



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA Y CIENCIAS DEL MAR

**"AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA NECROSIS INFECCIOSA
HIPODERMICA Y HEMATOPOYETICA (IHHNV) EN
CAMARONES PENEIDOS PARA LA REPRODUCCION
EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD"**

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del título de:

ACUICULTOR

Presentada por:

María Dolores Villacreses Salas

GUAYAQUIL-ECUADOR

1996



Ing. Raúl Coello
Presidente del Tribunal

PhD. Eric Mialhe
Director de Tesis

PhD. Jorge Calderón
Miembro Principal

Ac. Henry Alvarez
Miembro Principal

RESUMEN

El aislamiento del virus IHNV fue realizado a partir de aproximadamente 100 PL *Penaeus stylirostris* infectadas previamente experimentalmente *per os* con homogeneizados de juveniles *P. vannamei* con sintomatología de IHNV. Los PL fueron analizados utilizando las técnicas de histología, demostrando cuerpos de inclusión eosinófilos, núcleos hipertrofiados y cromatinas marginadas.

Estas post-larvas se clarificaron por centrifugación en tampón TN y se realizó una ultracentrifugación diferencial (150,000 g, 19 horas) en un "soporte de sacarosa". El sedimento se resuspendió para realizar una ultracentrifugación isopícnica en gradiente continuo de cloruro de cesio al 25-45% (80,000 g, 22 horas). Los gradientes fueron fraccionados y se determinó el índice de refracción y absorbancia a 254 nm. Las fracciones se observaron al MET y se pudieron apreciar partículas redondas (homogéneas) con un tamaño entre 20 y 25 nm.

Juveniles *P. stylirostris* infectados por medio de una inyección de 30 μ l de suspensión viral, se analizaron por pruebas histológicas, por sondas nucleicas (Dot Blot) y microscopía electrónica.

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN:	Acido desóxido ribonucleico
ARN:	Acido ribonucleico
IHHNV:	Virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética
JcDNV:	Virus de densonucleosis de <i>Junonia Coenia</i>
MET:	Microscopio electrónico de transmisión.
PL:	Post-larva
VP:	Proteína viral.

INDICE GENERAL

RESUMEN	V
INDICE DE ABREVIATURAS.....	VI
INDICE GENERAL.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	IX
INDICE DE TABLAS.....	X
INDICE DE FOTOS.....	XI
INTRODUCCION	12
I. REVISION BIBLIOGRAFICA	13
1.1 Los virus: Características generales.....	13
1.2 Virus en invertebrados.....	15
1.2.1. Virus en camarones peneidos.....	15
1.2.2. El género de los Densovirus.....	18
1.3 El virus IHHNV.....	24
1.3.1 Distribución geográfica y transmisión.....	25
1.3.2 Sintomatología y manifestación general.....	26
1.3.3 Métodos de diagnóstico del virus	27
II. MATERIALES Y METODOS	31
2.1 Material biológico.....	31
2.1.1 Juveniles <i>Penaeus vannamei</i>	31
2.1.2 Post - larvas <i>Penaeus stylirostris</i>	32
2.2 Mantenimiento de los animales en bioensayos.....	33
2.3 Histopatología	33

2.4 Ultracentrifugación y análisis espectofotométrico.....	36
2.5 Microscopía electrónica de transmisión.....	36
2.6 Diagnóstico de IHHNV por sonda nucleica.....	37
I. RESULTADOS.....	39
3.1 Aislamiento del virus IHHN.....	39
3.2 Desarrollo de protocolos de infección experimental.....	42
3.2.1 Experimentación 1. Infección <i>per os</i>	42
3.2.2 Experimentación 2. Infección por inyección intramuscular.....	46
CONCLUSIONES Y DISCUSIONES.....	49
RECOMENDACIONES	52
NEXOS	54
BIBLIOGRAFIA.....	63

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.	Familias de los virus que infectan invertebrados.....	16
Fig. 2.	Organización del genoma del densovirus de <i>J. Coenia</i> cortado en el plásmido bacteriano PB 322.....	21
Fig. 3.	Modelo para la replicación de los parvovirus.....	22
Fig. 4.	Equilibrio de las fracciones de la ultracentrifugación en cloruro de cesio.....	40
Fig. 5.	Protocolo de aislamiento del virus IHHN.....	41
Fig. 6.	Protocolo de infección experimental del virus IHHN.....	45

INDICE DE TABLAS

TABLA	I. Propiedades de los viriones en construcciones taxonómicas.....	14
TABLA	II. Lista de los virus conocidos y reportados en camarones.....	17
TABLA	III. Densovirus de insectos y camarones (en base al país de origen).....	19

INDICE DE FOTOS

- FOTO 1.-** Núcleo elongado conteniendo el material Feulgen positivo y el nucleolo destruido (flecha larga). El núcleo normal contiene partículas de cromatina y un nucleolo visible de Feulgen positivo (flechas cortas). Tinción de Feulgen X 600.....59
- FOTO 2.-** (Izquierda) Núcleo reducido (flecha corta) y un núcleo con inclusiones de tipo Cowdry-A (flecha larga). Tinción de Feulgen X600 (Derecha) Núcleo con inclusiones típicas de tipo Cowdry A (flecha larga). Tinción de Feulgen X 600.....59
- FOTO 3.-** Células sanas del epitelio de las branquias. El núcleo tiene un nucleolo bien definido (n). MET X 6000 (Cortesía del Dr. Teruo Miyasaki).....60
- FOTO 4.-** Núcleo de fibra muscular presenta una matriz densa de electrones que contiene partículas virales. C heterocromatina MET X 40000 (Cortesía del Dr. Teruo Miyasaki).....61
- FOTO 5.-** Gran número de viriones libres (redondeados) de 28 a 30 nm de diámetro en el núcleo de la célula del epitelio tubular de la glándula antenal. MET X 7000 (Cortesía del Dr. Teruo Miyasaki).....62

INTRODUCCION

El virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV) es una de las más importantes enfermedades virales de camarones pencidos en Ecuador. Está asociada a epizootias que provocan mortalidades del 90% en piscinas camaroneras. Se manifiesta por variaciones de tamaño, crecimiento reducido, debilidad general en el animal y una serie de deformaciones cuticulares que afectan el rostrum, antenas y áreas torácicas y abdominales del exoesqueleto (Lightner *et al*, 1992).

Para controlar la enfermedad se plantean dos estrategias: La primera, a corto plazo, es la prevención mediante sondeos epidemiológicos basados en el diagnóstico con sondas moleculares. La segunda, a largo plazo, es la producción de animales resistentes al virus por medio de la genética. En los dos casos un primer paso consiste en aislar el virus con el objeto de elaborar sondas moleculares y otro paso consiste en desarrollar un protocolo de reproducción de la enfermedad para evaluar la sensibilidad de las sondas y la resistencia de los individuos al virus. El presente trabajo se desarrolló con el objeto de emprender un aislamiento del virus y lograr la reproducción experimental de la enfermedad

CAPITULO 1

REVISION BIBLIOGRAFICA

1.1 LOS VIRUS: Características generales

Los virus son parásitos obligatorios intracelulares, básicamente, moléculas de ácidos nucleicos rodeadas por envolturas de proteínas, que necesitan de organismos vivos para poder replicarse. Fuera de una célula huésped, son completamente inertes.

El tamaño de los virus está comprendido entre 10 y 300 nm. La partícula viral consiste en una cápsida (capa de proteína) que protege el ácido nucleico (material genético) del virus. El material genético varía de acuerdo a cada tipo de virus y puede ser ADN (ácido desoxiribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico), de simple o doble cadena. El virión puede o no presentar una envoltura, de origen viral o celular, formada por proteínas, carbohidratos y lípidos. Así, el IHHNV no presenta envoltura. Los virus producen frecuentemente alteraciones en la célula huésped como la tumoración y otros pueden inhibir las síntesis de los macroelementos de la célula huésped.

Muchas propiedades de los virus son utilizadas para su taxonomía (Tabla I). Entre estas propiedades, algunas son importantes para la clasificación a nivel de familia, estas se indican con un asterisco.

TABLA I. PROPIEDADES DE LOS VIRUS UTILIZADAS PARA SU TAXONOMIA

PROPIEDADES DE LOS VIRUS PARA SU TAXONOMIA (Fields, 1990).

A. Propiedades de los viriones:

- 1.- Tamaño y forma del virión *
- 2.- Presencia o ausencia de una envoltura y de pleómeros. *
- 3.- Simetría y estructura de la cápsida.*

B. Según las propiedades del genoma:

- 1.- Tipo de ácido nucleico - ADN o ARN.*
- 2.- Tipo de hebras (monocadena o doble cadena), linear o circular.*
- 3.- Por la sonda (positiva, negativa o ambisentido).
- 4.- Por el número de segmentos.
- 5.- Por el tamaño del genoma o los segmentos del genoma.
- 6.- Presencia o ausencia y el tipo de 5' terminal y 3' terminal.
- 7.- La secuencia de nucleótidos.

C. Propiedades de las proteínas:

- 1.- Tamaño, número y actividades funcionales de las proteínas.
- 2.- Secuencia de aminoácidos.

D. Replicación:

- 1.- Estrategia de replicación del ácido nucleico.
- 2.- Características de transcripción y traducción.
- 3.- Sitio de acumulación, ensamblaje y eliminación de proteínas del virión. *
- 4.- Citopatología y formación de cuerpos de inclusión.

E. Propiedades físicas:

- 1.- Estabilidad térmica.
- 2.- Estabilidad a pH, a cationes (Mg^{2+} , Mn^{2+}).
- 3.- Estabilidad a solventes lípidos, a detergentes y a radiaciones.

F. Propiedades biológicas:

- 1.- Relaciones serológicas.
 - 2.- Rango de huéspedes naturales y experimentales. *
 - 3.- Patogenicidad y asociación con otras enfermedades.
 - 4.- Tropismo celular, patología e histopatología.
 - 5.- Transmisión, vectores y distribución geográfica.
-

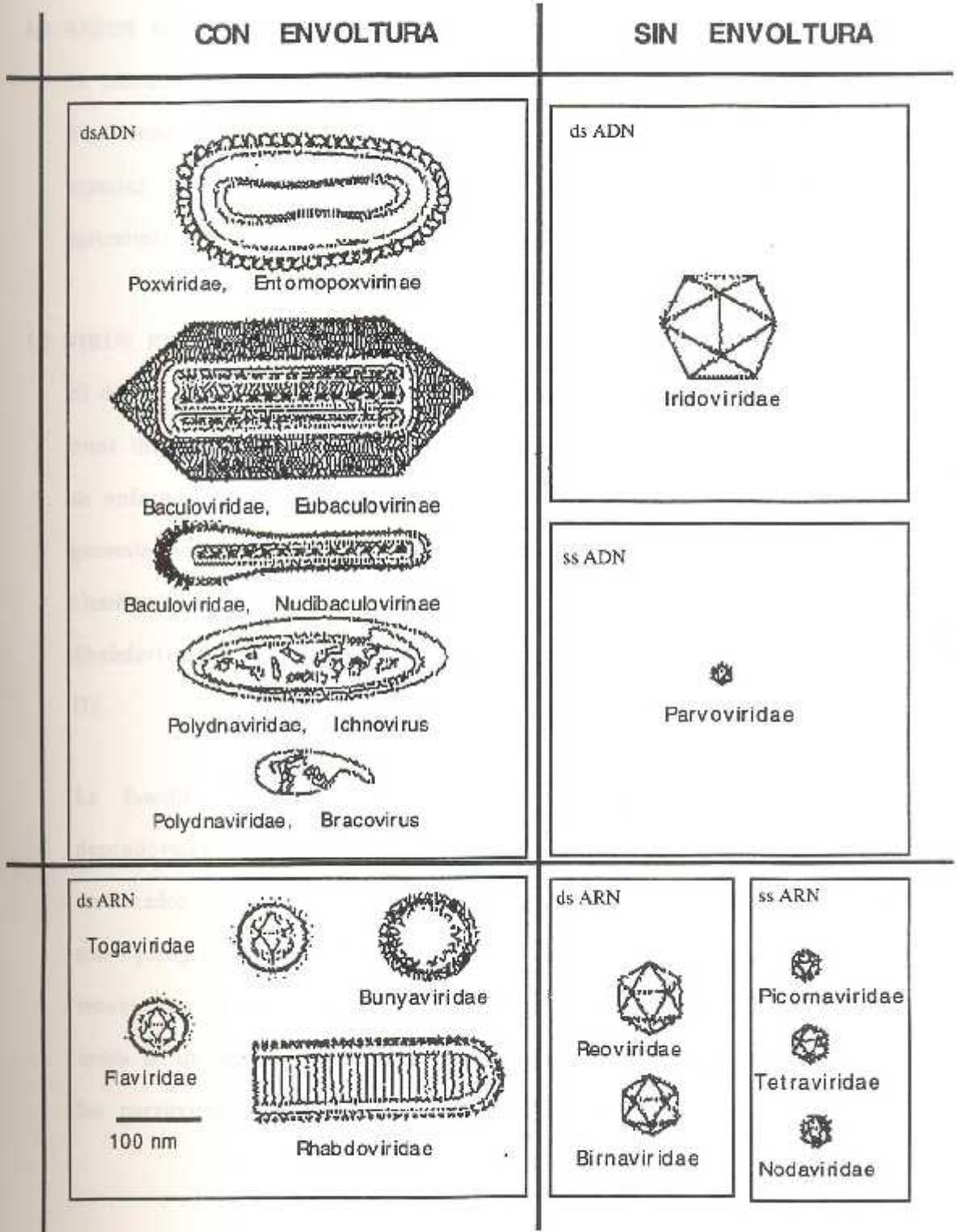


FIG. 1. FAMILIAS DE VIRUS QUE INFECTAN INVERTEBRADOS.

