleoproteínas, que tienen una apariencia filamentosa, entran a la cápside a través del extremo abierto. Cuando el core está completamente formado, la envoltura se cierra en el extremo abierto y forma la cola apical del virion maduro.

b) Distribución geográfica y epizootiología: La enfermedad viral más reciente en América es la denominada WSSV, aunque el origen de esta inició en Asia. Los integrantes del complejo WSSV son muy similares en el cuadro clínico, morfología al MET, histopatología e histotropismo. Los miembros de este complejo se replican en núcleos de las células derivadas del ectodermo y mesodermo.

En el Hemisferio Oriental ocasionó efectos devastadores en 1992, reconociéndose como la enfermedad más severa en camarones cultivados. Las especies afectadas fueron *P. monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Fe. indicus* Milne Edwards, *Fe. penicillatus* Alcocky *Marsupenaeus japonicus*, que constituyen las principales especies infectadas naturalmente con el virus en los países

asiáticos. Algunos ejemplares mostraron manchas blancas en la superficie interna del exoesqueleto y la mortalidad acumulativa alcanzó al 100 % después de la aparición de los signos clínicos. (Chen, 1995, Kasornchandra y Boonyaratpalin, 1998).

Las primeras observaciones de esta nueva entidad viral fueron realizadas en granjas camaronícolas de Japón, donde la mortalidad en los cultivos de *Ma. japonicus* alcanzó más del 80 %. (0.01-22.5 g). Los camarones moribundos desarrollaron un color anormal rojizo, además de manchas blancas en el cuerpo (Nakano y cols., 1994; Takahashi y cols., 1994). Inouye y cols. (1994) identificaron al agente causal como virus, no ocluidos, en forma de varilla, con envoltura, localizado en los núcleos de las células del epitelio cuticular del estómago y células linfoidales de los ejemplares *Ma japonicus* moribundos. A esta nueva entidad le llama RV-PJ (rod shaped nuclear virus of *P. japonicus*), ubicándolo en Baculoviridae o Poly DNAviridae, tentativamente.

En 1994, sucedió otro brote de enfermedad causando serias mortalidades en el camarón tigre *P. monodon*, cultivado en Tailandia. Los signos en los ejemplares enfermos fueron una decoloración rosa o rojiza del cuerpo, con manchas en el interior del exoesqueleto en el cefalotorax. Las observaciones al MET mostraron viriones cilíndricos a elipsoidales (Asian Shrimp Culture Council 1994). Wongteerasupaya y cols., (1995) la denominaron informalmente SEMBV por el origen de los tejidos infectados, perteneciente al género NOB. Las características patológicas de este fueron la necrosis en tejidos derivados de ecto y mesodermo, pero sin la formación de los cuerpos de inclusión Cowdry tipo A.

Inouye y cols. (1994) describieron mortalidades en masa del camarón "kuruma" *Ma. japonicus*. El agente etiológico lo describieron como viriones de

forma oval, con una nucleocápside cilíndrica parcialmente lenticular, de 86 x 363nm dentro de una envoltura. Con esta base, recomendaron que este sea ordenado dentro de los Baculoviridae, subfamilia Nudivaculovirinae. Redesignaron al virus como PRDV (Penaeid rod-shaped DNA virus, anteriormente RV-PJ) y sugirieron denominar a la enfermedad PAV (viremia aguda de los peneidos).

Takahashi y cols. (1996) consideraron que el RV-PJ fue importada por Japón de una población de *Ma japonicus* de China. Desarrollaron un estudio para purificar y amplificar un fragmento del DNA del RV-PJ y aplicar la técnica de PCR para el diagnóstico no solo de RV-PJ en *Ma japonicus*, sino también para el SEMBV de *P monodon*, debido a que estas enfermedades presentan signos clínicos similares causados por un virus baciliforme, no ocluidos, ocasionando serias pérdidas económicas en los cultivos asiáticos. Purificaron partículas virales a partir de tejidos infectados con RV-PJ y por separado, con SEMBV. Concluyen que RV-PJ y SEMBV están estrechamente relacionados, en base a estudios de clonación y secuenciación, además de que causan el mismo cuadro clínico, compartiendo órganos blanco e histopatología, excepto por la formación de cuerpos de inclusión.

Park y Lee (1996), estudiaron una enfermedad masiva ocurrida en *Fe. orientalis* Kishinouye cultivados en Corea. Las características patológicas de esta enfermedad, en infecciones naturales y experimentales, fueron la decoloración rojiza del cuerpo y manchas blancas en el interior del caparazón. Histopatológicamente observaron necrosis masiva del órgano linfoide, degeneración y necrosis del epitelio epidémico e intestino anterior, con los cuerpos de inclusión amfófilicos a basofílicos en epitelio y branquias. Al MET se observaron partículas virales con envoltura, no ocluidas, en forma elipsoidal o de varilla en el interior de los núcleos de células linfoidales e intersticiales del hepatopáncreas.

Consideraron que el agente etiológico estudiado en casos de Corea fue similar a los baculovirus asociados con el síndrome de la mancha blanca (WSBV) ocurridos en Taiwan.

El histotropismo de la infección por WSBV hospederos silvestres, *P. monodon*, fue analizado por Lo y cols. (1997) en 16 partes disectadas: pleopodos, branquias, estómago, músculo abdominal, hemolinfa, intestino medio, corazón, pereopodos, órgano linfoide, integumanto, tejido nervioso, hepatopáncreas, testículos, ovario, espermátóforos y tallo ocular. En todos los tejidos y órganos estudiados observaron replicación viral. Por primera vez, los estudios de hibridación *in situ* y MET mostraron evidencias del WSBV en órganos reproductores. Sin embargo, no observaron huevos maduros infectados, considerando que estos fueron matados por el virus antes de la maduración.

En 1998 se reportó un brote epizootico viral en cultivos de *Fe chinensis* de Corea. El agente causal se identificó como un virus similar al WSSV de Taiwan, con base en los signos clínicos (coloración rojiza y manchas blancas) y a la morfología viral al MET. Consideraron que este difirió morfológicamente al RV-PJ estudiado en Japón. Sin embargo, encuentran un producto de PCR de 643 pb con una secuencia idéntica a la de RV-PJ. Concluyeron que el agente coreano combinó características de WSSV y RV-PJ (Takahashi y cols., 1996)

Uno de los principales portadores silvestres, de los cuales se pensaba que no desarrollaban la enfermedad, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, fue estudiado por Peng y cols. (1998), quienes observaron las manchas blancas en el exoesqueleto, seleccionando ejemplares infectados en forma natural. Por PCR, los productos amplificados fueron similares a los de *P. monodon* y la comparación de

los perfiles de restricción con *Hae* III, *Hpa* II, *Rsa* I y *Sau* 3 A1 no revelaron diferencias. Un homogeneizado de los tejidos infectados de *P. monodon* fue inoculado a larvas y PL's de *M. rosenbergii* sanos. Después de dos días, algunos de los especímenes muertos fueron positivos para WSBV.

