

# “Tratamientos basados en alta temperatura y $\beta$ -1,3-glucanos para disminuir la prevalencia del síndrome de la mancha blanca (WSD) en postlarvas de *Penaeus vannamei*”

Alejandra Valladares<sup>1</sup>, Bonny Bayot<sup>2</sup>, Fabrizio Echeverria<sup>3</sup>, Fanny Panchana<sup>4</sup>, Irma Betancourt<sup>5</sup>, Jenny Rodríguez<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Master en Acuicultura Marina 2006

<sup>2</sup>Master en Ciencias 2003

<sup>3</sup>Biologo 1999

<sup>4</sup>Tecnologa en Piscicultura 2000

<sup>5</sup>Licenciada en Oceanografía 1994

<sup>6</sup>Director de Tópico. Biologa, Universidad Estatal de Guayaquil, 1984, Doctorado Francia, Blaise Pascal Clermont-Ferrond II, 1994, Investigadora de CENAİM desde 1994

## Resumen

*En el presente trabajo se planteó la hipótesis de que las larvas de camarón, son portadoras del WSSV. La enfermedad se desarrollaría en los estanques en función de las condiciones ambientales, especialmente la temperatura. Se utilizaron dos temperaturas ( 24°C y 31°C) y  $\beta$ -1,3-glucanos en dos niveles, presencia y ausencia en la alimentación. Se empleó un diseño factorial. Se realizó un análisis de cohorte para determinar el riesgo y probabilidad de presencia de WSSV en los tratamientos.*

*En el análisis de cohorte para ausencia y presencia de animales portadores de WSSV (datos de PCR), no se observó ningún efecto de la temperatura pero si de los  $\beta$ -1,3-glucanos disminuyendo significativamente el número de animales positivos. La menor probabilidad de infección se encontró en la combinación 31°C y  $\beta$ -1,3-glucanos. Para los datos de histología, ninguno de los factores tuvo un efecto significativo. Tejidos reportados negativos por histología, dieron señal positiva para WSSV en hibridación in-situ, especialmente en el tejido nervioso de la cabeza y las glándulas tegumentales de la región oral. El tejido nervioso estuvo más afectado usando  $\beta$ -1,3-glucanos. Las glándulas tegumentales, estuvieron más afectadas empleando 31°C, en tanto los  $\beta$ -1,3-glucanos tuvieron un efecto protector.*

*Se detectó apoptosis en epitelio de los apéndices, posiblemente impidiendo la replicación viral en los tejidos más expuestos.*

**Palabras claves:** Prevalencia, WSSV,  $\beta$ -1,3-glucanos, temperatura

## Abstract

*In the present work the hypothesis that the shrimp larvae harbours WSSV at undetectable levels and that the White spot disease (WSD) is developed in ponds depending of the environmental conditions, mainly temperature. Two temperature were evaluated 24°C and 31°C as triggers in addition  $\beta$ -1,3-glucans were used at two levels, in the presence and absence of food. Used factorial design. An cohorte analysis was performed in order to determine the risk and probability of WSSV presence in the treatments.*

*In the cohorte analisis undertakes for the absence or presence of WSSV (PCR), no effect was observed for temperature, but it was evident for glucans levels, which significative decreased as incidence of WSSV. A smaller probability of infection was observed with the combination of 31°C and  $\beta$ -1,3-glucanos. Histology results, showed that neither factor had a significant effect. Tissues reported as negative by histology, showed a positive labelling for WSSV by in-situ hibridation, specially in the nervous tissue of the head and the tegumental glands of the oral region. The nervous tissue was more atarger when  $\beta$ -1,3-glucans were used. The tegumentales glands, these were infected in a greater degree at 31°C. The  $\beta$ -1,3-glucans had a protective effect against WSSV infection this tissue. Apoptosis in epithelium tissue of the appendages was detected, suggesting could prevent the viral replication in more exposed tissues.*