1.2 VIRUS EN INVERTEBRADOS.

La taxonomía de los virus es hecha por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). Los virus han sido estudiados en pocas especies y eventualmente de insectos por su importancia para la agricultura y medicina (Fig 1.).

1.3 VIRUS EN CAMARONES PENEIDOS

El desarrollo de la acuicultura ha favorecido el descubrimiento de virus de camarones y cangrejos. Se conoce actualmente una variedad de enfermedades virales en crustáceos. De acuerdo a los criterios generales en procedimientos citados, los virus de camarones han sido clasificados en las familias de: *Parvoviridae*, *Baculoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae* y *Nodamuraviridae* (Tabla II).

La familia *Parvoviridae* contiene tres géneros: parvovirus, dependovirus y densovirus. Los dos primeros géneros infectan a vertebrados incluyendo a seres humanos. Los virus del tercer género son patógenos de invertebrados y asociados a enfermedades reconocidas como densonucleosis. Los dependovirus necesitan la ayuda de un adenovirus o herpesvirus para replicarse, mientras que los parvovirus y densovirus se replican de manera autónoma.

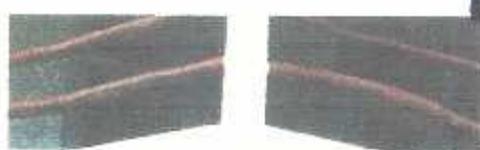


TABLA II. LISTA DE LOS VIRUS CONOCIDOS Y REPORTADOS EN CAMARONES PENEIDOS, Y SU CLASIFICACION.

Abreviación	Nombre Completo	Referencia
MONOCATENARIO		
Parvoviridae		
IHHNV 22 nm ss ADN	Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética	Lightner <i>et al.</i> , 1983 a,b Bonami <i>et al.</i> , 1990
HPV 22-24 nm ss ADN	Virus Hepatopancreático del Tipo Parvo	Lightner y Redman, 1985a
LOPV 25-30 nm ss ADN	Virus Linfoide de Tipo Parvo	Owens <i>et al.</i> , 1991
BICATENARIO		
Baculovirus		
tipo-BP 65X300 nm ds ADN	Virus de Tipo Baculovirus Penaei (especies de tipo PvSNPV), BP de Mexico y el Pacífico Este	Couch 1974, a,b Brock <i>et al.</i> , 1986 Lightner <i>et al.</i> , 1985
Tipo-MBV 75X300nm ds ADN	Baculovirus de Tipo <i>Penaeus monodon</i> (especie de tipo PmSNPV), MBV desde S.E. de Asia e Italia. PBV= <i>P. plebejus baculovirus</i> .	Lightner <i>et al.</i> , 1983c Lightner y Bovo <i>et al.</i> , 1984 Lester <i>et al.</i> , 1987
Tipo-BMN 75X300nm ds ADN	Virus Necrótico de la Glándula del Intestino Medio, Tipo Baculoviral. BMN del <i>P. japonicus</i> en Japón. TCBV= baculovirus de tipo C de <i>P. monodon</i>	Sano <i>et al.</i> , 1981 Brock y Lightner., 1990
YBV ds ADN	Virus del Hemocito de Forma Redondeada	Owens, 1993
YH ds ADN	Virus de la Enfermedad de Cabeza Amarilla de <i>P. monodon</i>	Chantanachookin <i>et al.</i> , 1993
MONOCATENARIO		
Togaviridae		
LOVV 30-55 nm ss ARN?	Virus Vacuolizante del Organo Linfoide	Bonami <i>et al.</i> , 1992
BICATENARIO		
Reoviridae		
REO-III 50-70 nm ds ARN	Tipo III Reo-likevirus.	Tsing y Bonami., 1987
REO-IV 50-70 nm ds ARN	Tipo IV Reo-like virus.	Bonami, Mari y Lightner, 1988.
Rhabdoviridae		
RPS	Rabdovirus de Camarones Peneidos	Lu <i>et al.</i> , 1991 Nadala <i>et al.</i> , 1992
Nodamuraviridae		
TSV	Virus Síndrome de Taura	Lightner, 1995

Los viriones no tienen envoltura, tienen un diámetro de 18-26 nm y son de estructura icosaédrica. El genoma del virus de esta familia está compuesto por una molécula de ADN monocatenario de aproximadamente 5000 bases. Este genoma dirige la síntesis de polipéptidos estructurales (3-4), componentes de la cápsida, y polipéptidos no estructurales involucrados en la replicación.

1.4 El género de los Densovirus

El primer densovirus, fue descubierto en una larva de lepidóptero pirálido *Galleria mellonella* L. (Vago *et al.*, 1964, Meynadier *et al.*, 1964). Este nuevo síndrome, fue nombrado denonucleosis por referencia al núcleo denso característico de las células infectadas. Posteriormente, algunos densovirus han sido descrito en distintas especies de insectos. En la naturaleza y en el laboratorio, los densovirus son generalmente muy patógenos e intervienen en la regulación de poblaciones de sus huéspedes mediante epizootias. Debido a esta patogenicidad y también a su alta especificidad, los densovirus son usados por el hombre en la lucha biológica contra plagas de insectos en agricultura o contra vectores de enfermedades en medicina humana y veterinaria. Algunos densovirus también han sido descritos en camarones y cangrejos en Asia y Europa (ver Tabla III).

TABLA III. DENSOVIRUS DE INSECTOS Y CRUSTACEOS EN BASE AL PAIS DE ORIGEN (Jourdan, 1990)

ORDEN - ESPECIE	ABREVIACION	PAIS	REFERENCIA
DICTYOPTEROS			
<i>Periplanetta fuliginosa</i>	Pf DNV	Japón	Suto <i>et al.</i> , 1979
DIPTEROS			
<i>Aedes aegypti</i>	Ad DNV	URSS	Lebedeva <i>et al.</i> , 1973
<i>Simulium vittatum</i>	Sv DNV	EEUU	Federici, 1976
<i>Aedes pseudoscutellaris</i>	Ap DNV	Venezuela	Gorziglia <i>et al.</i> , 1980
LEPIDOPTEROS			
<i>Agraulis vanillae</i>	Av DNV	Gran Bretaña	Kelly <i>et al.</i> , 1980
<i>Bombyx mori</i>	Bm DNV	Japón	Shimuzu, 1975
<i>Diatraea saccharalis</i>	Ds DNV	Guadalupe	Meynadier <i>et al.</i> , 1977b
<i>Euxoa auxiliaris</i>	Ea DNV	EEUU	Sutter, 1973
<i>Galleria mellonella</i>	Gm DNV	Francia	Meynadier <i>et al.</i> , 1964
<i>Junonia coenia</i>	Jc DNV	EEUU	Rivers y Longworth, 1972
<i>Lymantria dispar</i>	Ld DNV	Francia	Grignon, 1982
<i>Pieris rapae</i>	Pr DNV	China	Fu-lin <i>et al.</i> , 1981
<i>Sibine fusca</i>	Sf DNV	Colombia	Meynadier <i>et al.</i> , 1977a
<i>Casphalia extranea</i>	Ce DNV	Costa de Oro	Fediere <i>et al.</i> , 1981
<i>Pseudoplusia includens</i>	Pi DNV	EEUU	Chao <i>et al.</i> , 1985
ODONATES			
<i>Leucorrhinia dubia</i>	Ld DNV	Suecia	Carpentier, 1979
ORTHOPTEROS			
<i>Acheta domestica</i>	Ad DNV	Francia	Meynadier <i>et al.</i> , 1977c
CRUSTACEOS:			
DECAPODA			
<i>Peneaus merguensis</i>	PmeDNV	Singapour	Lightner y Redman, 1985
<i>Penaeus semisulcatus</i>	PsDNV	Kuwait	Lightner y Redman, 1985
<i>Penaeus orientalis</i>	PoDNV	China	Lightner y Redman, 1985
<i>Penaeus monodon</i>	PmeDNV	Filipinas	Lightner y Redman, 1985
<i>Carcinus mediterraneus</i>	CmDNV	Francia	Mari y Bonami, 1988
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	MrDNV	Malasia	Anderson <i>et al.</i> , 1990
<i>Penaeus vannamei</i>	IHHNV	Hawai	Bonami y Lightner, 1990

El virión de los densovirus se presenta sin envoltura con un diámetro entre 19 a 24 nm con una simetría icosaédrica. En la cápsida se encuentran 4 proteínas virales estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4. Las proteínas VP4 son ensambladas en 60 moléculas que constituyen las 20 caras del icosaedro. Las proteínas virales VP2 y VP3 tienen funciones de glicoproteínas estando localizadas en la superficie externa de la partícula. Los viriones son estables a pH ácidos (pH 3), a solventes orgánicos como el éter, al cloroformo, y a temperaturas de 56-65°C, lo que indica que esta resistencia esté relacionada con la simplificada estructura (Seigl *et al.*, 1985).

El genoma de los densovirus está constituido de un solo segmento monocatenario, encapsidado en el virión aislado en la forma de polaridad positiva o negativa. La extracción del ADN en una condición fuertemente iónica conduce al apareamiento de las cadenas complementarias y obtención del ADN bicatenario (Jourdain *et al.*, 1985).

El genoma del densovirus de lepidóptero *Junonia coenia* ha sido clonado y podido ser clonado íntegramente dentro del plásmido pBR322. El plásmido recombinante ha sido designado pBR322-*Jc* (Jourdain *et al.*, 1990). La secuencia completa del inserto viral clonado corresponde a el genoma que ha logrado ser reducido en sus extremidades en 88 pares de bases. Así el genoma clonado es una secuencia de 5908 pb. Una de las cadenas porta el marco de lectura ORF1 y la otra cadena porta tres cuadros de lectura

4). La carta de lectura (ORF1) codifica para los polipéptidos estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4 las cuales presentan secuencia comunes. Los ORFs 2,3 y 4 codifican para los polipéptidos no estructurales implicados en la replicación. Se encuentran varias señales de poliadenización o sitios de corte (AATAAA) a lo largo de los cuadros de lectura (Figura 2).

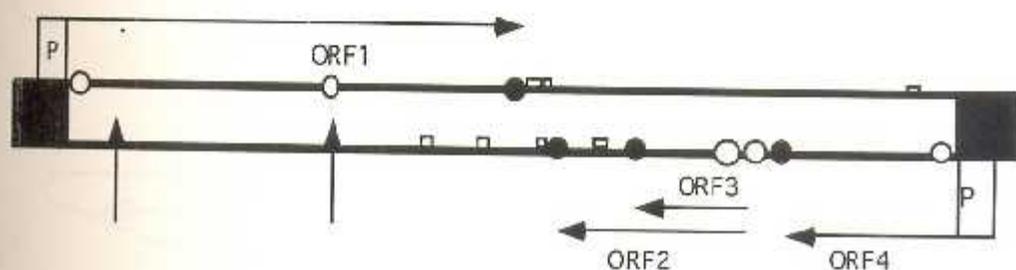


FIG 2. Organización del genoma de densovirus de *J. coenia* clonado en el plásmido bacteriano pBR322 (Dumas *et al*, 1992).

Las cadenas complementarias del genoma de JcDNV están representadas por los trazos horizontales **■**. Una cadena porta el marco de lectura mayor ORF1 y la cadena complementaria los tres marcos de lectura ORF2, ORF3, ORF4. Los ORF están representados por las flechas horizontales que indican la orientación. Las repeticiones terminales inversas se demuestran por las cajas **■**. Los signos potenciales de transcripción y traducción están indicadas como sigue: promotores **P**, codones de iniciación **○**, codones de terminación **●**, sitios de poliadenización **□**.

Dos promotores de la transcripción han sido identificados, el promotor P9 y promotor P93 que regulan respectivamente los cuadros de lectura ORF 1 y ORF 2,3 y 4. Se encuentran además repeticiones terminales inversas (RTI) en las dos extremidades del genoma, secuencias involucradas en la replicación del genoma y en su capacidad de utilización en el cromosoma de la célula huésped.