Otros hospederos silvestres estudiados, pero negativos a la infección por WSSV fueron *Exopalaemon orientalis*, *Trachypenaeus curvirostris*, *M. ensis* De Haan, *Macrobrachium* sp y *Procambarus clarkii*. Las jaibas *Calappa lophos*, *Portunus sanguinolentus* (Herbst) , *Charybdis granulata* Lamark *C. feriata* tampoco presentaron infección natural, al igual que las langostas *Panulirus ornatus* Heller, *P. versicolor* Latreille, *P. longipes* (Milne Edwards) y *P. penicillatus* Olivier, colectadas de las costas de Taiwan. Los casos de WSSV positivos fueron detectados en las cuatro especies mayores de cultivo, *P. monodon*, *Ma japonicus*, *Fe penicillatus* y *Metapenaeus ensis* (Wang y cols., 1998), aunque en el laboratorio se demostró la capacidad de las jaibas *Scylla serrata* Forskål, 1775 , *Sesarma* y *Uca pugilator* como portadoras del WSSV. Kanchanaphum y cols. (1998) infectaron experimentalmente a estos hospederos manteniendo la infección viral hasta por 45 días sin que desarrollaran un cuadro clínico de la enfermedad. Todas ellas transfirieron la enfermedad vía agua a *P. monodon*. Estos estudios demostraron que las jaibas son un problema real en los sistemas de cultivo. Otros reservorios potenciales que han sido identificados mediante estudios experimentales son la jaiba de la arena *Portunus pelagicus* Linné, *Scylla serrata* y el krill *Acetes* sp., los cuales son capaces de transportar el agente infeccioso y persistir por largos periodos en el medio ambiente de las granjas camaronícolas (Supamattaya y cols., 1998).

En vista de la diversidad de aislados que se reportan de WSSV, Kasornchandra y cols. (1998) analizaron aislados virales de epizootias ocurridas en seis diferentes países por histología, MET y PCR. Para aplicar la última técnica,

diseñaron los iniciadores 102 F1 y 102 R1. Los cambios histopatológicos en su totalidad fueron similares, caracterizados por degeneración celular, hipertrofia nuclear y marginación de la cromatina en los tejidos de origen ecto y mesodérmico, con la presencia de cuerpos de inclusión Cowdry, tipo A. Al MET observa similitud en tamaño y morfometría de los seis diferentes aislados. Por PCR, obtuvieron un producto amplificado de 520 pb en los aislados de Indonesia, Tailandia y Malasia, pero con los aislados de Japón, China e India se presentaron productos de peso molecular mayor a lo esperado.

Una de las principales contribuciones sobre la epizootiología de WSSV es la de Sudha y cols. (1998), quienes distinguieron tres tipos diferentes de epizootias en la India, asociadas al WSSV en los cultivos de camarón *P. monodon* y *Fe indicus*. En el Tipo I (aguda o subaguda), el nivel de severidad de infección en los tejidos fue moderada a alta, las mortalidades más significativas ocurrieron dentro de los 7-10 días. Los camarones afectados presentaron prominentes manchas blancas en el caparazón como el principal signo clínico. En el Tipo II (preagudo), los camarones afectados mostraron una masiva coloración rojiza, el nivel de severidad a los tejidos fue muy alta y las mortalidades en masa ocurrieron a los 2-3 días. El Tipo III (crónico) presentó baja severidad a los tejidos, con las manchas blancas o coloración rojiza ausente. Las mortalidades se presentaron entre los 15 a 28 días, pero escasas. La forma preaguda fue más común en los juveniles, mientras que la forma aguda a sub aguda y crónica fueron más comunes en los sub adultos y adultos. Las formas agudas y subagudas se observaron en el 60 % de las epizootias., mientras que la forma crónica y preaguda en el 30 y 10 % de los brotes, respectivamente.

c) Presencia del complejo WSSV en el Continente Americano: Los primeros casos diagnosticados de WSSV en el Hemisferio Occidental, ocurrieron casi simultáneamente en octubre y diciembre de 1995 en granjas de *L. setiferus* (Linnaeus) cultivados en Texas y Carolina del Sur, EUA (Lightner, 1996; Nunan y Lightner, 1997). Este fue diagnosticado por histopatología y confirmado por hibridación y PCR. El tercer caso de WSSV fue registrado en langostinos *Procambarus clarkii*, *Orconectes punctimanus* y *Procambarus* spp. del Zoológico Nacional en Washington, DC. (Lightner y cols., 1997), en diciembre del mismo año.

Debido al enorme impacto económico causado a la industria camaronícola asiática, en el periodo de 1992 a 1998, y a los focos epizooticos ocurridos en los Estados Unidos de América, se realizaron inoculaciones experimentales con las cepas asiáticas del WSSV en penaeidos americanos con el objeto de conocer el efecto patológico o bien, la susceptibilidad de estos hospederos a la infección. Durand y cols. (1996) aislaron el agente de la enfermedad referida como WSS y WSBV, infectando experimentalmente a *L. vannamei* y *L. stylirostris* con un homogeneizado de *P. monodon* infectado proveniente de Tailandia. Al MET, los viriones midieron 350 nm de longitud y 130 de ancho. Las nucleocápsides oscilaron de 300 a 420 nm de longitud y 70-95 de anchura con una superficie segmentada. Describieron también la presencia de partículas únicas que no habían sido observadas anteriormente y fueron las nucleocápsides más usuales (400 x 120 nm).

La presencia del virus asiático, WSSV, en Texas, EUA, planteó una seria pregunta, ¿Cómo entró el virus al Hemisferio Occidental? La diseminación de virus exóticos históricamente se atribuyó a la introducción de animales enfermos, como sementales, en áreas libres de infección; aves que actúan como vectores y transportan al agente infectivo; así como la importación y procesamiento de

productos alimenticios congelados. El último mecanismo se consideró de mayor importancia, debido a los elevados volúmenes de alimento congelado, que son importados por los EUA. Este país, en 1995 importó 118, 888, 869 kg de camarón provenientes de seis exportadores asiáticos: China, India, Tailandia, Vietnam, Indonesia y Filipinas. De este volumen, el producto congelado, constituyó el 97 % de todo el camarón importado (United States Department of Commerce, 1997). El producto recibido, por lo común fue re-empaquetado y procesado en las plantas situadas en las costas. Los desechos sólidos y líquidos de estas plantas fueron desechados al mar sin un tratamiento previo. De acuerdo a los análisis efectuados por Nunan y cols. (1998), los ensayos de infectividad, MET y PCR, han demostrado que los virus WSSV y YHV fueron detectables e infecciosos en las importaciones de producto congelado.

El estudio de otras especies de penaeidos americanos como hospederos experimentales de WSSV y YHV fue realizado por Lightner y cols. (1998). En este, las PL's y juveniles de *Fa aztecus*, *Fa duorarum*, *L. setiferus* y *L. vannamei* fueron inoculadas con tejidos infectados por los virus, provenientes de Asia. Los retos en las PL's de *L. setiferus* y *L. vannamei*, resultaron en infecciones severas, mientras que en *Fa aztecus* y *Fa duorarum* fueron menos severas. En los juveniles de *L. setiferus* y *L. vannamei*, el WSSV causó mortalidad acumulativa del 100 %. En *Fa aztecus*, se determinó una infección moderada, con mortalidad acumulativa del 27 %. En contraparte, *Fa duorarum* no presentó signos de infección y la mortalidad acumulativa fue del 0 %. El YHV, en cambio, causó mortalidad severa y mortalidad en los juveniles de las cuatro especies, pero las PL's fueron resistentes a la infección, sin presentar signos típicos de enfermedad,

La virulencia de seis aislados geográficos de WSSV en las PL's de *L. vannamei* y juveniles de *Fa duorarum* fue comparada por Wang y cols. (1999), quienes reconocieron al WSSV como uno de los patógenos más importantes de camarón, extendiéndose en la mayoría de los países asiáticos donde se cultiva el crustáceo, así como en el Golfo de México y el SE de los EUA. Comparan Los aislados originarios de China, India, Tailandia, Texas, Carolina del Sur y el aislado de cangrejos cautivos del Zoológico Nacional de los EUA. En el estudio, los hospederos experimentales fueron inoculados *per os* con tejidos infectados. Las infecciones resultantes fueron confirmadas por histología. La mortalidad acumulativa en *L. vannamei* alcanzó el 100 % después del reto con cada una de los seis aislados geográficos de WSSV, en el cual, el aislado de Texas, sin embargo, causó mortalidad más rápida que los otros aislados. En un marcado contraste, la mortalidad acumulativa en *Fa duorarum* alcanzó del 35 al 60% con los diferentes aislados. En este, el aislado de Texas fue también el más virulento. En conclusión, la virulencia varió entre cada aislado geográfico de WSSV y la susceptibilidad varió también con la especie y estadio de los hospederos.