## 1. Introducción

Con la presencia del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV por sus siglas en inglés) en Ecuador, se reportaron mortalidades superiores al 80% en cultivos comerciales.<sup>[2,3]</sup> La aparición de brotes, ocurrencia y severidad de la mancha blanca depende de varios factores tales como: temperatura, estadio de muda, edad, carga viral, forma de transmisión. Esta última puede ser influenciada por la presencia de otros crustáceos portadores del virus como es el caso de cangrejos, *Sesarma sp.*, *Scylla serrata* y *Uca pugilato*, los cuales según investigaciones realizadas por Kanchanaphum<sup>[4]</sup>, transmitieron WSSV a *Penaeus monodon*. Sin descartar que las larvas de camarón también sean una vía de entrada del virus en los cultivos.<sup>[5]</sup> Las rutas de transmisión horizontal mencionadas por Wu<sup>[6]</sup> son la ingestión (favorecida por el canibalismo) y el agua funcionando como vehículo. Siendo importante en estos dos últimos casos la densidad de siembra.

El riesgo de llevar animales positivos para WSSV a los estanques es alto en sistemas de cultivos extensivos y semi-intensivos. La presencia de WSSV incide disminuyendo la supervivencia y la densidad de cosecha debido a la transmisión horizontal, la cual en situaciones de estrés (cambios de temperatura) aumentaría la prevalencia en el cultivo.<sup>[7]</sup> En un estudio realizado por Peng *et al.* 1998<sup>[8]</sup>, se observó una rápida diseminación de WSSV en camarones *P. monodon* cuando fueron sometidos a factores estresantes, como fue la excisión de periopodos. De la misma manera en estudios realizados por De la Vega *et al.* 2004<sup>[9]</sup>, se observó mediante cuantificación por PCR en tiempo real (RT-PCR) que el estrés por manipuleo (inyecciones repetidas) puede estimular la proliferación del virus asociado a las branquias (GAV) en camarones *P. monodon* infectados crónicamente. Este riesgo es aún mayor en sistemas intensivos, ya que éstos se caracterizan por poseer una mayor densidad de animales.

La temperatura del agua parece ser uno de los factores de riesgo más críticos para la evolución de la enfermedad<sup>[10,11,12]</sup>. A partir de temperaturas inferiores a 27°C se incrementa la prevalencia, en tanto que la patogenicidad de la enfermedad se reduce con el incremento de la temperatura<sup>[13]</sup>. Esta situación ha motivado que la hipertermia (Temperatura > 31°C) sea utilizada en sistemas intensivos de cultivo bajo invernadero<sup>[14]</sup>.

Además de la hipertermia un factor que podría ayudar a la prevención, disminuyendo la patogenicidad en las piscinas son los  $\beta$ -1,3-glucanos. En ensayos de desafío se ha visto que estos proporcionan un aumento en la resistencia al

WSSV en postlarvas (PL15) o juveniles ( $5,5 \pm 0,5$  g)<sup>[15]</sup>.

Los programas de prevención son los únicos controles efectivos para manejar las enfermedades virales. Estos, en conjunto con el manejo del ambiente del estanque, pueden minimizar el impacto de las patologías virales.

En el presente estudio se han estudiado los factores temperatura y  $\beta$ -1,3-glucanos como alternativas para disminuir la presencia del WSSV en postlarvas de *Penaeus vannamei* antes de su ingreso en los estanques, utilizándolos como tratamientos de limpieza sobre el WSSV en diferentes tejidos de post larvas. El resultado esperado será encontrar una alternativa para disminuir la prevalencia de WSSV en las larvas, fortalecer el sistema inmune, disminuyendo la probabilidad de transmisión horizontal del WSSV en piscinas de engorde. Este estudio ayudaría a obtener un protocolo de manejo de salud de los animales en estanques. El beneficio será disminuir el riesgo de brotes de WSD e incrementar la densidad de cosecha.