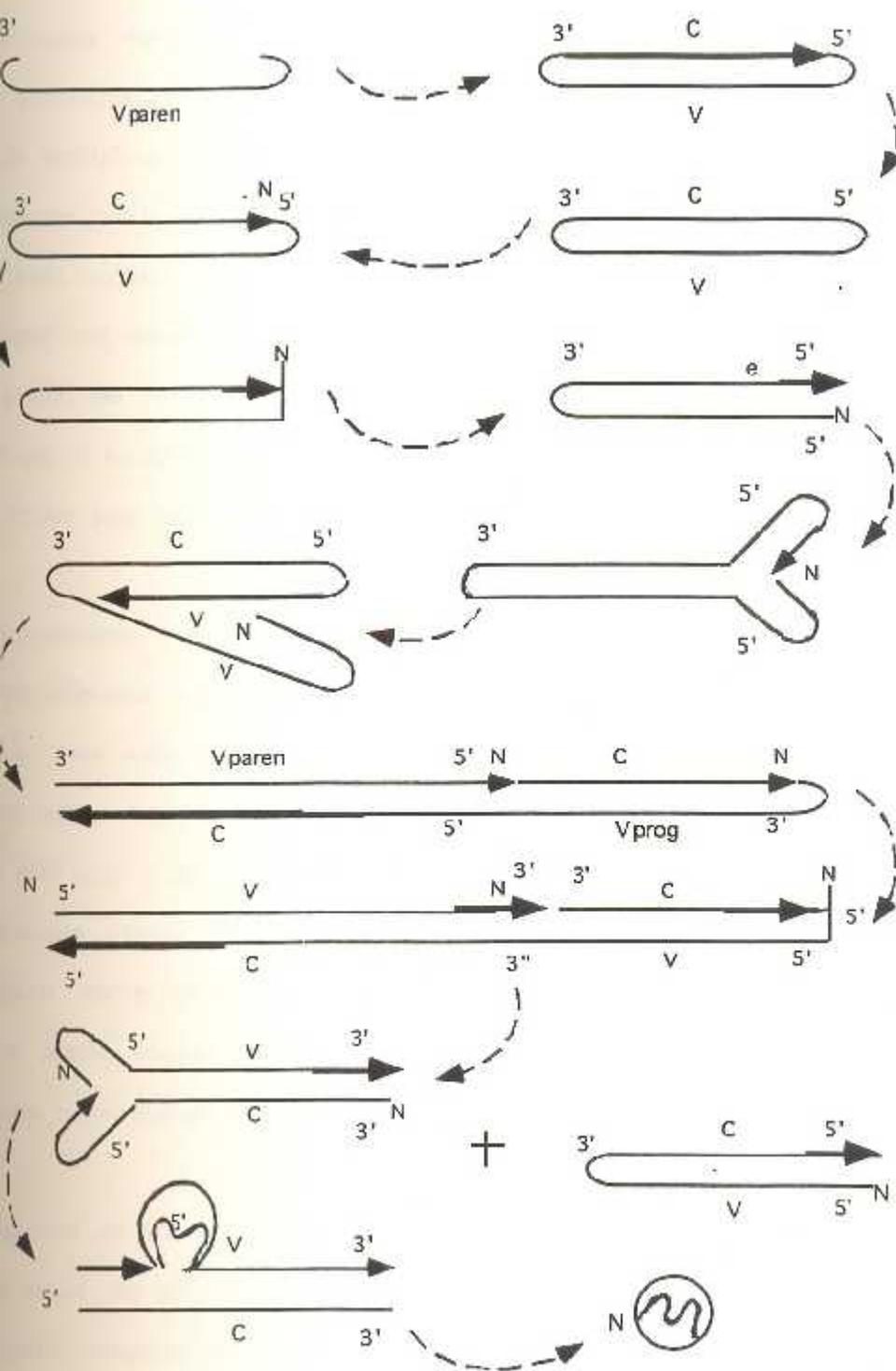


FIG 3. MODELO PARA LA REPLICACION DE LOS PARVOVIRUS. Ver el texto para detalles, (V) cadena del virión, (V_{paren}) cadena del virión parental, (V_{prog}) cadena del virión progenitora, (C), cadena complementaria, (N) sitio específico de nucleasas (Cotmore *et al*, 1987).

Replicación viral

Los parvovirus y densovirus pueden replicarse autónomamente. El inicio de la multiplicación consta de tres pasos: la fusión de la cápsida a la membrana celular, la desintegración de la cápsida, y finalmente la entrada del ácido nucleico desnudo al citoplasma. La fijación del virus a la célula huésped está basado en el reconocimiento específico entre las proteínas de la cápsida del virión y los constituyentes de la membrana de la célula. Una vez que se ha desintegrado la cápsida, el ácido nucleico se transporta hacia el núcleo para empezar la expresión viral.

Los densovirus y parvovirus se replican y transcriben en el núcleo de la célula infectada aprovechando los mecanismos de la célula huésped. La célula debe estar en la fase *S* del ciclo celular para que ocurra la replicación. Esto sugiere una relación muy cercana entre la replicación del ADN viral y del ADN celular. De hecho estos virus requieren la ADN polimerasa celular para la replicación de sus genomas. Sin embargo se requiere por lo menos de algunas enzimas codificadas por el virus. Estos virus poseen horquillas terminales de secuencia palindrómica en el ADN usadas como iniciadores para la replicación. (Figura 3).

El genoma de ADN de simple cadena (ssDNA) de estos virus se caracteriza por poseer dos polaridades: o positiva o negativa. Las cadenas de sentido negativo (complementarias con el ARNm) se transcriben directamente en ARNm, pero las cadenas de sentido positivo (homólogas al ARNm) deben sintetizarse en una cadena complementaria de ADN de sentido negativo, para transcribirse en el ARNm.

En el curso de la infección de los parvovirus aparece primero la síntesis de tres polipéptidos no estructurales requeridos para activar el promotor para la transcripción. Después aparece la síntesis de tres polipéptidos estructurales VP1, VP2 y VP3 (proteínas de la cápsida) que protegen el virus. Las secuencias de bases que codifican para cada uno de los tres polipéptidos se superponen una con otras (Jourdan, 1990).

Ensamblaje, maduración y salida de los virus

Los virus han desarrollado varias estrategias para su ensamblaje, maduración y salida de la célula. Los virus que no presentan envoltura como los densovirus se ensamblan y adquieren infectividad dentro de la célula y su salida depende en gran parte de la desintegración de las células infectadas.

1.3 EL VIRUS IHHN

El virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética fue descrito por primera vez en *Penaeus stylirostris* en Hawai (Lightner *et al.*, 1983a). El virus ha sido diseminado por todo el mundo mediante transferencias de camarones peneidos para cultivo y está asociado a elevadas pérdidas por mortalidad.

El IHHN es un virus sin envoltura, de forma icosaédrica, 22 nm de diámetro, y una densidad promedio de flotación de 1.40 g/ml en cloruro de cesio. El genoma tiene un ADN lineal monocatenario, cuyo tamaño estimado mediante microscopía electrónica de transmisión fue de 4.1 kb (Bonami *et al.*, 1990). En base a estas características se incluye (Bonami *et al.*, 1990) a la familia Parvoviridae.

1.3.1 DISTRIBUCION GEOGRÁFICA Y TRANSMISION.

El IHNV está tan extendido entre camarones peneidos en todo el mundo, que es difícil establecer un origen geográfico natural (Lightner *et al.*, 1990). Se presenta en el Sur-Este de Asia (Singapore, Malasia, Indonesia y las Filipinas) debido a que la sintomatología de IHNV se encontró en camarones *P. monodon* de esa región (Lightner, 1988). En un estudio de larvas, juveniles y adultos de camarones *P. stylirostris*, *P. vannamei* y *P. monodon* procedentes de Ecuador, Costa Rica, Panamá, Mexico, Texas y Florida se determinó que los animales portaban IHNV (Lightner *et al.*, 1983a, 1983b). Hoy en día se estima que IHNV se encuentra en EEUU (Florida, Texas y Hawai), en Sud América (Brasil, Venezuela, Ecuador, Perú,) en Centro América (Costa Rica, Panamá, México, Caribe) e Israel (Lightner *et al.*, 1990, Lightner y Redman, 1991a).

El período de incubación y la severidad de la enfermedad en la infección depende del tamaño, así los juveniles son los más afectados (Bell y Lightner 1987). En la transmisión de este virus es importante destacar que los sobrevivientes con IHNV de epidemias aparentemente tienen el virus durante toda la vida y es transmitido a la siguiente generación (vertical u horizontalmente) (Lightner, 1988). Estudios de infectividad sugieren que *P. stylirostris* es más susceptible a infectarse con IHNV que *P. vannamei*. (Bell y Lightner, 1983). Debido a que

diferentes especies de peces son sensibles al virus IHNV, se puede detectar camarones infectados por medio de infecciones experimentales.

1.3.2 SINTOMATOLOGIA Y MANIFESTACION GENERAL

El virus IHNV se manifiesta en camarones *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris* por signos clínicos que incluye cambios morfológicos y cambios de comportamiento. Entre los cambios morfológicos se presenta crecimiento reducido (enanismo), debilidad general en el animal, acompañado de una serie de deformaciones en la cutícula que afectan el rostro (doblado), antenas (partidas), apéndices y otras áreas abdominales y del exoesqueleto. Además cambios en su coloración natural adquiriendo manchas blancas o café en la epidermis, especialmente en la unión de los segmentos abdominales, mientras que los moribundos *P. stylirostris* obtienen opacidad en la musculatura abdominal y una coloración azulada (Lightner *et al.*, 1983a, 1983b). (Lightner *et al.*, 1992). En cuanto a su comportamiento se observa una baja actividad en el consumo de alimento y comportamiento natatorio errático (Lightner *et al.*, 1992). Se demostró en *P. stylirostris* que individuos de PL-35 o mayores infectados con IHNV suben lentamente hacia la superficie de la columna de agua, donde dejan de nadar y posteriormente descienden lentamente con un nado circular hacia el fondo repitiendo el proceso por varias horas antes de morir o ser canibalizados por los animales en mejor estado.

1.3.3 METODOS DE DIAGNOSTICO DE IHNV Y ALTERNATIVAS POSIBLES.

Para el diagnóstico del IHNV las observaciones de los síntomas externos no son confiables. Hasta el momento está basado en la histología por microscopía de luz, la observación de las partículas virales al microscopio electrónico de transmisión, la reproducción de los síntomas en condiciones experimentales y muy recientemente por medio de las sondas moleculares.

Para la histología fotónica son fijadas en solución de Davidson AFA (anexo 2.1) y teñidas con hematoxilina y eosina. El examen histológico se realiza mediante la observación de los cuerpos de inclusión prominentes de tipo Cowdry A (1934), que se localizan en los núcleos hipertrofiados, los cuales son eosinófilos (Lightner *et al.*, 1983b), presentan cromatina marginada (Lightner *et al.*, 1992) y una reacción débil de Feulgen positiva en el nucleoplasma (Mari *et al.*, 1993). Los principales tejidos infectados son de origen ectodérmico (epidermis, epitelio del intestino anterior y posterior, cordón y ganglio nervioso) y de origen mesodérmico (órganos hematopoyéticos, glándula antenal, gónadas, órgano linfoide, tejido conectivo y músculo estriado) (Lightner, 1992). Los reproductores *P. vannamei* y *P. stylirostris* también pueden ser examinados haciendo una biopsia no destructiva (Brock *et al.*, 1988) de un apéndice (el segundo o tercer maxilípodo) y observando el nervio mediante histología (Bell y Lightner, 1988). En el estadio larvario de Mysis o en los

primeros estadios de post-larva, se pueden encontrar inclusiones de tipo Cowdry A (1934) en el epitelio del intestino medio (Lightner, *et al.* 1988). Esta forma de diagnóstico es tediosa, tardándose en obtener resultados de 48 a 72 horas. Además puede dar lugar a errores. La ausencia de cuerpos de inclusión no es excluyente de la presencia del virus, que puede sin embargo replicarse rápidamente en una situación de estrés para el animal. Así en ocasiones, los cuerpos de inclusión se han considerado como un marcador los cuales podrían ser solamente testigos de la presencia de otras enfermedades.

El microscopio electrónico de transmisión, es un método confiable, para visualizar partículas virales en secciones u homogeneizados. La muestra homogeneizada es sometida a clarificaciones, sedimentación y tinción negativa con ácido fosfotúngstico para observar al microscopio electrónico. Es un procedimiento muy útil a nivel de investigación, pero no se puede aplicar para efectuar un reconocimiento de rutina ya que el costo de este equipo es excesivo para un servicio de diagnóstico.