Ultimamente, en el periodo de febrero a marzo de 1999, se registraron los últimos casos de epizootias en Nicaragua, Guatemala y Honduras. Los primeros reportes se originaron en Honduras, a mediados de enero, observándose a los camarones con estrés y un cuadro parecido al síndrome de Taura. Lo inusual de este signo fue que los cultivos de *L. stylirostris* fueron los mas afectados. Cabe señalar que el origen de las larvas fue el silvestre. Por su parte, la semilla de laboratorio, *L. vannamei* fue afectada en un grado mucho menor. Este reporte, constituyó el primer registro del WSSV en las costas del Pacífico del Continente Americano, pues los registros anteriores estaban limitados a los organismos silvestres y cultivados del Golfo de México (Deli Group-Ecuador and Aquaculture

Fonseca-Honduras, 1999; Carlos Lara G., Cosechas Marinas, Costa Rica, com. pers.).

d) Caracterización molecular del complejo WSSV: El genoma viral fue identificado como DNA no segmentado de doble cadena, aproximadamente de 163 kpb. Takahashi y cols. (1996) Extrajeron el DNA genómico y efectuaron digestiones con *Eco* RI/*Hind* III. Insertaron los fragmentos en el sitio *Eco* RI/*Hind* III del plásmido pGEM 3zf (+) y con los plásmidos recombinantes transformaron *Escherichia coli* XL1-BlueMRF'. Emplearon la clona Pjb79, con un inserto de 889 pb para diseñar un par de iniciadores. De acuerdo a la secuenciación realizada y a las reacciones de prueba, el producto amplificado mide 643 pb. Los iniciadores diseñados fueron probados con tejido del órgano linfoide infectado con RV-PJ y SEMBV, los cuales sirvieron como templado, concluyeron que ambos están estrechamente relacionados.

Un integrante más del complejo, denominado baculovirus asociado al síndrome de la mancha blanca fue aislada del camarón tigre *P. monodon*. Esta cepa se utilizó para desarrollar una herramienta diagnóstica por Lo y cols. (1996) para la detección del WSBV y otros agentes infecciosos relacionados. Purificaron los viriones y extrajeron el DNA para la construcción de bibliotecas genómicas. Diseñaron dos pares de iniciadores específicos, con los cuales amplifican productos de 1447 pb y un segundo producto de 941 pb. Consideraron que este estudio constituye una buena herramienta para estudios comparativos de otros baculovirus no ocluidos, tales como el RV-PJ de Japón; HHNBV de China; SEMBV de Tailandia y WSBV de Taiwan, así como otros baculovirus no ocluidos. Estos investigadores emplearon iniciadores específicos para amplificar en DNA genómico del camarón para monitorear la contaminación del DNA de camarón en las preparaciones de

DNA genómicas de WSBV. Con este objetivo diseñan un par de iniciadores a partir de una región altamente conservada de la secuencia 18 s RNA de los decápodos, basada en las secuencias publicadas por Kim & Abele (1990). Con estos iniciadores, se espera un producto de PCR de 848 pb, correspondiente a las secuencias 352 – 1200 de la subunidad 18 S rRNA de *Fa. aztecus* Ives. Durand y cols. (1996) después de la extracción de los ácidos nucleicos obtuvieron fragmentos de digestión con la enzima *Eco* RI para efectuar la clonación de una parte del genoma. Caracterizaron cuatro de estos fragmentos y los utilizaron como sondas no radioactivas, etiquetándolas con DIG. Las sondas así preparadas, hibridaron con el material localizado en los núcleos de los tejidos infectados, como son el tejido conectivo, tejido epitelial, músculo y tejido nervioso, incluyendo también, los hemocitos.

Una herramienta diagnóstica, basada en la producción de sondas por la tecnología dl PCR, fue desarrollada por Nunan y Lightner (1997). Utilizaron la información de secuencias de dos baculovirus de camarón, BP y MBV, para crear iniciadores que produjeron una banda de 750 pb al ser probados con WSSV de *P. monodon* como templado.

METODOLOGIA

I. MATERIAL BIOLÓGICO:

La colección de muestras se dividió en dos etapas, de acuerdo a los brotes epizooticos o signos indicativos detectados en el periodo de muestreo. Las características patológicas de los ejemplares consideradas, para ser seleccionados en el estudio, fueron la expansión de los cromatóforos rojos (camarón rojo o rosado) en todo el cuerpo o en apéndices caudales, periopodos y pleopodos. Aunado a esto, se consideró el desarrollo de manchas blancas en el exoesqueleto o bien, la presencia de necrosis cuticular extensiva asociado o no a brotes de mortandad en masa.