## 2. Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (Fundación CENAİM-ESPOL) del 29 de Julio del 2005 hasta el 25 de enero del 2006

### 2.1. Material biológico

Se utilizaron post larvas (PL) 25 de *P. vannamei*, cuyo peso promedio inicial fue de 0.27 g. Las larvas fueron levantadas en el centro y cultivadas siguiendo el protocolo CENAİM, el mismo que incluye la adición de probiótico *V. Alginoliticus* (ili) desde Nauplio 5 a PL 4 y descarta el uso de agentes quimioterapéuticos. Desde PL 4 los animales fueron transferidos a tanques exteriores cubiertos con plástico de invernadero, a fin de mantener la temperatura alrededor de  $27 \pm 1$  °C. Inicialmente, la alimentación se realizó cada 3 horas con 1gramo/día de Molino 50 # 1 (Alimentsa), incrementando la cantidad de alimento a 4 gramos/día al cabo de 7 días. Posteriormente, los animales (PL 45) fueron llevados a la sala 23 a fin de iniciar el experimento.

### 2.2. Preparación de la sala de experimentación

La preparación de la sala se inició con la limpieza del reservorio de agua y de los 16 tanques de 250 litros a ser utilizados. A fin de contar con un sistema "air lift" de circulación de agua, a los tanques

cónicos se les implementó, una base constituida por una malla negra gruesa y una malla fina roja sobre la que se colocó conchilla. La manguera de aire y la piedra difusora se colocaron al interior de un tubo central, el cual tenía perforaciones en la base, permitiendo oxigenar y recircular el agua del fondo, creando un sistema de circulación a través de la conchilla.

El agua de mar utilizada para el experimento estuvo a 35 ppt de salinidad y fue almacenada en el reservorio donde se realizó un tratamiento de clorinación y de clorinación antes de iniciar el experimento (500 ml de cloro para 5 toneladas de agua de mar, y 125 ml de tiosulfato). El agua pasó por un filtro de piola de 200  $\mu\text{m}$ , antes de ser distribuida en los tanques.

### 2.3. Diseño experimental

El diseño del experimento fue factorial. Los factores fueron, temperatura con dos niveles (24°C y 31°C) y el segundo factor  $\beta$ -1,3-glucanos con dos niveles (incluidos en la alimentación y no incluidos en la alimentación, a razón de 150 mg/kg de alimento).

En total hubo cuatro tratamientos con 4 réplicas por cada tratamiento y una población de 37 animales por tanque (n = 37; N = 148 por tratamiento).

### 2.4. Muestreo

Se realizó un análisis de PCR en PL 25 para evaluar la prevalencia inicial de WSSV en la población, para lo cual se utilizó una muestra de 100 individuos (tamaño necesario para determinar la prevalencia de infección de WSSV en una población con un 95% de confianza y un error del 12%). En 10 individuos se realizó histología.

Luego de 20 días (PL 66) concluyó el experimento y se tomó el peso de toda la población. Se tomó además muestras para histopatología y para detectar diferencias de prevalencia de WSSV entre los animales de los distintos tratamientos. El tamaño de muestra (32 animales por tanque) utilizado para detectar prevalencia se determinó considerando las probabilidades esperadas de WSSV en las poblaciones estudiadas, según Des Clers (1994)<sup>[16]</sup>. Las muestras para PCR fueron fijadas en etanol al 95%. Para el análisis histopatológico se tomaron 5 animales por tanque (N = 20 animales por tratamiento), los mismos que fueron fijados en solución Davidson y analizados histológicamente según el protocolo de Bell y Lightner (1998)<sup>[17]</sup>. Las mismas muestras sirvieron para detectar WSSV mediante hibridación *in situ* (HIS) y para detectar

apoptosis mediante TUNEL System (Promega, 2005)<sup>[18]</sup>.

### 2.5. Análisis mediante la técnica de PCR

Para la utilización de esta técnica se realizó la extracción de tejido de la cabeza por medio del Método de CTAB descrito por Lo *et al.* (1996)<sup>[19]</sup>. La detección de WSSV se realizó con la técnica del PCR anidado, utilizando los iniciadores de Kimura *et al.* (1996)<sup>[20]</sup>. Para el control interno del ADN del camarón se utilizó los iniciadores de 441-bp 18S rRNA<sup>[21]</sup>.