Otro procedimiento para detectar la presencia del virus en muestras es mediante la inducción de la enfermedad en condiciones experimentales. Antes de iniciar la experimentación, se mantienen a los individuos bajo condiciones de estrés en pequeños tanques durante 10 a 30 días. Se eligen post-larvas (PL 14) o juveniles *Penaeus stylirostris* libres del

virus IHNV, especialmente susceptibles a este virus (Bell y Lightner, 1988). Se efectúa la transmisión de la enfermedad (infección experimental) depositando las post-larvas *P. stylirostris* en varios acuarios a fin que se alimenten con los cefalotórax triturados de los camarones analizados (Lightner *et al.*, 1988). Luego que el virus se replica, se observa sintomatología a partir de los 15-30 días. (Lightner, 1992). Otra manera es inyectando intramuscularmente un clarificado (una muestra de camarones infectados es homogencizado en suero fisiológico y centrifugado a 2000 g por 20 min) entre el segundo y tercer par de segmentos abdominales a juveniles de camarones peneidos. En estos casos los síntomas se observan a los 5-15 días (Lightner *et al.*, 1992). Estos estudios indican que los bioensayos por infección oral son más sensitivos que los bioensayos por inyección intramuscular debido a que el virus pasa por el tubo digestivo, a la hemolinfa y los tejidos blandos (Lightner *et al.*, 1983b, Lightner 1988, Bonami *et al.*, 1990).

Muy recientemente se ha desarrollado una técnica de tipo dot blot con sonda nucleica para detectar el IHNV, "Dot Blot para Detección del IHNV" la cual se realiza mediante la detección de su ADN viral (IHNV ShrimProbe de DiagXotics, Inc.) (Lightner *et al.*, 1993) (anexo 1). El ADN viral se hibridiza con la sonda, complementaria a ciertas secuencias del virus IHNV y se presenta con un grupo reportero conocido como digoxigenina, se adicionan anti digoxigeninas conjugadas con alcalina fosfatasa

AP) que se fijan al grupo reportero. Se detecta en base a la reacción entre AP y un substrato cromógeno (NBT, X-Fosfato), adquiriendo una coloración proporcional a la cantidad de ADN viral. Permite una detección rápida del virus, efectuándose operaciones con menor costo, pero experimentaciones son necesarias para evaluar la sensibilidad y la especificidad.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1 Material Biológico.

2.1.1 Juveniles *Penaeus vannamei*.

Los camarones *Penaeus vannamei* utilizados para este estudio provinieron de la camaronera "Zamzotera" ubicada en El Morro, Data de Posorja. Se realizó un muestreo en dos piscinas y se eligieron, 75 juveniles con pesos comprendidos entre 2 a 2.5g. Estos animales presentaban una mortalidad del 40%, deformaciones en el rostro (doblado) y antenas (partidas), poco crecimiento (enanismo) y demostrando por lo común debilidad y opacidad en el abdomen. Se escogió de cada piscina dos animales con los síntomas mencionados para realizar fijación en Davidson (Anexo 1.1) y el proceso normal de histología (Bell y Lightner, 1988). Las secciones de tejidos teñidas con hematoxilina y eosina demostraron cuerpos de inclusión eosinófilos, núcleos hipertrofiados y cromatinas marginadas. Había en el viroplasma una reacción iónica con tendencia para teñirse con eosina. Los cuerpos de inclusión eosinófilos se definieron de Tipo Cowdry A (1934) (Lightner *et al.*, 1983 b) ubicados en branquias y tejido hematopoyético.

Los camarones enfermos se transportaron vivos al laboratorio de infección experimental del CENAIM. Se los colocó en tanques circulares de 500 litros con agua de mar filtrada por arena, esterilizada con UV, con un flujo continuo que proporcionaba 200% diario de recambio superficial y aireación constante. Se mantenían los siguientes parámetros: 24-26°C, pH 7.4-7.8 y salinidad 34 ppt. Se alimentó con dieta artificial preparada en CENAIM al 6% diario de la biomasa. Se tomó una muestra de los camarones enfermos y se los guardó a -80°C.

2.1.2 Post-larvas *Penaeus stylirostris*.

Para los bioensayos se trabajó con 2000 larvas *Penaeus stylirostris* de 0.03 gr (Post larva 15) en aparente buen estado de salud (fueron donadas por el Laboratorio Ecuatex ubicado en San Pablo, Santa Elena). Las larvas se colocaron en un tanque de 500 litros con agua de mar filtrada en arena y esterilizada por UV, con un recambio del 90% diario. Los parámetros fueron los siguientes: temperatura $\pm 28^{\circ}\text{C}$, pH entre 7-7.8 y salinidad 34 ppt. Se alimentó con dieta artificial al 20% diario de la biomasa. Se escogió una muestra de post-larvas para realizar fijación en Davidson durante 48 horas. Los animales estaban inducidos a condiciones de estrés antes de la infección.

2.2. Mantenimiento de los animales en bioensayos de infección experimental.

Experimento 1: Infección oral. PL 20 d=2.5 PL/L.

Experimento 2: Infección por inyección. Juveniles d=0.75 PL/L.

Se dispuso de acuarios de 50 litros provistos de una entrada de agua de mar filtrada previamente con arena y UV, con aireación y con un sifón de recambio que correspondía al 90% diario. Los desechos orgánicos fueron removidos dos veces por semana. Se mantuvo los siguientes parámetros: temperatura—26-28°C, salinidad 34 ppt, pH 7.4-7.8. El sistema consistió en colocar post-larvas *Penaeus stylirostris* y camarones *Penaeus vannamei*.

2.3. Histopatología

A. Fijación

Los camarones *Penaeus vannamei* enfermos fueron fijados con inyección de Davidson (Anexo 1.1) durante 48 horas, y las post-larvas *Penaeus stylirostris* sanas fueron sumergidas durante 24 horas en solución de Davidson (Bell y Lightner, 1988). La técnica consistió en inyectar el hepatopáncreas de los camarones con 0.2-0.4 ml del fijador, luego disectar a lo largo de la línea media dorsal con un bisturí y finalmente sumergirlos en el fijador por 24-48 horas. Las muestras se colocaron en alcohol etílico al 50%.

B. Deshidratación.

Las muestras se deshidrataron paulatinamente mediante baños en alcohol etílico de grado ascendente. Para las muestras pequeñas se realizaron baños sucesivos de 30 min en alcohol de 80%, 90%, 95% y 100% (3 baños c/u), mientras que en muestras grandes se realizaron baños sucesivos de una hora en alcohol de 80%, 90%, 95% y 100% (3 baños c/u).

C. Inclusión en parafina.

Según el tamaño de la muestra, se realizó uno o dos baños en Xilol por una hora para eliminar el alcohol de los tejidos. Luego se sumergió en 3 baños sucesivos de una hora de parafina a 63-64°C. Finalmente se incluyeron las muestras en bloques de parafina.

D. Corte.

Se hicieron cortes de 5-6 μm y se fijaron las placas para posterior tinción. Para extender los cortes se los dispuso en agua a 30-32°C. Sobre una placa portacobjetos (24 x 36 mm) se montaron los cortes y se dejaron reposar sobre una plancha caliente (35-40°C) durante una noche para que se adhiriera el tejido y se derrita la parafina.

E. Desparafinado

Se sumergió la placa en tres baños sucesivos de Xilol por 5 min c/u. Aquí se eliminó la parafina de la placa y del corte.

F. Rehidratación y Tinción

Para la rehidratación los tejidos se sumergieron en baños sucesivos de 3 min c/u en alcohol en concentración: 100% (dos baños), 90%, 50%, y agua destilada. Los tejidos se trataron de la siguiente manera para la tinción:

Tinción de hematoxilina y eosina:

- 1.- Teñir las placas en hematoxilina durante 5-20 minutos.
- 2.- Enjuagar con agua de la llave durante 5-20 minutos.
- 3.- Sumergir en agua destilada.
- 4.- Teñir con eosina durante 6 min
- 5.- Lavar con agua destilada.

Tinción para feulgen:

- 1.- Colocar en ácido hidroclicórico (5N) durante una hora.
- 2.- Teñir con reactivo de schiff (Anexo 1.5) por 45 min.
- 3.- Lavar con sodio bisulfito (Anexo 1.6) (3 veces, 75 seg).
- 4.- Lavar en agua por 5 min.
- 5.- Teñir en solución de tinción verde (Anexo 1.7)

G. Deshidratación.

Para la conservación de los cortes fue necesario deshidratar los cortes con el siguiente proceso:

- 1.- Baños sucesivos de 1 min en alcohol de 70%, 90% y 100% (3 c/u).
- 2.- Dos baños en Xilol por 5 min c/u, para eliminar el alcohol.

H. Observación.

Para preservar el corte se colocó una gota de Entellán ® o Permount ®, sobre el tejido y se cubrió con una lámina cubreobjeto hasta secar. Se observó al microscopio con el lente de inmersión a un aumento de 400X o 1000X y se buscó cuerpos de inclusión en los tejidos susceptibles de ser infectados.

2.4 Ultracentrifugación y análisis espectrofotométrico

Ultracentrifugaciones fueron realizadas con un rotor RPS-65 tipo "ángulo fijado" o un rotor SPS-27-9-tipo "balanceo". Los análisis espectrofotométricos fueron realizados a 254 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-210A. El índice de refracción fue estimado con un refractómetro Attago tipo ABBE. Las fracciones fueron dializadas por 48 horas con suero fisiológico (0.9% NaCl) en membranas de diálisis, y mantenidas durante 48 horas a -20°C para el cálculo de la densidad.

2.5 Microscopía electrónica de transmisión.

Se tomaron muestras de sedimento y de fracciones de la ultracentrifugación, las muestras se observaron al microscopio electrónico de transmisión (JEOL100 C) Japanese Electrical Optical Lens, mediante una tinción negativa al ácido fosfotungsténico (APT) (2% en agua destilada pH 6.2). Se colocó una reja (grid) de cobre de 400 campos cubierta con formvar al 0.7%, sobre una gota de muestra diluída en ácido fosfotungsténico y se la dejó 5-10 min para que las partículas se absorban. El aumento en las observaciones al

microscopio electrónico de transmisión eran del orden de 57.000 hasta 22.500 magnificaciones.

1.6 Diagnóstico de IHNV por sonda nucleica

El uso del kit para la detección de IHNV (Dot Blot), (IHNV ShrimProbe, comercializada por Diagxotics, Inc.) (Lightner *et al.*, 1993) (Anexo 2) fue utilizado.

A. Preparación de la muestra: desnaturalización y fijación.

Se utilizó como muestras:

- La fracciones obtenidas de las ultracentrifugaciones.
- Post-larvas infectadas experimentalmente *per os*.
- Un control con muestras positivas y negativas.

Las muestras fueron homogeneizadas con un tampón PBS (Anexo 1.3), y se las desnaturalizó por 10 min. Se colocó una porción en una membrana de nailon, e incubó a 80°C por una hora (Anexo 2.1). Se aumentó un tampón para prehibridación (separa el ADN de la muestra) e incubó a 65° C por 15 min.

B. Desnaturalización de la sonda.

Se desnaturaliza la sonda para IHNV (IHNV DiagXotics ShrimProbe, Inc), por 10 min.

C. Hibridación y lavado

Se colocan 2 ml de la sonda sobre las muestras desnaturalizadas. Se incuban por 3 horas a 65°C y se colocan dos soluciones de lavado, solución 1: se incuba a temperatura ambiente por 5 min y solución 2:

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Aislamiento del virus IHNV.

El aislamiento del virus fue realizado a partir de aproximadamente 100 post-larvas *Penaeus stylirostris* infectadas experimentalmente *per os* con camarones juveniles que presentaban síntomas de IHNV. Estas post-larvas fueron maceradas con el uso de un Ultra-Turrax en tampón TN (0.02 M Tris-HCl, 0.4 M NaCl pH 7.4.). A continuación, el homogeneizado fue clarificado (15000 rpm, 30 minutos) y el sobrenadante depositado sobre una solución de sacarosa 20%. Una ultracentrifugación (150.000 g, 19 horas) permitiría sedimentar las partículas de IHNV si estuvieran presentes en la muestra, y, simultáneamente, eliminar los elementos más pequeños en el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en tampón TN (Anexo 1.4) y observado al microscopio electrónico con coloración negativa. Un gran número de partículas virales fue observado, lo que permitió continuar con la purificación. Esta suspensión fue depositada sobre un gradiente continuo de cloruro de cesio al 25%-45%. Una ultracentrifugación isopícnica (80.000 g, 22 horas) fue realizada a fin de obtener las partículas virales concentradas en una banda en función a su densidad, de aproximadamente 1.40 g/ml. La totalidad del gradiente fue recolectado en 33 fracciones de 1 ml cada una. Cada fracción fue analizada mediante espectrofotometría a longitud de onda

correspondiente al pico de absorbancia (260 nm) de los ácidos nucleicos, lo que permite determinar las fracciones que contienen ácidos nucleicos y por consiguiente, partículas virales. Los resultados de absorbancia y densidad son mostrados en la Figura 4.