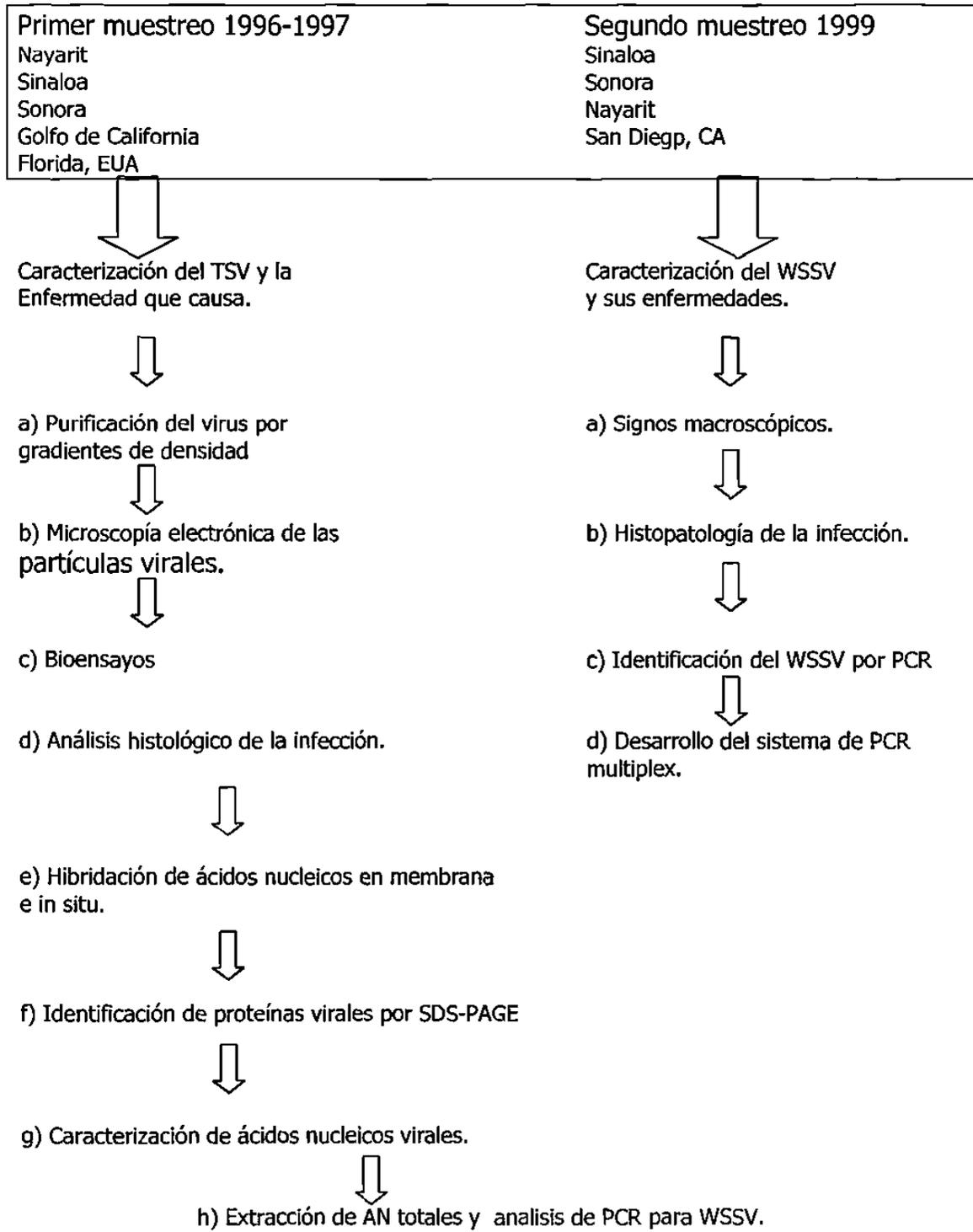
1) ORIGEN DE LAS MUESTRAS

A.- Primer muestreo (1996-1997): Las muestras infectadas fueron colectadas en epizootias de granjas camaronícolas de los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, durante el periodo de Junio de 1996 a Octubre de 1997. La patología, sugestiva de una etiología viral fue detectada en secciones de cefalotorax, teñidas con hematoxilina y eosina. El criterio patológico que se consideró es el descrito por Brock y cols. (1995); Lightner y cols. (1995) y Hasson y cols. (1996). Los sitios de muestreo y especie de los organismos estudiados se citan a continuación (Tabla 3; Fig. 1).

Las muestras fueron transportadas del lugar de colecta en CO₂ sólido, al Centro Nacional de Sanidad Acuicola (CNSA) de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL donde se conservaron a -70 °C. Las muestras de Miami Florida y del Golfo de California se emplearon como controles negativos durante el proceso de purificación de partículas y electroforesis en agarosa y acrilamida para diversos propósitos (ver diagrama de flujo de la metodología a continuación).

B.- Diagrama de flujo de la metodología utilizada

Muestreos



C.- Segundo muestreo: La segunda serie de muestras analizadas, fueron los brotes epizooticos ocurridos durante los meses de Febrero a Julio de 1999 en los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit. Los signos clínicos macroscópicos correspondían también a la expansión de cromatóforos extendiéndose en todo el cuerpo y apéndices, similar a la anterior etapa. La especie afectada principalmente fue también *L. vannamei*. Las postlarvas y los adultos jóvenes, durante la etapa de muda fueron así mismo, los más afectados. La diferencia en los casos clínicos fue, en primer lugar, que no todos los camarones sobrevivientes desarrollaron la necrosis cuticular extensiva, sino, manchas blancas, circulares, de 0.2 a 3 mm (estas últimas muy escasas) aproximadamente, difíciles de detectar a simple vista. La diferencia, con los brotes registrados en nuestro país, fue la escasa mortalidad observada en los estanques que fueron afectados. Las localidades estudiadas corresponden a los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, los cuales aparecen en la Tabla 4 y Figuras 2-3.

Tabla 3. Sitios de muestreo y especies de camarón analizados. Junio 1996-Octubre 1997.

ORIGEN	GRANJA	ESPECIE
Nayarit	Santos López, San Blas	<i>L. vannamei</i>
	Los Espejos/Matatipac, San Blas	<i>L. vannamei</i>
Sinaloa	Ramón Ahumada, Los Mochis	<i>L. vannamei</i>
	Finca Camaronera de Guasave	<i>L. vannamei/L. stylirostris</i>
	El Dorado, Guasave	<i>L. vannamei</i>
Sonora	Maritech, San Luis Río Colorado	<i>L. vannamei</i>
Golfo de California	Silvestre	<i>L. vannamei</i>
Florida, EUA	GMSB Inc., Summerland	<i>L. vannamei</i>

D.- Transporte de las muestras al laboratorio: En esta fase de trabajo, los especímenes seleccionados se trasladaron en su mayoría vivos, con oxígeno suplementario, en bolsas de polietileno selladas. El resto de las muestras se preservaron en etanol 96 %, inyectándose en cefalotorax y cada uno de los segmentos antes de depositarse en envases de plástico con etanol 96 %.

Tabla 4. Sitios de muestreo y especies de camarón analizados. Febrero-Julio de 1999.

ORIGEN	GRANJA	ESPECIE	
Sinaloa	Granja el Thenari	<i>L. vannamei</i> Jaiba silvestre (<i>Callinectes</i> sp)	
	Granja Shrimp Quality	<i>L. vannamei</i>	
	Granja Acuavisión,	<i>L. vannamei</i>	
	Granja El Baturi	<i>L. vannamei</i>	
	Acuícola Valdés	<i>L. vannamei</i>	
	Explotación Acuícola	<i>L. vannamei</i>	
	Juventud Pesquera	<i>L. vannamei</i>	
	Granja Coguasín	<i>L. vannamei</i>	
	S.C. y P, A. Mayocoba	<i>L. vannamei</i>	
	Manuel Avila Camacho	<i>L. s vannamei</i>	
	Acuícola Baja Mar	<i>L. vannamei</i>	
	Las Isabeles	<i>L. vannamei</i>	
	Sonora	Ejido Francisca Felix.	<i>L. stylirostris</i>
		Jorge Díaz Serrano	<i>L. stylirostris</i>
Héroes del Campo #2		<i>L. stylirostris</i>	
Comuneros Mayos		<i>L. stylirostris</i>	
Estero AQUIROPO		<i>L. stylirostris</i> (silvestre)	
Nayarit	Bahía de Matanchén,	<i>L. vannamei</i>	
	Nayarit	(silvestre)	
San Diego, CA	Aquadiagnostics	Control positivo	