### 2.6. Análisis histopatológico

Las observaciones en microscopio óptico incluyeron:

- Nivel y tejidos con lesiones típicas de WSD
- La presencia de otra patología
- Necrosis
- Picnosis
- Kariorrhexis
- Infiltración de hemocitos en:
  - Tejido conectivo del estómago
  - Órgano linfoide
  - Región oral
  - Músculo
  - Espacios hemales
  - Glándula antenal
- Esferoides :
  - Ectópicos
  - Tipo de esferoides A, B, C, en el órgano linfoide y la degradación del mismo

Con estas observaciones se estableció un índice histopatológico para WSD siguiendo el procedimiento descrito por Espinosa (2003)<sup>[22]</sup>. Para construir este índice se consideró: glándula antenal (GA), epitelio cuticular (EC), epitelio del estómago (Estmg), tejido conectivo (TC), branquias (BRQ), tejido hematopoyético (TH), órgano linfoide (OL), intestino (INT), corazón (CRZ) y ojo.

### 2.7. Detección del wssv mediante hibridación *in-situ* en animales de bajo nivel de infección

Este análisis se realizó en todas las muestras que dieron nivel 1 de infección por histología y en cuatro muestras negativas por tratamiento, tomando aleatoriamente una por unidad experimental. Los cortes fueron colocados en placas cargadas positivamente (Fisher Scientific) y se procedió a

realizar la hibridación *in-situ* para WSSV utilizando un kit comercial (DIAGXOTICS), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## 2.8. Detección de apoptosis

Los cortes para detección de apoptosis también se colocaron en placas cargadas positivamente y se utilizó el Kit de Apoptosis DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Promega)<sup>[18]</sup>.

## 2.9. Análisis estadístico

### 2.9.1. Análisis de varianza

Los pesos de los animales al final del experimento, fueron sometidos a prueba de normalidad con la utilización del programa Data Desk, y la gráfica de “Normal probability plot”. Se determinó la homogeneidad de varianza utilizando la prueba de Fmax.

### 2.9.2. Tablas de contingencia

Se realizó un estudio observacional de cohortes para los datos obtenidos con las diferentes técnicas de diagnóstico empleadas (PCR, histología, hibridación *in-situ*). Para cada uno de los niveles de los factores temperatura (24°C y 31 °C) y β-1,3-glucanos (ausencia y presencia), se analizó la presencia de la infección y enfermedad al cabo de 20 días de iniciado el experimento, para lo cual se construyeron tablas de contingencia. Con el uso de estas tablas se determinó los residuos normalizados de Pearson, que se observaron en cada una de las celdas de la tabla de contingencia. Valores mayores a 1.96 y menores a -1.96 mostraron evidencias a favor del rechazo de la hipótesis nula, sugiriendo una asociación entre ocurrencia de la enfermedad y el nivel de la variable en cuestión. Además se calcularon los riesgos relativos (RR), donde los valores significativamente mayores a 1 indicaron un incremento del riesgo de presencia de la enfermedad en los animales en el nivel de exposición, equivalente a tantas veces dicho valor, comparados con los animales en el nivel de referencia. En este caso el nivel de exposición se denomina **Factor de riesgo**. Los valores menores de 1 indicaron una disminución del riesgo de la enfermedad en los animales en el nivel de exposición, equivalente a tantas veces el inverso del factor, comparado con los animales en el nivel de referencia. En este caso se denomina **Factor de Protección**. En esta tesis, se colocaron en el nivel 1 exposición, los animales sometidos a 31°C y los animales tratados con β-1,3-glucanos. Se calculó un

margen de error representado por un intervalo de confianza (95%). Cuando el valor 1 estuvo incluido en el intervalo, se consideró que no existieron elementos de juicio suficientes para afirmar que el factor influye en la enfermedad. Los intervalos de confianza y sus límites inferiores y superiores son reportados en el documento como IC (límite inferior – límite superior). Para probar la hipótesis de que las prevalencias en las dos poblaciones que se compararon fueran las mismas se utilizó la prueba de significancia de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), utilizando el programa SPSS versión 11.0. Además se calculó el coeficiente de Cohen's Kappa para determinar el valor de concordancia entre los resultados obtenidos por histología, e hibridación *in-situ*.