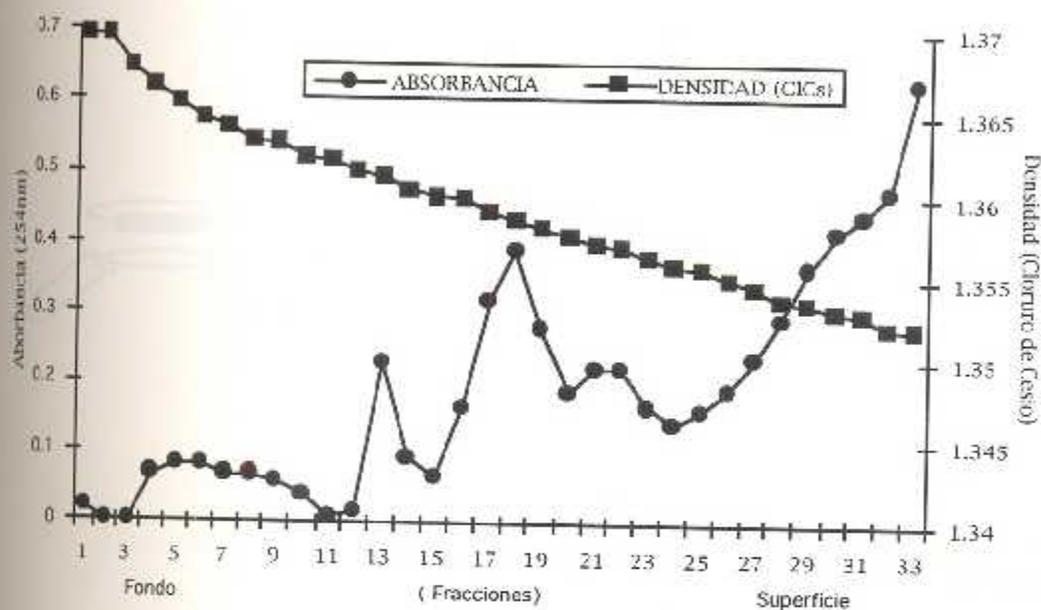


FIGURA 4. Equilibrio de las fracciones de la ultraentrifugación en cloruro de cesio. La absorbancia es medida a 254 nm.

Las fracciones 17, 18 y 19 corresponden a un pico de absorbancia a 254 nm y a una densidad cerca de 1.36 g/ml. Este valor de densidad es un poco bajo para partículas intactas de IHHNV, pero puede corresponder a partículas víricas vacías. En esta situación, el pico de absorbancia a 254 nm podría corresponder más a la absorbancia de las proteínas de la cápsida que a los ácidos nucleicos genómicos. Después de una diálisis de 48 horas frente a una solución de TN, seguida de una coloración negativa, fue posible examinar esta fracción con microscopía electrónica y reconocer partículas de aproximadamente 25 nm. La pobre calidad del microscopio no

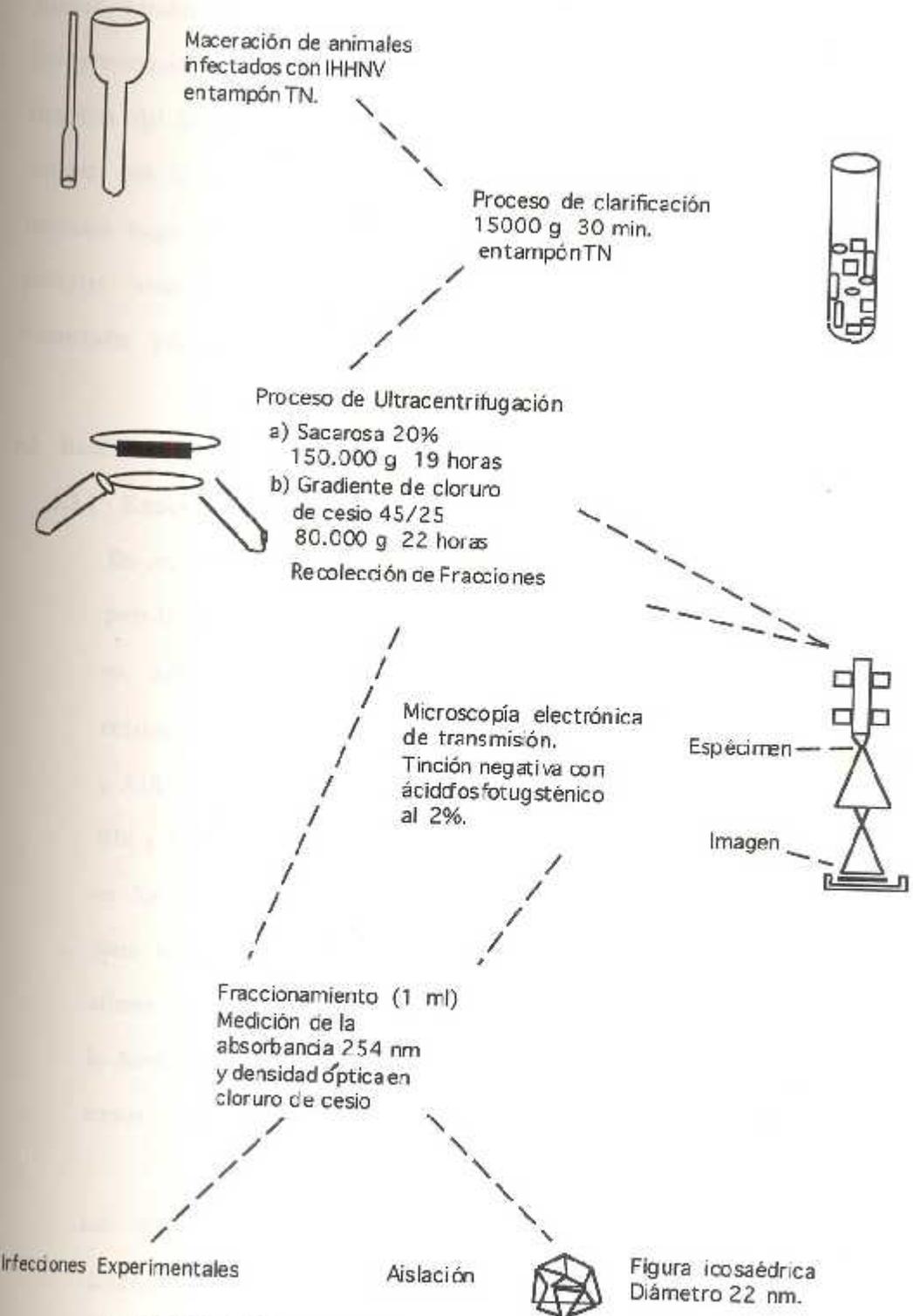


FIG. 5. PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DEL VIRUS IHHNV.

permitió garantizar la naturaleza particular de los elementos observados. Esta preparación fue analizada con una sonda nucleica comercial, específica del IHNV (kit, ver Materiales y Métodos) sin que se observase reacción con la muestra correspondiente a las bandas 17, 18 y 19. Estos resultados negativos podrían sugerir que si los elementos observados son partículas virales, están en su mayoría vacías o no suficientemente concentradas para dar una reacción positiva.

3.2 Desarrollo de protocolos de infección experimental

3.2.1 Experimentación 1. Protocolo de infección *per os*

En una primera experimentación, la infección experimental de post-larvas (PL-20) de *Penaeus stylirostris* fue emprendida *per os*, aplicando durante 12 días un alimento compuesto de cefalotórax de *Penaeus vannamei* infectados. En los acuarios A1a y A1b se suministró alimento infectado fresco, en los acuarios B1a y B1b alimento infectado previamente congelado a -80°C y en los acuarios C1a y C1b, que correspondieron a los controles, dieta artificial. A partir del día 13, todos los animales fueron alimentados con alimento balanceado, correspondiente al 10% de la biomasa, dos veces al día, hasta el día 16 en que finalizó la experimentación.

Los días 7, 11 y 13 *p.i* se tomaron muestras de animales (2/acuario) para observación histológica y durante todo el experimento también se recogieron para histología aquellos animales moribundos o con sintomatología.

Después de 16 días los acuarios controles presentaron una supervivencia final del 70%, una supervivencia media de 69% y una desviación estándar de 1.0. No se observaron diferencias en cuanto a la supervivencia final en las infecciones con animales infectados frescos (grupo A) o congelados (grupo B), que fue del 43%. La supervivencia media en el grupo A1 fue 44% mientras que en el grupo B1 fue 42.5% , con una desviación estándar de 4.0 y 2.5 respectivamente, existiendo diferencia significativa ($\alpha=0.05$). (Anexo 3). En ambos casos se encontraron lesiones histopatológicas similares, lo que sugiere que la congelación no alteró el poder infectante del agente.

Signos clínicos

Las post-larvas en contacto con alimento infectado presentaron un alto índice de canibalismo durante los primeros cuatro días *p.i.* sin presentar signos o sintomatología general de IHHNV. En la siguiente semana, presentaron una reducción marcada en el consumo de alimento y algunas post-larvas cambiaron su comportamiento natatorio. Las larvas afectadas nadaban hacia la superficie, donde permanecían flotando para descender a continuación trazando círculos, repitiendo este comportamiento hasta morir por agotamiento o canibalizados por las larvas en mejor estado.

Se observaron cambios en su coloración natural. En un principio los animales adquirían una coloración azulada y a

medida que la infección avanzaba, presentaban opacidad de la musculatura abdominal y focos necróticos en la epidermis. Estos signos fueron similares a los descritos por otros autores en infecciones experimentales con IHNV (Brock, 1986, Bell y Lightner, 1983, 1987, Bonami *et al.*, 1990, Lightner *et al.*, 1983b, 1988, 1990, 1992), lo que sugiere que en esta experimentación se consiguió una reproducción de la infección.

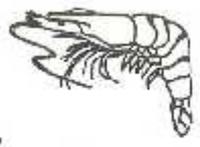
Las post larvas del grupo control se presentaron activos alimentándose normalmente.

Análisis histológicos

Las post-larvas *Penaeus stylirostris* de los acuarios infectados con IHNV por vía oral demostraron ser positivos para IHNV por histología a partir del día décimo, ya que se encontró una presencia elevada de cuerpos de inclusión eosinófilos de tipo Cowdry A (1934) especialmente en células de branquias, tejido hematopoyético, y en células de la glándula antenal (Anexo 4). Por su parte Lightner (Lightner *et al.*, 1992) asevera que si la infección por vía oral ha sido positiva puede detectar el virus entre los 15 a 30 días después de la infección.

Las post-larvas del grupo control de esta primera experimentación por vía oral se encontraron libres de infección por el virus.

Muestreo de camarones *P. vannamei* con altas mortalidades, enanismo y deformaciones cuticulares.



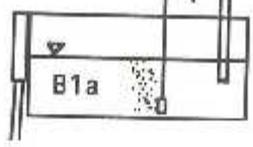
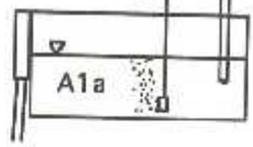
Diagnóstico por Histología de H&E (o por Sondas Nucleicas)



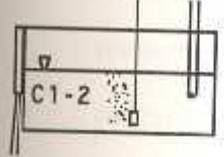
Camarones se mantienen en condiciones estresantes durante 10-30 días



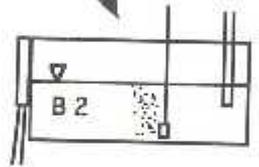
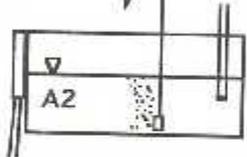
Preservación de animales a -80°C



Experimentación 1. *P. stylirostris* infectados *per os*



Lote de *P. stylirostris* libres de IHNV (control).



Experimentación 2. *P. stylirostris* infectados por inyección intramuscular

Diagnóstico

Histología

Sondas nucleicas

FIG. 6. PROTOCOLO DE INFECCION EXPERIMENTAL DEL VIRUS IHNV

Microscopía Electrónica

A partir de estas post-larvas infectadas *per os* fue realizado el protocolo de purificación previamente descrito y se realizaron observaciones al MET que permitieron observar imágenes que podrían corresponder a partículas virales.

Experimento 2. Infección por inyección.

Este experimento tuvo por objeto infectar juveniles *Penaeus stylirostris* por medio de inyección de una suspensión susceptible de contener partículas virales. Esta suspensión correspondió a el sobrenadante obtenido después de las centrifugaciones de clarificación viral (ver protocolo de aislamiento). El sobrenadante provenía de los dos grupos (A1a y B1a) de animales infectados del experimento 1, correspondientes respectivamente a animales infectados con muestras frescas o congeladas. Un volumen de 30 μ l de sobrenadante fue inyectado entre el segundo y tercer terguitos abdominales.