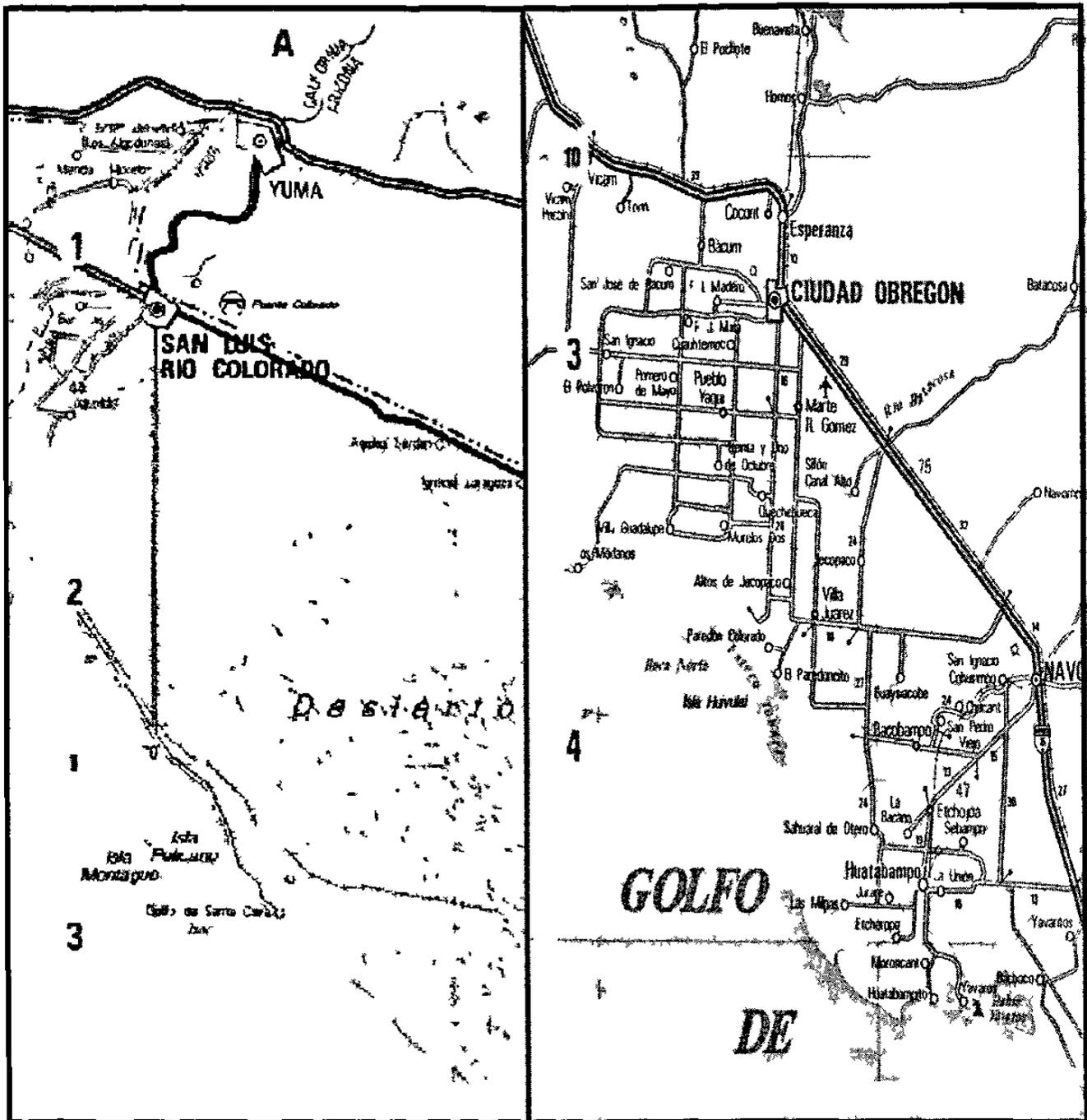


Fig. 1. Sitios de muestreo correspondientes a Sonora. (A) Mapa 1: Golfo de Santa Clara, San Luis Río Colorado; y (B) Mapa 2: Estero Siari/Atanasia, Cd, Obregón.

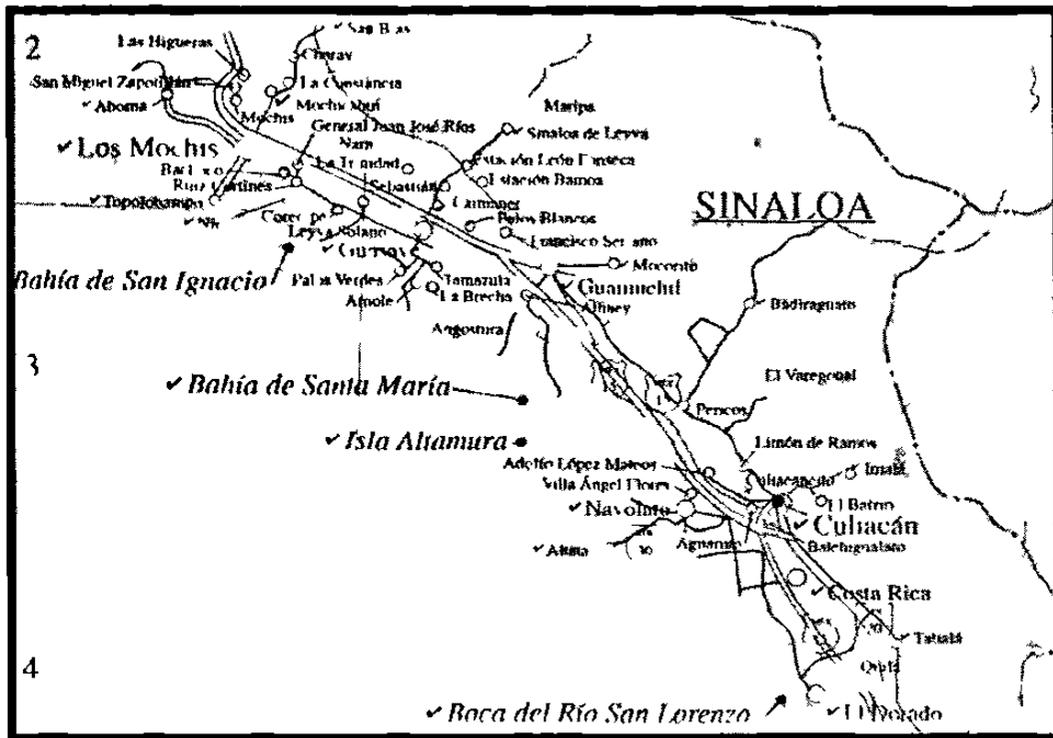


Fig. 2. Localidades de muestreo de *L. vannamei* y *L. stylirostris*, cultivados en Los Mochis y Guasave, Sinaloa.

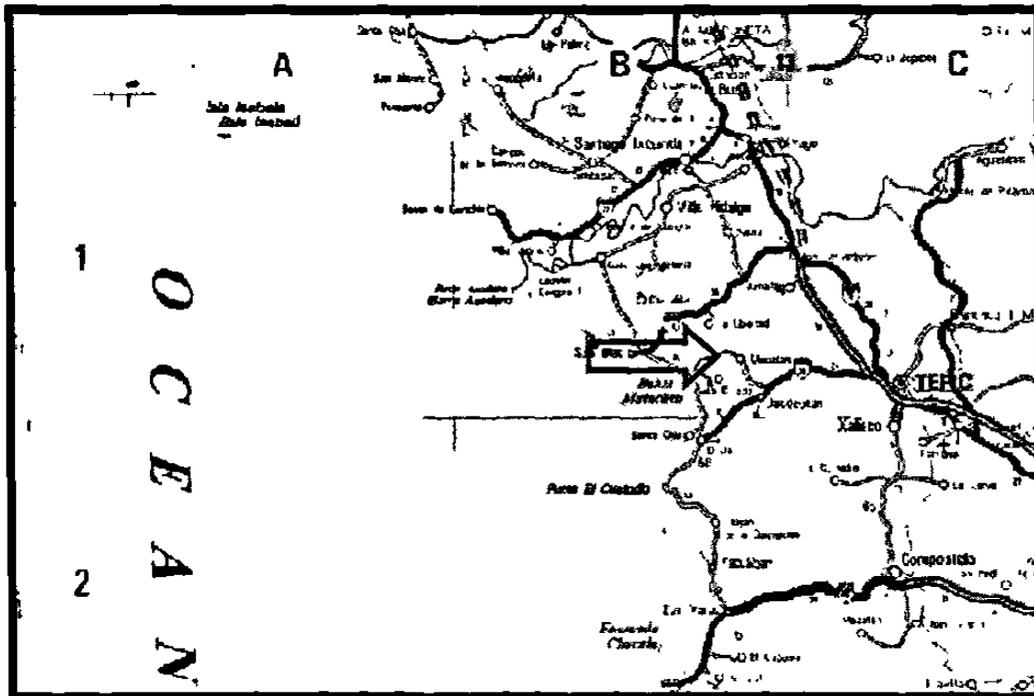


Fig. 3. Localidad estudiada correspondiente a Ensenada de Los Cocos, Matanchen, San Blas, Nayarit (flecha).

II. PURIFICACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO.

1.- Procedimientos de ultracentrifugación.

A.- Centrifugación diferencial: Se utilizó la técnica descrita por Trudel y Payment en 1993. Para cada uno de los procedimientos se emplearon de 20 a 30 ejemplares conservados a -70 °C. Se eliminó la exocutícula del cefalotorax o gnatotorax, para homogeneizar los tejidos en una licuadora de cocina (Osterizer®) con 400-500 ml de solución amortiguadora TN (Tris-HCl 20 mM y NaCl 0.4 M, pH 7.4-7.6) frío, en intervalos cortos de tiempo intercalándolos con enfriamiento periódico. Este homogeneizado fue centrifugado en tubos tipo oakridge opacos de polipropileno (Nalgene®) a 2,000 rpm por 10 min. Después los sobrenadantes fueron centrifugados a 5,000 rpm por 10 min recuperando también los sobrenadantes en nuevos tubos para repetir el paso de centrifugación a 16,000 rpm por 30 min. Las modificaciones realizadas al procedimiento son las que recomienda Bonami y cols. (1991). En cada una de las corridas que se describen, los sobrenadantes se recuperaron en tubos limpios y estériles, mientras que los precipitados fueron re homogeneizados y centrifugados de nuevo a la misma velocidad (antes de descartarlos) junto con la capa de grasa de la parte superior del tubo, reuniendo los sobrenadantes con los iniciales; los tubos se enjuagaron con 3-5 ml de solución amortiguadora TN y este se reunió con el material a re homogeneizar. Todas las corridas se efectuaron a 4 °C.

Los sobrenadantes provenientes de la clarificación a 16,000 rpm fueron concentrados en una ultracentrífuga a 150,000 *g* por 2.5 h a 4°C, recuperando los precipitados y resuspendiéndolos en 500 µl de TN; posteriormente el precipitado se dispersó en un ultrasonificador por 5 min o en jeringas de 1 ml.

B.- Extracción con freon: De acuerdo con las recomendaciones de Bonami (1996, com. pers.) el precipitado se homogeneizó con 1 vol. de freon (1,2,2-tricloro-

1,2,2-trifluoroetano, Sigma^{MR}), agitando por 10 min y centrifugando a 2,500/10 min para desechar el freon. A la suspensión se le agregó 0.1 g de carbón activado (Sigma^{MR}) agitándose por 5 min para filtrar posteriormente en una capa de Celite-235 enjuagándose en TN. El material extraído fue precipitado de nuevo a 150,000 g y resuspendido en 300-1000 ml de TN. (Bonami y cols., 1990).

C.- Centrifugación en gradientes de densidad discontinuos y lineales:

Se preparó un gradiente discontinuo de sacarosa (15-40%) con jeringas de 10 ml y aguja 18 en tubos ultraclear (Sigma^{MR}) depositando 700-850 ml de la suspensión sobre el gradiente. Las corridas se efectuaron en el rotor horizontal SW 28 (Beckman 50^{MR}) por 3 h a 27,000 rpm a 4°C (Bonami y col 1991). Los gradientes continuos o lineales se prepararon de forma similar, dejándolos reposar toda la noche a 4 °C. La recuperación de las bandas se realizó con agujas estériles del N° 18, enjuagándolas en 500 ml de TN y precipitándolas de nuevo a 150,000 g para efectuar bioensayos (ver más adelante), (Hasson y cols., 1995). o preparaciones con tinción negativa al MET para la identificación de partículas virales (Payment y Trudel, 1993).

D.- Densidad del virus en gradiente de CsCl: Una vez realizadas las observaciones al MET y efectuados los bioensayos, se continuó con los gradientes lineales en CsCl para conocer la densidad flotante (ρ en centrifugación isopícnica). El gradiente en CsCl se realizó manualmente en concentraciones (peso/peso) del 50 al 20 % diluido en solución amortiguadora TE 0.1 X (Tris-HCl 10 mM y ácido etilen diamino tetracético, EDTA, 1 mM, pH 7.4) depositándose 500 ml de la suspensión viral sobre el gradiente. La centrifugación se efectuó en un rotor horizontal SW 41 (Beckman 50^{MR}) a 28-35,000 rpm por 12 h a 4 °C. Al final de la corrida se colectaron fracciones de 500 μ l en microtubos (Eppendorf^{MR}). A cada fracción se le determinó la absorbancia en un Espectrofotómetro Beckman^{MR} 750 a una densidad óptica de 340 nm (A_{340}) para detectar las fracciones con proteínas en la muestra.

Posteriormente se determinó el índice de refracción de las fracciones en un refractómetro de Abbé marca Bausch-Lomb^{MR} para conocer la densidad de la fracción perteneciente al virus, graficándose las fracciones VS absorbancia y fracciones VS densidad para calcular la densidad de cada fracción. Las fracciones con lecturas mayores fueron precipitadas a 40,000 rpm por 3 h y se confirmó al MET y bioensayos la existencia del virus en la fracción.

E.- Tinción negativa para microscopía electrónica: La metodología empleada para la observación de partículas virales en el MET, fue como sigue, una gota (10 µl) de la suspensión de muestra procedente del proceso de purificación, se depositó en Parafilm[®] y sobre esta se colocó una rejilla de 200 mallas (tratada previamente con collodion/carbón) permaneciendo en contacto por 2 min. Después se eliminó el exceso de líquido absorbiéndolo con papel filtro Watman. El material depositado en la rejilla fue teñido con ácido fosfotúngstico 2 % en agua bidestilada por 30 seg eliminando el exceso con papel filtro y dejándolo secar. En ocasiones se utilizó acetato de uranilo filtrado en nitrocelulosa con poros de 22 nm (Alain y Berthiaume, 1993).

III. ENSAYOS DE BIOINFECTIVIDAD

Las bandas seleccionadas de los gradientes de sacarosa y CsCl, fueron probadas para determinar la infectividad de las partículas virales purificadas. Con este propósito, el agua previamente dechlorada se utilizó para disolver sal marina Ocean Instant[®]. Esta se estabilizó por 24 h, tal como lo recomienda el fabricante, antes de introducir los camarones. Los acuarios fueron desinfectados previamente en hipoclorito de calcio 1 %, enjuagándolos con abundante agua después de 15 min de contacto. Los bioensayos se realizaron con 15 camarones *L. vannamei*, de 1.5 a 2 g de peso. El inóculo consistió de 20 µl de la suspensión viral purificada y semipurificada (diluida 1:10 en agua inyectable) aplicándose por vía intramuscular en

el músculo caudal con una jeringa de 1 ml. El seguimiento se realizó durante 15 días, determinando la mortandad diaria (días de post infección dpi) por acuario y las principales características físico químicas del agua como son pH, salinidad y temperatura. Los acuarios se mantuvieron separados físicamente y además, se cubrieron con polietileno o vidrio para evitar la posible contaminación por salpique de agua entre los acuarios. El alimento proporcionado a los camarones fue Ranger 0-4, esterilizándolo con anterioridad a 120 lb/15 min como una medida preventiva. Cada grupo control se mantuvo en un área separada, bajo las mismas condiciones que los anteriores, sólo que a estos no se les inoculó. Los ejemplares con los signos agudos de la enfermedad fueron procesados para MET, ML y otros procesados por ultracentrifugación, estos para determinar la presencia del agente causal.