### 2.9.3. Modelo de regresión logística binaria

El objetivo primordial que resuelve este procedimiento estadístico es el de modelar como influye la presencia o no de diversos factores y el valor o nivel de los mismos en la probabilidad de aparición de un suceso, habitualmente dicotómico ya que la regresión logística permite:

1. Estimar la relación entre dos variables teniendo en cuenta la presencia de otros factores. Sin embargo, se debe cumplir como asunción que la relación entre la variable independiente y la probabilidad del suceso no cambie de sentido, ya que en ese caso no sirve el modelo logístico.

2. Construir un modelo que permita predecir el valor de la variable dependiente (probabilidad del suceso)<sup>[23]</sup>.

Con la utilización de la regresión logística se determinó las probabilidades de ocurrencia de WSSV bajo distintas condiciones de tratamiento. Ello se basó en la fórmula:

$$\text{Probabilidad}(X_1, X_2) = \frac{e^{\alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2}}{1 + e^{\alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2}}$$

Donde:

$X_1$  = representa la ausencia o presencia de β-1,3-glucanos

$X_2$  = representa las dos temperaturas empleadas.

$\alpha$  y  $\beta$  = variables proporcionadas por la regresión logística.

El “odds” de un evento ocurriendo es la razón de la probabilidad de que ocurra versus la probabilidad de que no ocurra, y esta representado por el exponente de Beta en la regresión logística.

Mediante este análisis se evaluó el efecto de los dos factores, temperatura y β-1,3-glucanos en la presencia o ausencia de WSSV, utilizando los datos de PCR, histología e hibridación *in-situ*.

### 3. Resultados

La prevalencia de WSSV en la población inicial antes del bioensayo (PL 45) determinada por PCR e histología fue del 0%. A los 21 días (PL 66), cuando se concluyó el ensayo, se evaluó peso y presencia de WSSV por análisis de PCR en todos los tratamientos. Se determinó lesiones de mancha blanca por histología, presencia de infección por hibridación *in-situ*, y apoptosis mediante TUNEL.

#### 3.1. Peso al final del bioensayo (PL66)

Los datos de peso obtenidos de los tratamientos fueron normales y homogéneos, con lo que se realizó ANOVA observándose que a un 95% de confianza no existió diferencias significativas en los pesos por efectos de los tratamientos ( $P > 0.05$ ). Tampoco se observó interacción entre los dos factores ( $P > 0.05$ ).

#### 3.2. Análisis de presencia, riesgo y probabilidad de WSSV en muestras analizadas mediante PCR

En lo concerniente al factor temperatura, en la Tabla I se observa que de 264 animales mantenidos a 24°C, 21 se encontraron infectados, mientras que a 31 °C, de 264 animales empleados en el experimento, 15 se encontraron infectados. Ninguno de los residuos fue mayor de 1.96 o menor de -1.96, por lo que no se detectó diferencias significativas en la presencia o ausencia de WSSV entre los camarones tratados a las temperaturas de 24 y 31°C.

**Tabla I. Tabla de contingencia entre infección de WSSV y temperatura en las muestras analizadas mediante técnica de PCR**

VARIABLE: TEMPERATURA °C				
NIVEL	ESTADISTICO	INFECCIÓN		TOTAL
		No infectados	Infectados	
24	n	243	21	264
	Residuos	-1.00	1.00	
31	n	249	15	264
	Residuos	1.00	-1.00	
	TOTAL	492	36	528

No se encontró evidencias para rechazar la hipótesis de que la prevalencia de infección en los dos niveles de temperatura fueron iguales ( $\chi^2 = 1.073$ ,  $Gl = 1$ ,  $P = 0.3$ ). En el mismo sentido, no se encontró diferencias significativas a un 95% de confianza en el riesgo relativo de infección en los

animales sometidos a 24°C con respecto a los de 31°C ( $RR \approx 1$ ).