El experimento 2 se realizó en tres acuarios de 20 litros (A2, B2 y C2) con 15 juveniles cada uno (0.75 juveniles/l) y una réplica. En los acuarios A2 y B2, los juveniles fueron inyectados con los sobrenadantes provenientes de las muestras A1a y B1a respectivamente. Los juveniles del grupo control fueron inyectados similarmente con 30 μ l de una solución fisiológica.

La duración del experimento en este caso fue de 12 días, momento en que la supervivencia final en el acuario de control fue del 60% con una supervivencia media de 59% y una desviación estándar de 1.0. En los grupos infectados A2 y B2 la supervivencia final fue del 39% (Anexo 3). Así la supervivencia media en el grupo A2 fue 39.5%, mientras que en el grupo B2 fue 38% con una desviación estándar de 1.5 y 2.0 respectivamente, existiendo diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Los juveniles fueron congelados a -80°C como recurso para el aislamiento del virus.

Signos clínicos

En los cuatro primeros días se encontró poca actividad. Los animales nadaban lentamente tornándose blancos con manchas negras y café (posiblemente causado por la alta toxicidad del tampón TN). Existió un alto grado de canibalismo.

En los siguientes ocho días, los animales mostraron cierto aletargamiento, con movimientos lentos descendiendo por la columna de agua y permaneciendo en el fondo del acuario, acompañado de una disminución en el consumo de alimento.

Los juveniles del acuario de control se presentaron activos alimentándose normalmente.

Los signos clínicos fueron similares a los descritos anteriormente y a los observados en el primer experimento, aunque no fueron tan evidentes como en post-larvas.

Análisis histológico

Los juveniles *Penaeus stylirostris* inyectados con muestras susceptibles de contener IHNV demostraron ser positivos a partir del día octavo, ya que se observaron cuerpos de inclusión eosinófilos de tipo Cowdry A (1934) en células de tejido hematopoyético y tejido nervioso.

Estos resultados muestran que se consiguió una reducción en el periodo necesario para reconocer el efecto citopático del virus cuando las infecciones se realizaron por vía parenteral (8 días hasta la observación de las primeras lesiones) en lugar de por vía oral (10 días).

Este efecto de la ruta de infección en la cinética de la infección concuerda con las observaciones de Lightner (Lightner *et al.*, 1992).

Microscopía Electrónica

Una muestra correspondiente a un juvenil infectado por inyección fue enviada al Dr. Teruo Miyasaki para análisis mediante microscopía electrónica. Imágenes características de células infectadas con IHNV y partículas virales fueron reconocidas, verificando así las infecciones (Anexo 4).

CONCLUSIONES Y DISCUSIONES

El virus IHNV es uno de los mayores problemas para la acuicultura de peneidos en Ecuador y en otros países. Debido a que no es posible practicar inmunizaciones específicas en invertebrados y que los tratamientos de infecciones virales son prácticamente imposibles, solamente dos estrategias merecen ser exploradas para la prevención y control de las enfermedades virales. Esta estrategia corresponde al desarrollo de pruebas de diagnóstico con sondas moleculares y a la selección de cepas resistentes mediante la genética. En ambas situaciones parece primordial tener la habilidad de purificar el virus y reproducir experimentalmente la infección. En efecto, la preparación de sondas moleculares, nucleicas o anticuerpos, depende casi obligatoriamente de la disponibilidad de virus purificados. Después, el desarrollo de pruebas de diagnóstico con estas sondas moleculares es mucho más fácil si es posible reproducir la infección para determinar exactamente la sensibilidad de la prueba y la intensidad de las señales en relación con el nivel de la infección.

Por otra parte, la selección de cepas resistentes es también estrechamente dependiente de la disponibilidad de virus purificado y de un protocolo de infección. De hecho, para la identificación de animales resistentes se precisa realizar infecciones muy controladas en términos de cantidad de virus introducidos y de modalidad de introducción. Estos parámetros técnicos son suficientes en la estrategia de selección genética clásica, mientras que la selección por transformación genética implica también conocer o tener información sobre el genoma del virus.

Estas motivaciones fueron el origen de este trabajo que fue iniciado en un contexto tecnológico difícil debido a la carencia en CENAIM del equipo necesario, a saber, un microscopio electrónico y una ultracentrífuga con los rotores convenientes.

Una alternativa consistió en realizar una parte de experimentación en CENAIM y la otra parte en Guayaquil en el Instituto Nacional de Higiene.

En lo que concierne a los intentos de purificación, los resultados deben ser interpretados con precaución. La baja calidad del microscopio electrónico no permitió obtener imágenes claras de los elementos correspondientes al máximo de absorción a 254 nm y a una densidad de 1.36 g/ml. Parece muy probable que estos elementos correspondan a cápsidas vacías de IHNV, estando la absorbancia relacionada con las proteínas de la cápsida. Otras operaciones de purificación serán necesarias con el fin de practicar correctamente los protocolos de purificación establecidos en otros países (referencia de Lightner, Bonami). En la práctica, será conveniente esperar a tener el equipo en CENAIM y tener un protocolo de reproducción de la infección con IHNV.

El desarrollo en el CENAIM de protocolos de infecciones experimentales fue facilitado por las referencias existentes en el tópico. Para los dos tipos de vías de infección, *per os* y por inoculación, se encontraron diferencias significativas ($\alpha=0.05$), los resultados entre los experimentos son iguales, pero son diferentes con respecto al control. Se observaron además signos y

síntomas clínicos y subsecuentemente efectos citopáticos y partículas virales en las células al microscopio electrónico.

Esta relativa facilidad de infectar puede estar relacionada con las infecciones espontáneas de animales control observadas en una tercera experimentación no presentada en este documento. Es importante recordar la extrema patogenicidad del virus IHNV en las piscinas camaroneras.

Sobre la base de estos resultados, parece realista continuar en el CENAIM este proyecto de investigación sobre el IHNV.

RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta la importancia de las enfermedades virales en detrimento de la producción camaronera, el desarrollo de investigaciones y el establecimiento de modelos de estudio de virus, IHNV y otros, parece una prioridad para el CENAIM en colaboración con otros equipos de virologos de camarón. Debido a la estrecha relación entre virus de camarón y virus de insecto, será muy ventajosa organizar conexiones con entomólogos especializados en virología, porque son mucho más numerosos y su conocimiento está más avanzado.

El desarrollo de la virología de camarón en Ecuador implica la adquisición e instalación rápidas en el CENAIM del equipo adecuado (microscopio electrónico y ultracentrífuga). Además, el entrenamiento de personal en las técnicas de microscopía electrónica debe ser considerada inmediatamente, en particular a través de interacciones con especialistas de la región.

Debido a su carácter aplicado a corto plazo para la camaronicultura, la investigación deberá estar enfocada a el desarrollo de sondas moleculares específicas y a la evaluación de sondas moleculares heterólogas. Será también necesario desarrollar pruebas más sensibles y más fáciles de utilizar que el ensayo de tipo dot-blot actualmente comercializado, por ejemplo, PCR con iniciadores correspondiente a secuencias consensus o inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales.

Considerando la relación entre el virus IHNV y los densovirus de insectos dentro de la familia Parvoviridae, parece importante estudiar su genoma para identificar promotores y secuencias terminales que podrían ser muy útiles en las investigaciones sobre la transformación genética, particularmente con la perspectiva de controlar la integración de secuencias exógenas dentro de los cromosomas del camarón. El estudio del genoma del IHNV sería también importante para caracterizar los genes de la cápsida y los genes no estructurales, respectivamente candidatos para seleccionar cepas de camarón resistentes a virus mediante la expresión de proteínas de cápsida o de secuencias antisentido.

ANEXOS

ANEXO 1

REACTIVOS**1.1. Fijador de Davidson AFA**

Etanol al 95%.....100 ml
 Formalina al 10%.....200 ml
 Acido acético.....100 ml
 Agua destilada.....300 ml

1.2 Hematoxilina (1 L)

Hematoxilina.....1 gr
 Iodato de Sodio0.2 gr
 Alumbre de Potasio...50 gr
 Acido cítrico1 gr
 Hidrato de Coral50 gr

1.3. Phosphate Buffer Saline.

NaCl.....8.0 gr
 KH_2HPO_40.2 gr
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$2.9 gr
 Azida de Sodio.....0.2 gr

1.4. Tampón TN

Tris-HCl.....0.02 M
 NaCl.....0.4 M
 pH.....7.4

1.5 Reactivo de Schiff

Fusina básica.....1.0 g
 Acido normal hidroclicórico...20 ml
 Sodio metabisulfito.....1.0 g

1.6 Solución de tinción verde

Fast green.....0.1g
 Alcohol 95%.....100 ml

1.7. Sodio Bisulfito

1 M Sodio Bisulfito....10 ml
 agua destilada.....200 ml

ANEXO 2

TECNICA DE DETECCION POR DOT BLOTPreparación de la muestra

Para post-larvas, camarones adultos y pleópodos de reproductores: Retirar la cutícula y poner la muestra (en pedazos) en un microtubo, aumentar 250 μ l de PBS y macerarla. Hemolinfa: Colocar 50-100 ml de muestra de hemolinfa en un microtubo.

Desnaturalización: Hervir las muestras por 10 min (con el fin de separar las hebras de ADN).

Fijación: Colocar 1 μ l de cada muestra en un soporte o membrana de nailon. Depositar la membrana en un recipiente e incubar a 80°C por una hora.

Prehibridación.

Separación del ADN.- Introducir junto a la muestra una membrana de nailon con controles (+) y (-) para futura comparación y colocar el tampón de prehibridación. Incubar a 65°C por 15 minutos. Retirar.

Hibridación.

Desnaturalizar la sonda de IHNV.- Hervir la sonda de IHNV (IHNV ShrimProbe comercializado por Diagxotics, Inc) (Lightner *et al.*, 1993) por 10 min y colocar 2 ml a las muestra. Incubar a 65°C por 3 horas y retirar.

Lavado.- Depositar la Solución de Lavado 1 y distribuir, incubar a temperatura ambiente por 5 min, retirar y repetir el proceso. Colocar solución de lavado a 65°C por 15 minutos, repetir el proceso y retirar.

Bloqueo.

Aumentar 5 ml de Tampón A al recipiente. Sellar e incubar a temperatura ambiente por 5 min, retirar. Añadir 5 ml de un Tampón Bloquante. Sellar e incubar a temperatura ambiente por 30 min.

Detección con un tampón conjugado.

Depositar 5 ml de un tampón con un anticuerpo anti-digoxigenin conjugado con una enzima de alcalina fosfatasa (IHNV ShrimProbe

comercializado por Diagxotics, Inc), sellar e incubar a temperatura ambiente por 30 min, retirarlo.

Aumentar 5 ml de Tampón A e incubar a temperatura ambiente por 10 min, retirarlo y repetir el proceso. Depositar 5 ml de Tampón B e incubar a temperatura ambiente por 2 min, retirarlo.

Revelador.

Depositar 5 ml de solución de revelado, sellar y poner en la oscuridad. Chequear la membrana periódicamente ya que debe estar revelada totalmente en 2 horas. Detener la reacción colocando 5 ml de (buffer reductor background) e incubar durante 5 min a temperatura ambiente y retirar.

Interpretación.

Extraer la membrana de nailon del contenedor para secar. Comparar la membrana de la muestra con la de control. Color café morado (oscuro) significan presencia de ADN de IHHNV.