IV. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE (SDS-PAGE)

Para determinar el peso molecular de las proteínas que constituyen la cápside de los viriones, se prepararon geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio constituidos de un gel concentrador al 6 % y un separador al 12% de acrilamida (Laemmli, 1970). El corrimiento fue llevado a cabo usando una solución reguladora de fosfatos con SDS al 0.1 % y corriente constante de 35 mA, 200 volts recomendados para la cámara vertical Mini-V 8:10 (Gibco, Life Technologies^{MR}). Las proteínas virales se diluyeron a razón de 1:2 con solución amortiguadora de muestra 2X, desnaturalizándose a 100 °C por 5 min. Los marcadores de peso molecular empleados fueron: Fosforilasa B; ovoalbumina, e inhibidor de tripsina, utilizados para la comparación del peso molecular de las proteínas virales. Los geles fueron teñidos con azul Coomassie (1.25 g disuelto en 500 ml en una solución metanol-ácido acético) y otra serie de geles fue teñida con plata, según el protocolo descrito por Caetano-Anollés y Gresshoff (1994). Posteriormente los geles se colocados en papel celofán y fueron deshidratados en placas de vidrio por 24 hrs para su preservación

permanente. La molaridad de los polipéptidos fue medida de acuerdo a su desplazamiento electroforético (Weber y Osborn; 1969).

V.- EXTRACCIÓN DEL GENOMA VIRAL

Una vez establecida la presencia del virus en las fracciones correspondientes, estas se precipitaron a 150,000 g en la ultracentrífuga Beckman, resuspendiéndolas en 400 μ l de solución amortiguadora TE en microtubos (Eppendorf[®]). La desnaturalización de las proteínas y liberación del genoma se inició adicionando 50 μ g/ml (concentración final) de proteinasa K en presencia de SDS 1% (Gibco BRL[®]) a 37 °C/0.5 h (Campbell y Gerard, 1994). Inicialmente se realizaron extracciones de ácidos nucleicos totales con fenol equilibrado precipitándose con etanol (Sambrock y cols, 1989), pero debido a los resultados poco efectivos, se procedió a realizar las extracciones subsecuentes con Trizol[®] (Gibco, BRL), agregándose 1 ml de Trizol[®] homogeneizando por inversión e incubándose 5 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 200 μ l de cloroformo y se mezclaron vigorosamente, centrifugándose a 12,000 g/15 min./4°C. La fase superior acuosa que contiene el RNA se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó con 0.5 ml de isopropanol/15 min a 12,000 rpm /10 min. La pastilla se lavó con etanol 75 % y se disolvió en agua DEPC (Simms y cols., 1993). El corrimiento electroforético se efectuó en geles de agarosa estándar al 1% con 0.5 μ l de bromuro de etidio en solución amortiguadora de TAE (Tris acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M) (Voytas, 1993). Cada 4 μ l de muestra fueron diluidos con 4 μ l de agua y desnaturalizada con 1 μ l de SDS 20 % y calor (70 °C por 5 min), adicionándose 1 ml de solución amortiguadora muestra antes de depositarse en los posos del gel. La electroforesis se efectuó a 70-100 mA con una fuente de poder Eppendorf. La naturaleza de los ácidos nucleicos extraídos fue confirmada con RNAasa (Ribonucleasa A, SIGMA[®]) a una concentración de 50 μ g/ml por 30 min a 37 °C; 0.2 unidades de Nucleasa SI (SIGMA[®]) a 37 °C / 5 h a 37 (DNAasa para DNA de doble cadena) o Deoxiribonucleasa I (DNAasa 1, libre de RNAasa, SIGMA[®]) a 0.5

μ g/15 min de acuerdo a las instrucciones del fabricante y calor (100°/3 min), según Sambrook y cols. (1989).

VI. HIBRIDACIÓN *IN SITU* E HIBRIDACIÓN EN MEMBRANAS.

Una de las alternativas para la identificación del agente causal, fue la aplicación de sondas de hibridación del kit comercial Diagxotic®. La distribución comercial de este inició a finales de 1998, el cual se aplicó también a los cortes de tejidos para comparar los resultados de este estudio con el de otros investigadores. El procedimiento que se siguió fue el que se describe en Boheringer Mannheim (1989) y el del fabricante. La identificación se confirmó en los ejemplares con infección natural y en los ejemplares inoculados en el laboratorio mediante los bioensayos realizados.

VII. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En el muestreo de Febrero-Julio de 1999 se observaron signos sugestivos de la enfermedad llamada síndrome de la mancha blanca, por lo cual se utilizó la técnica de PCR, aplicando los iniciadores descritos en la literatura asiática (Inouye y cols., 1994; Kasornchandra y cols., 1998; Kim y cols., 1998; Lo y cols., 1998; Park y cols., 1998; Peng y cols., 1998; Takahashi y cols., 1994; 1996; Wang y cols., 1995), donde esta entidad viral ha causado pérdidas importantes en la producción camaronícola. También en el Continente Americano, durante 1995, una serie de brotes epizooticos se sucedieron en Texas y South Carolina. Durante el período comprendido de Enero a Marzo del presente año, se registró una mortalidad masiva en las granjas que circundan el Golfo de Fonseca, pertenecientes a los países de Honduras y Guatemala, donde se identificó al agente causal como el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), con mortalidades de hasta el 90 % de la producción.

A.- Extracción de ácidos nucleicos: De cada ejemplar se tomaron 50 mg de tejido branquial (previamente congelados con hielo seco para transportarlos al CNSA) y se agregó 1 ml del reactivo DNAzol[®] (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, N.Y.). El tejido se homogeneizó con un macerador de pistilo, lisando la muestra por pipeteo repetitivo. Después el homogeneizado fue centrifugado a 10,000 x *g* por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo, precipitando el DNA con 0.5 ml de etanol absoluto. El homogeneizado se mezcló por inversión y se incubaron a temperatura ambiente por 1-3 min. La precipitación del DNA se completó por centrifugación a 4 000 x *g*/1-2 min a temperatura ambiente. El precipitado de DNA se lavó con etanol al 95 %, conservándolo en solución amortiguadora TE 1X hasta el momento de utilizarlo.

B.- Selección de iniciadores para la reacción: En la literatura existe una amplia variedad de referencias (Inouye y cols., 1994; Kasornchandra y cols., 1998; Kim y cols., 1998; Lo y cols., 1998; Park y cols., 1998; Peng y cols., 1998; Takahashi y cols., 1994; 1996; Wang y cols., 1995) donde se mencionan diferentes iniciadores para la detección del virus responsable del síndrome WSSV, las cuales varían según el aislado geográfico, hospedero o variación clínica/histopatológica que se observó en los casos epizooticos. Por esta razón, se sintetizaron los siguientes iniciadores, los cuales corresponden a agentes etiológicos que ocasionan un aspecto patológico similar en Asia (Inouye y cols., 1994; Kasornchandra y cols., 1998; Kim y cols., 1998; Lo y cols., 1998; Park y cols., 1998; Peng y cols., 1998; Takahashi y cols., 1994; 1996; Wang y cols., 1995):

WSBV) 1F: 5' ATC TGA TGA GAC AGC CCA AG 3'

1R: 5' GGG AAT GTT AAA TAT GTA TCG G 3' (Kim y cols., 1998)

WSBV)146 F1 5' ACT ACT TTC AGC CTA TCT AG 3'

146 R1 5' TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG 3'

146 F2 5' GTA ACT GCC CCT TCC ACT TCC 3'

146 R2 5' TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T 3'

	146 F4	5' AGA AGG TTA GCG AAT GGA CTG 3'
	146 R3	5' CGA AGA GTA GTG TTA GAA GAG GA 3' (Lo y cols., 1996; 1998).
WSSV)	6581	5' TGT AGC AGC AGA GAA GAG 3'
	7632	5' ACT GCA CCA AAT TGT CCA CC 3' (Nunan y Lightner, 1998)
RV-PJ y SEMBV)		5' GAC ACA GAT ATG CAC GCC AA 3'
		5' ACC AGT GTT TCG TCA TGG AG 3' (Takahashi y cols., 1996)
WSS)	102F1:	5' TCA CAT CGA GAC CTC TGT AC 3'
	102R1	5' TCT AGG ACG GAC TAT GGC AA 3 Kasornchandra y cols., 1998).
WSBV)FOO1		5' CCA GAA TTG GAC ATG ATG TGG C 3'
	ROO2	5' GCG TCT CTG CAA ACA ATG TAG TGA 3' (Klimpel, com. pers., 1999)
18 S rRNA de decápodos		
	143 F	5' TGC CTT ATC AGC TNT CGA TTG TAG 3'
	145 R	5' TTC AGN TTT GCA ACC ATA CTT CCC 3' (Kim y Abele, 1990; Lo y cols., 1996).

C.- Control positivo: Este consistió de un aislado tailandés del virus WSSV, amablemente donada por el Dr. Kurt Klimpel (Aquadiagnostics, San Diego, CA). Con este fue estandarizada la técnica, desarrollándose un protocolo de PCR simple, PCR en dos pasos o ("nested") y un formato de PCR múltiple.

D.- Control negativo: Consistió en agua desionizada, estéril, en presentación de ampollitas de 1 ml (IMSS). También se utilizó DNA del plásmido *p* Bluescript SK⁺, purificado por medio de la técnica de lisis alcalina (Birnboim y Dolly, 1979).

E.- Amplificación del DNA del virus WSSV a partir del DNA total extraído de los tejidos de camarón por la técnica de PCR múltiple (Multiplex): Las muestras de DNA usadas en el proceso de amplificación totalizaron 0.2- a 0.3 mg/ml, agregándose 2 µl a la mezcla de reacción. Esta contenía Tris-HCl 10 mM; pH 9 a 25 °C; KCl 50 mM; MgCl₂ 1.5 mM; Triton-X 0.1 %; dNTP 200 mM de cada uno; 100 pmol de cada iniciador (146 F1/146R1; 146 F4/146R3; FOO1/ROO1; 1F/1R; 6581/7632; 102 F1/102 R1) y 2.5 U de Platinum Taq DNA Polimerasa (Life

Technologies, Inc., Gibco BRL, Grand Island, NY). Esta enzima permite la aplicación de la técnica en la modalidad conocida como "hot start", adicionándola junto con el resto de los componentes del cóctel. La amplificación se efectuó en un termociclador MJ Research, con el siguiente programa:

- Paso 1: 94 °C 4 min
- Paso 2: 55 °C 1 min
- Paso 3: 72 °C 3 min
- Paso 4: 94 °C 1 min
- Paso 5: 55 ° 1 min
- Paso 6: 72 °C 3 min
- Paso 7: Ir al Paso 4. Repetir 30 veces.
- Paso 8: 72 ° 5 min
- Paso 9: Conservar a 4 ° por tiempo indefinido.
- Paso 10: Fin.

F.- PCR simple: Las condiciones de la reacción fueron las mismas, la variación fue que se agregó un par de iniciadores diseñados por Kim y cols., 1998; Klimbel (com. pers.) o uno de los descritos por Lo y cols. (1998).

G.- PCR en dos pasos (Nested PCR): Este se desarrollo de acuerdo a la técnica descrita por Lo y cols. (1996, 1998) y consistió en realizar el primer PCR con el par externo de iniciadores 146 F1/146 R1. Después de completar este primer paso, se tomaron 10 µl de la mezcla de reacción y se agregaron a un segundo cóctel de PCR, con el par interno de iniciadores 146 F2/146R2, sometiéndolo a una segunda ronda de ciclos de amplificación. Esta modalidad permite aumentar la sensibilidad hasta 10^3 - 10^4 veces mayor que el PCR en un solo paso (Fig. 4).

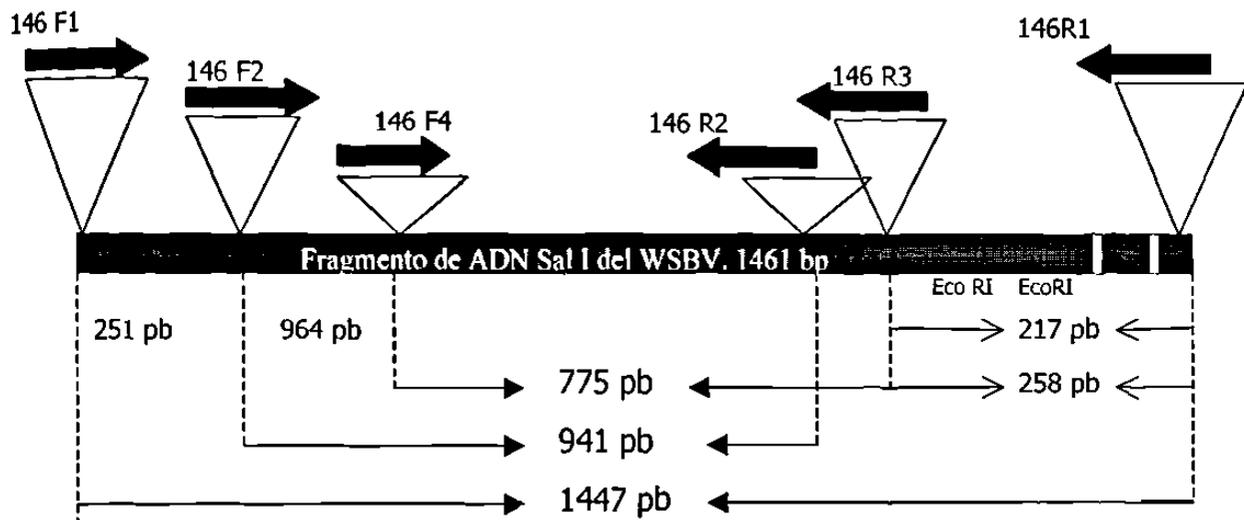


Fig. 4. Esquema de amplificación por la técnica de PCR en dos pasos (Nested PCR) o PCR anidado).

H.- Amplificación del DNA de camarón como control: En los análisis de PCR se utilizaron iniciadores específicos para amplificar el DNA genómico del camarón. Lo anterior para monitorear la calidad del DNA extraído. Los iniciadores utilizados amplifican la región altamente conservada de una secuencia 18S rRNA de decápodos. Los iniciadores denominados 143 F y 145 R, amplifican un producto de 848 pares de bases (pb), que corresponden a las secuencias 352 a 1200 del rRNA 18S del camarón *Fa aztecus*. Las secuencias fueron obtenidas de un archivo de secuencias de decápodos, basados en el trabajo de Kim y Abele (1990) y en el estudio de Lo y cols. (1996) aplicado a *P. monodon*.

I.- PCR en ejemplares del primer muestreo: Los mismos procedimientos de PCR se realizaron con ejemplares congelados del primer muestreo para determinar la posible presencia del WSSV en los ejemplares, debido al cuadro clínico parcialmente similar que ambas etiologías presentan. Además de que el WSSV se conocía desde 1993 en el Hemisferio Oriental.