ANEXO 3

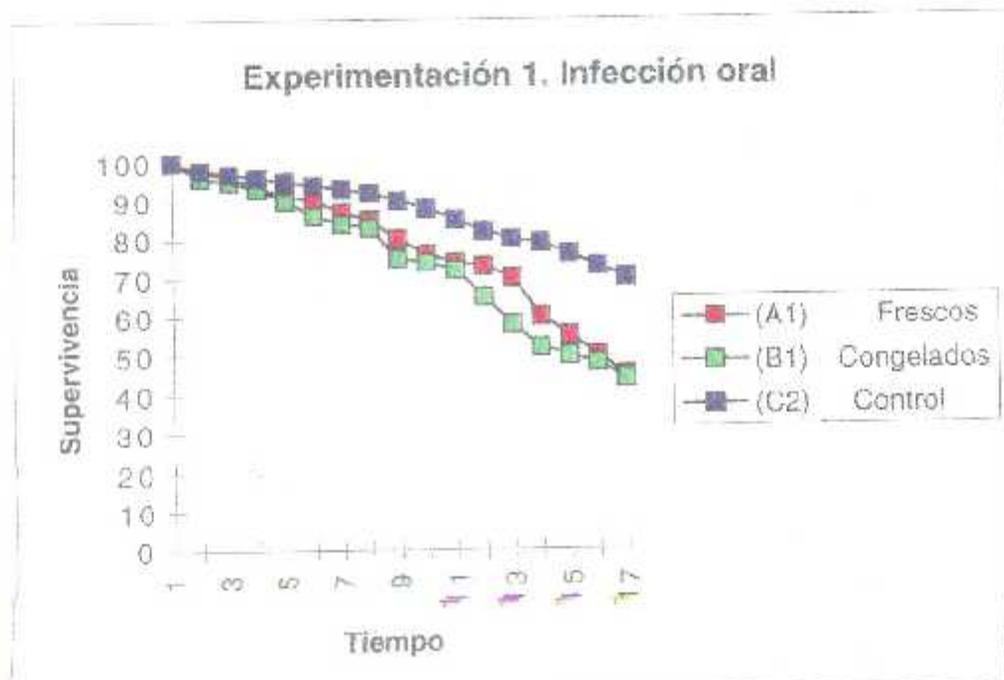


Gráfico 1.- Supervivencia de animales infectados vfa oral

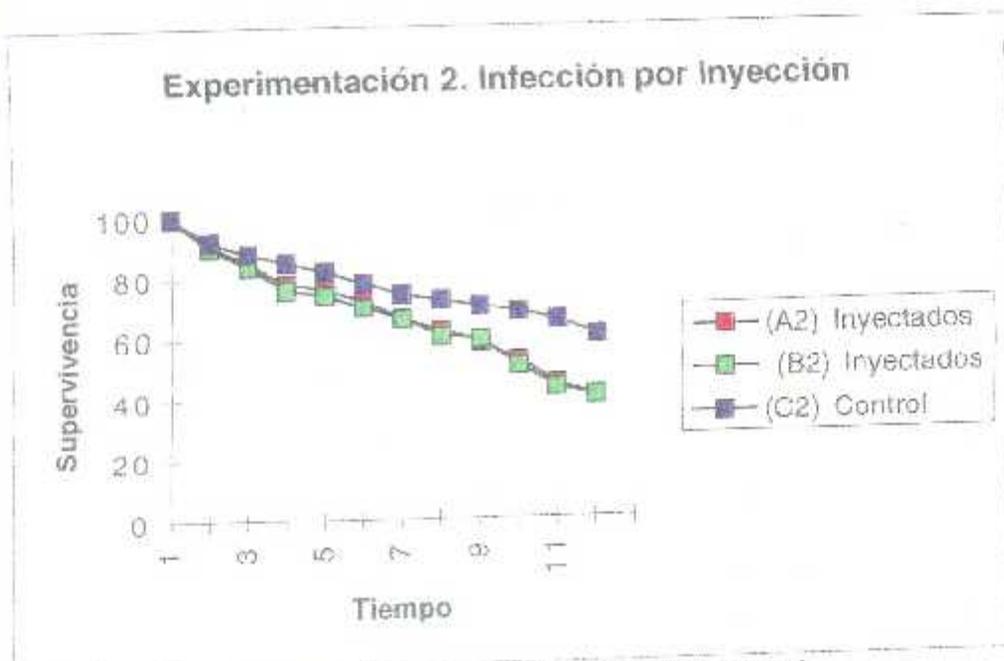


Gráfico 2.- Supervivencia de animales infectados vfa inyección

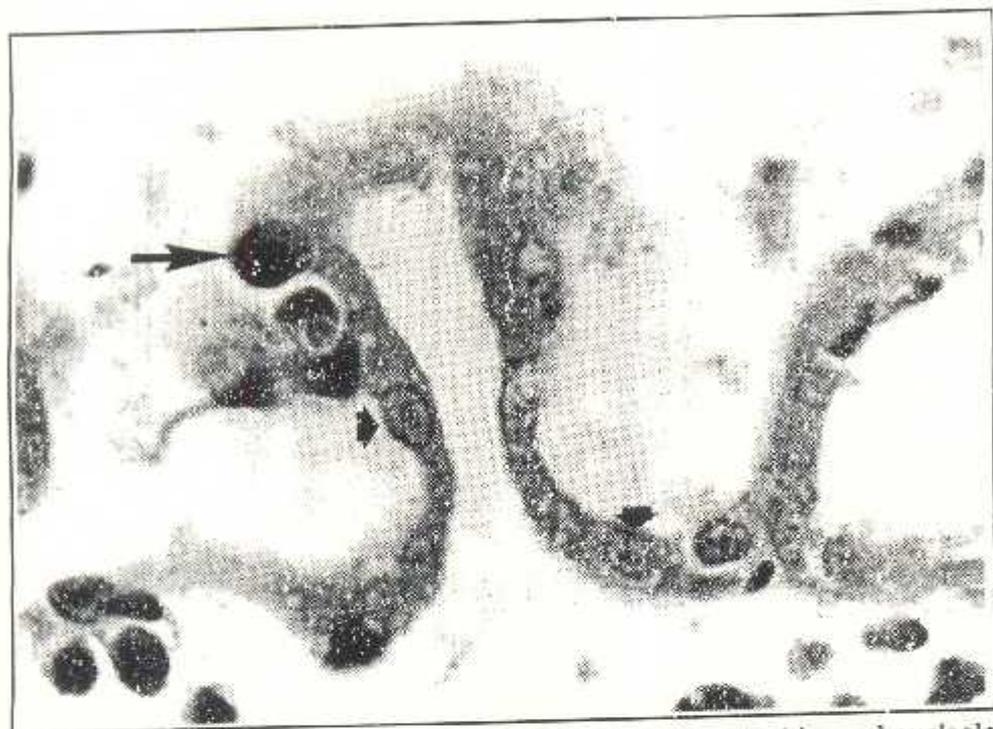


Foto 1.- Núcleo elongado conteniendo el material Feulgen positivo y el nucleolo destruido (flecha larga). El núcleo normal contiene partículas de cromatina y un nucleolo visible de Feulgen positivo (flechas cortas). Tinción de Feulgen X600.

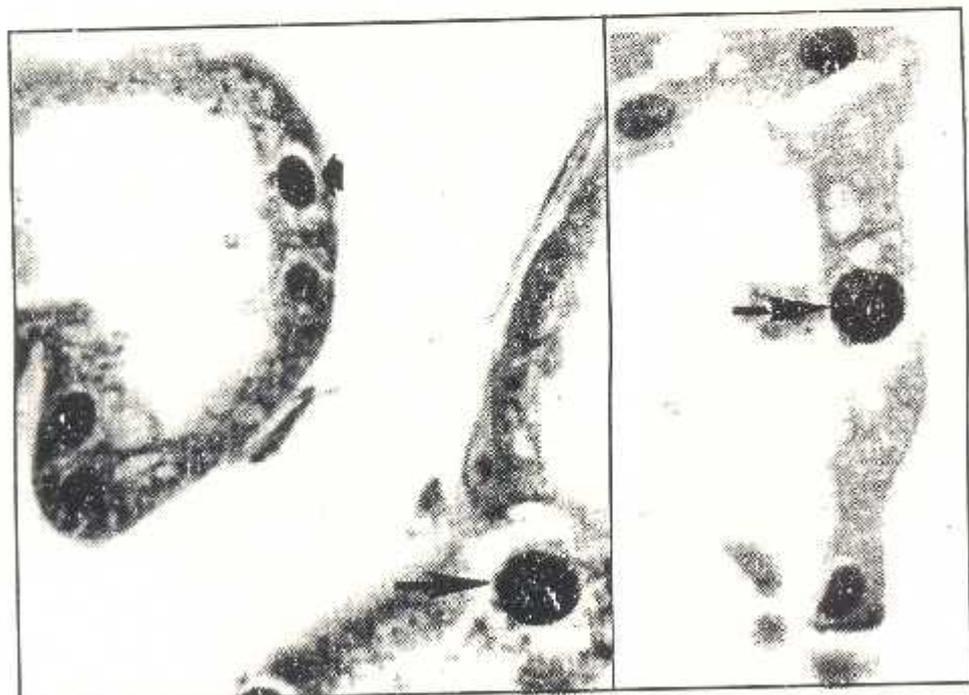


Foto 2.- (Izquierda) Núcleo reducido (flecha corta) y un núcleo con inclusiones de tipo Cowdry - A (flecha larga). Tinción de Feulgen X600. (Derecha) Núcleo con inclusiones típicas de tipo Cowdry - A (flecha larga). Tinción de Feulgen X 600.

ANEXO 5



Foto 3.- Células sanas del epitelio de las branquias. El núcleo tiene un nucleolo bien definido (n). MET X6000 (Cortesía del Dr. Teruo Miyasaki).

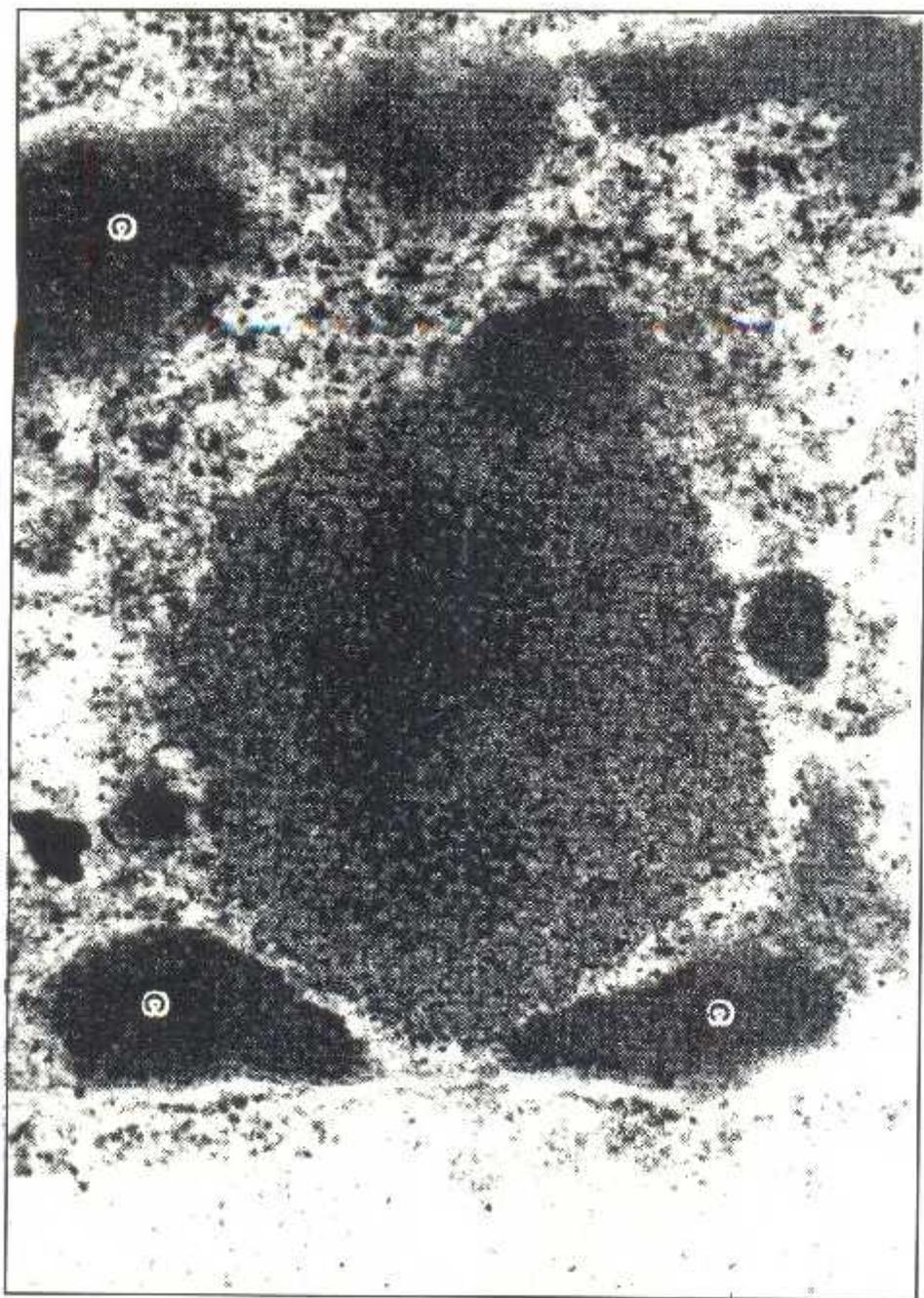


Foto 4.- Núcleo de fibra muscular presenta una matriz densa de electrones que contiene partículas virales. C: heterocromatina. MET X 40000 (Cortesía del Dr. Teruo Mlyasaki).

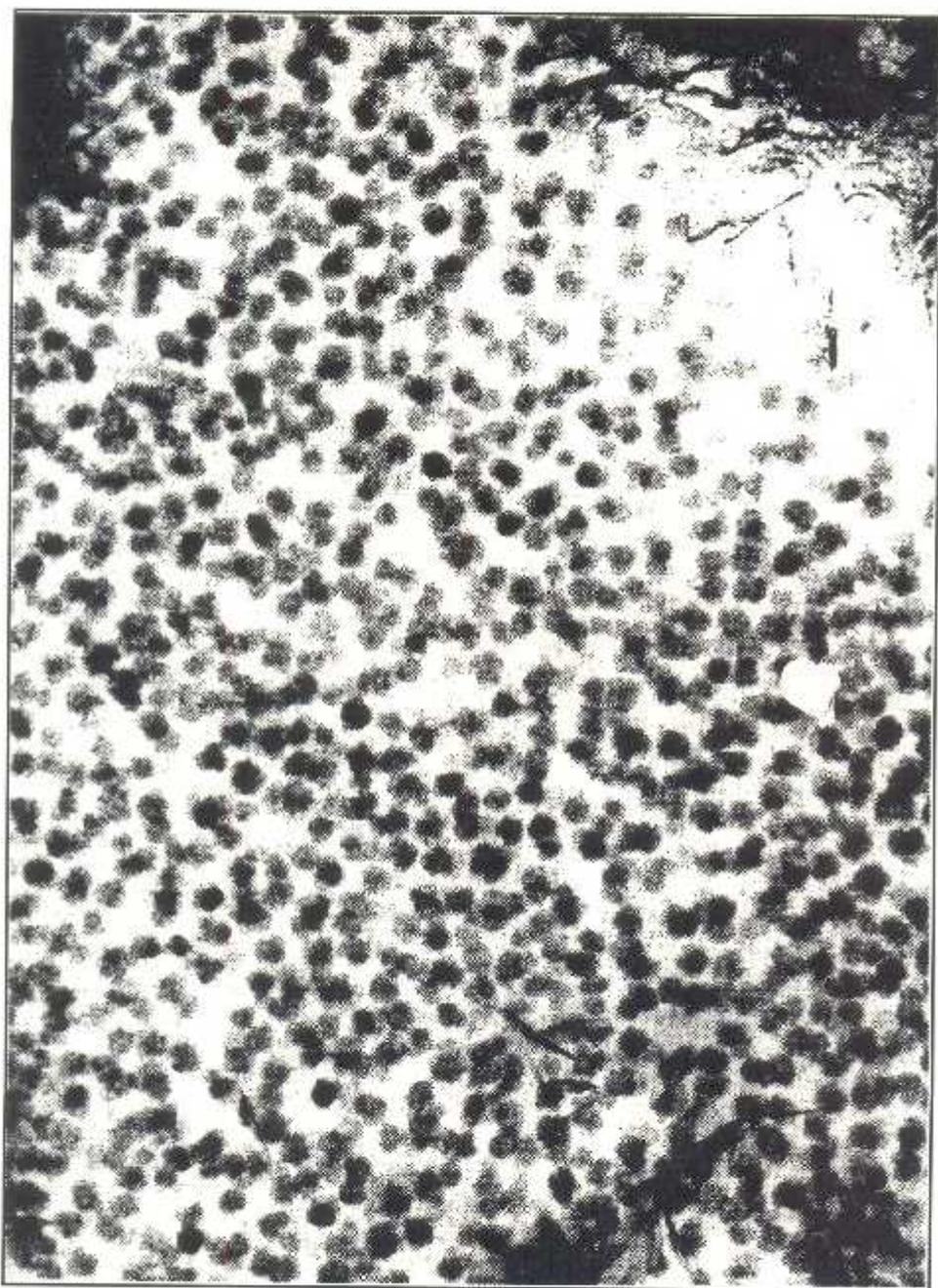


Foto 5.- Gran número de viriones libres (redondados) de 28 a 30 nm de diámetro en el núcleo de la célula del epitelio tubular de la glándula antenal. MET X 7000 (Cortesía del Dr. Teruo Miyasaki).

BIBLIOGRAFIA

1. Barreau Catherine (1993). Etude des interactions entre un nouveau virus entomopathogène et des moustiques vecteurs d'agents transmissibles potentialités d'utilisation en lutte biologique. pgs. 1-41. Thèse doctorat. Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc Montpellier, France.
2. Bell, T. A. y Lightner, D.V. (1988). A handbook of normal shrimp pathology. World Aquaculture Society Special Publication 1.
3. Bell, T.A. y Lightner, D. V.(1987). IHNV disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. *Journal of Fish Diseases* 10: 165-170.
4. Bell, T.A. y Lightner, D. V.(1983). IHNV virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*.38: 185 -194.
5. Bonami, J. R. , Trumper, N. , Mary, J. , Brehelin, M. , Lightner, D. V. (1990). Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *Journal of General Virology* 71: 2657-2664.

6. Bovo, G. , Ceschia, G. , Giorgetti, G., Vanelli, M. (1984). Isolation of an IPN-like virus from adult kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Bulletin Eur. Ass. Fish Pathology* 4(2), 21
7. Brock J.A. (1986). Manual de Enfermedades. Traducción Fonapre-Banco Central. pg 12-14.
8. Bruce, L., Bronwen, B., Lightner, D.V. (1991). Methods for viral isolation and DNA extraction for a penaeid shrimp baculovirus. *Journal of Virological Methods*. 34 (1991) 245-254.
9. Calderón, J., Sandoval, V. (1993). Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. pgs 229-232. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas. San Pedro de Manglaralto, Ecuador.
10. Cedeño, V(1994). Construction et analyse fonctionnelle d'un vecteur d'expression derive du densovirus de *Junonia Coenia* (lepidoptere) et contenant le gene rapporteur de la luciferase. Diplome d' Etudes Approfondies de Physiologie et Ecofisiologie d' Invertébrés. Universite de Paris VI Pierre et Marie Curie. Saint Christol - Les Ales.
11. Cochennec, N., Hervio, D., Panatier, B., Boulo, V., Mialhe, E., Rogier, H., Grizel., Paolucci, F. (1992). A direct monoclonal antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (Ascetospora) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca: Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms* 12: 129-134.

12. Dominguez, J., Hedrick, R. P., Sánchez-Vizcaino, J. M. (1990). Use of monoclonal antibodies for detection of infectious pancreatic necrosis virus by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Diseases of Aquatic Organisms* 8: 157-163.
13. Fields, N., y Knipe, David. (1990). *Fundamental Virology*. pgs.817-840. Associate editors. Raven Press. EEUU.
- 14 Giraud, C. (1991). Etude de l'expression d'un parvovirus d'invertebre, le densovirus de *Junonia Coenia* (Jc DNV): Contribution a l'establisement d'un couple hote-vecteur Jc DNV-Cellules d'insectes. pgs.25-38. Thèse Doctorat. Universite d'aix Marseille II. Marseille, France.
15. Griffiths, J. F., Miller, J.H. (1993). *An Introduction to Genetic Analysis* 5ta edición. pgs. 703-732. W. H. Freeman y Cía. EEUU.
16. Harlow, Ed. y Lane, D. (1988). *Antibodies a laboratory manual*. pgs. 13-242. Edit. por Cold Springs Harbor Laboratory. EEUU.
17. Johnson, P. T. (1983). Diagnosis of crustacean diseases. *Reuni. Con Explot. Mer.* 182: 54-57.
18. Jordan, M. (1990). Clonage et séquençage du génome infectieux d'un Parvovirus d'insecte, le Densovirus du Lépidoptère *Junonia coenia*. The

Doctorat. pgs. 3-12. Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier, France.

19. Kalagayan, H., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweeney, J., Wyban, J. y Brock J. (1991). IHHN Virus as an Etiological Factor in Runt-Deformity Syndrome (RDS) of Juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society*. 22: 235-243.

20. Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

21. Lewis, D. H. (1986). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting penaeid baculovirus. (1986). *Journal of Fish Diseases*. 9: 519-522.(USA).

22. Lightner, D.V.(1988). Diseases of penaeid shrimps. pgs. 8-127. Edit. por Sindermann, C. S. y Lightner, D.V. Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. 2nd edn. Amsterdam, Holanda.

23. Lightner, D.V.(1992). Shrimp viruses diseases: diagnosis, distribution and management. pgs. 238-253. Edit. por Wyban, J. Proceeding of the special session on shrimp farming. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana.

24. Lightner, D.V. (1990). Viroses section: introductory remarks. pgs 3-6. Edit. por Perkins, F.O. Pathology in Marines Science. San Diego, California.

25. Lightner, D.V., Bell, T.A., Redman, R.M. y Mohny L.L. A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indopacific (1992). *Diseases in Asian Aquaculture*. pgs. 57-80. Edit. por Shariff I. M., Shubashing R.P. y Arthur I.R. Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila, Philippines.
26. Lightner, D. V., Redman, R. M., Bell, T. A. y Brock, J. A.(1983b). Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* imported into Hawaii. *Journal of the World Mariculture Society* 14: 212-225.
27. Lightner, D.V. y Redman, R.M. y Bell, T. A. (1983a). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* 42: 62-70.
28. Lightner, D.V., y Redman, R. M. (1992). Penaeid virus diseases of the shrimp culture industry of the Americas. pgs. 569-588. Ed. por Fast, A.W y Lester, L.J. *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier Science Publishers, USA.
29. Loh, P.C., Lu, Y., Brock, J. A.(1990). Growth of the penaeid shrimp virus infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in a fish cell line. *Journal of Virological Methods* 28: 273-280.
30. Lu, Y., Lo, P.C., Brock.,J.A. (1989). Isolation, purification & characterization of Infectious Hypodermal & Hematopoietic Necrosis Virus

(IHHNV) from penaeid shrimp. *Journal of Virological Methods* 26: 339-344. Elsevier.

31. Lu, Y., Nadala, E.C.B., Brock, J.A. y Loh, P.C. (1991). A new virus isolate from infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-infected penaeid shrimps. *Journal of Virological Methods* 31:189-196.

32. Mari, J., Bonami, J. R., Lightner, D.V. (1993). Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps: diagnosis of the disease using an specific probe. *Journal of General Virology* 74: 2637:2643.

33. Mialhe, E. (1994). Pathologie des invertébrés marins d'intérêt aquacole. Contribution et stratégies de recherches. Thèse Doctorat. Université de Montpellier II Sciences Techniques de Languedoc. Montpellier, France.

34. Mialhe, E., Boulo, V., y Grizel, H. (1988) Monoclonal Antibodies: A Tool for Molluscan Pathology. *American Fisheries Society Special Publication*, 18: 304-310.

35. Mialhe, E., Boulo, V., Bachere, E., Hervio, D., Cousin, K., Noel, D., Noel, T., Ohresser, M., le Deuff, R. M., Despres, B. y Gendreau, S. (1992). Development of new methodologies for diagnosis of infectious diseases in mollusc and shrimp aquaculture. *Aquaculture* 107: 155-164.

36. Milstein, C. (1988). Producción Masiva de Anticuerpos Monoclonales un Esfuerzo Compartido en Latino América. Reunión Técnica de Producción Masiva de Anticuerpos monoclonales. Instituto Rotarrio Sao Paulo, BRASIL.
37. Mori, K. (1990) The present state of immunological research in marine aquaculture. pgs. 465-469. Edit. por Perkins, F.O. Pathology in Marine Science. San Diego, California.
38. Nadala, E.C.B., Lu, Y., Loh, P.C. y Brock, J.A. (1992). Infection of *Penaeus stylirostris* (Boone) with a Rhabdovirus Isolated from *Penaeus* spp. *Aquapathology Studies*. 27 (3) 143-147.
39. Noel, T., Nicolas, J.L., Boulo, V., Mialhe. (1993). Development of an immunoenzymatic assay using monoclonal antibodies to identify *Vibrio* P1 responsible of "brown ring disease" in the clam *Tapes philippinarum*.
~~Presentado~~ Presentado a *Aquaculture*, sin publicación.
40. Poulos, B. T., Lightner, D.V., y Trumper, B. (1994). Monoclonal Antibodies to a Penaeid Shrimp Parvovirus, Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV). *Journal of Aquatic Animal Health* 6: 149-154.
41. Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. Microbiology. Second Edition. pgs.11, 346-401. Edit. por Kane, K. Iowa, EEUU

42. Robledo, J.A.F., Bachère, E., Boulo, V., Desprès, B., Mialhe, E., Figueras, A.J. (1994). *Marteilia refrigens* (Protozoa: Ascetospora): Isolation and purification of the plasmodia, sporonts and spores; genomic DNA cloning-test of a non-isotopic labelled probe for the parasite diagnosis. pgs 1-16. IFREMER-URPIGM, La Temblade, France.
43. Sambrock, J, Fritsch, E.F., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning. 2nd Edition Cap. 6. Edit. por Nolan C. Cold Springs HarborLaboratory Press. New York, USA.
44. Ville, C.A. (1988). Biología. Séptima Edición. pgs. 128-135. Edit. por Saunders W.B. Philadelphia, EEUU.
45. Weiss, L. Histology. Cell and Tissue Biology. Fith Edition. pgs. 89-107. Edit. por Elsevier Biomedical. New York.