En lo concerniente al factor  $\beta$ -1,3-glucanos, en el análisis con tablas de contingencia se pudo observar un efecto significativo existiendo menor presencia de animales con WSSV cuando se utilizó  $\beta$ -1,3-glucanos (Tabla II).

**Tabla II. Tabla de contingencia entre infección de WSSV y  $\beta$ -1,3-glucanos en las muestras analizadas por PCR**

VARIABLE: B-1,3-glucanos				
NIVEL	ESTADISTICO	INFECCIÓN		Total
		No infectados	Infectados	
Ausencia	n	234	30	264
	Residuos	-4.10	4.10	
Presencia	n	258	6	264
	Residuos	4.10	-4.10	
	TOTAL	492	36	528

Realizando la prueba de  $\chi^2$  se pudo determinar que existió un incremento significativo en la prevalencia de WSSV cuando no se utilizaron  $\beta$ -1,3-glucanos ( $\chi^2 = 17.171$ ;  $Gl = 1$ ;  $p = 0.000$ )

El análisis de riesgo mostró que el riesgo de que los camarones se infecten con WSSV cuando no se usa  $\beta$ -1,3-glucanos en la alimentación es 5 veces mayor que cuando se usa  $\beta$ -1,3-glucanos en la alimentación ( $RR = 5.0$ ,  $IC = 2.1-11.8$ ).

Utilizando el modelo de regresión logística se determinó que al cabo de 21 días con la utilización de  $\beta$ -1,3-glucanos se disminuyó de manera altamente significativa ( $P < 0.001$ ) la probabilidad de incidencia de WSSV. En tanto que, la temperatura no influyó significativamente sobre la probabilidad de incidencia ( $P = 0.294$ ).

Los  $\beta$ -1,3-glucanos y la temperatura fueron modelados como variables categóricas

Calculando la probabilidad de ocurrencia de infección, se obtuvo que ésta es menor cuando se combinan los dos factores,  $\beta$ -1,3-glucanos en la alimentación y alta temperatura (31 °C) (Tabla III).

**Tabla III. Probabilidad de ocurrencia de infección de WSSV en función de temperatura y  $\beta$ -1,3-glucanos obtenidas de muestras analizadas con la técnica de PCR.**

TEMPERATURA (°C)	$\beta$ -1,3-glucanos	PROBABILIDAD DE OCURRENCIA
31	Presencia	0.0186
24	Presencia	0.0270
31	Ausencia	0.0950
24	Ausencia	0.1323

### 3.3. Análisis de presencia, riesgo y probabilidad de WSD en análisis histopatológico.

Considerando el factor temperatura se observó mediante análisis con tablas de contingencia que de 39 animales bajo condiciones de temperatura a 24°C, 21 presentaron lesiones de WSD (Tabla IV). Mientras que, a 31°C, de 40 animales, 13 tuvieron lesiones de WSD. Sin embargo, la prueba de  $\chi^2$  no mostró diferencias significativas ( $\chi^2 = 3.670$ ;  $gl = 1$ ;  $P = 0.055$ ) para el factor temperatura.

**Tabla IV. Tabla de Contingencia entre presencia y ausencia de Mancha Blanca por análisis histológico y temperaturas.**

VARIABLE: TEMPERATURA °C				
NIVEL	ESTADISTICO	WSD		TOTAL
		No lesiones de WSD	Lesiones de WSD	
24	n	18	21	39
	Residuos	-1.90	1.90	
31	n	27	13	40
	Residuos	1.90	-1.90	
TOTAL		45	34	79

El riesgo relativo de infección a 24°C comparado con 31°C fue de 1.66, es decir que existió un 66% más ocurrencia de enfermedad a 24°C que a 31°C. Sin embargo, los intervalos de confianza incluyeron al 1. Por lo tanto se concluyó que no existió una diferencia significativa en el riesgo de infección entre las dos temperaturas.

Considerando el factor  $\beta$ -1,3-glucanos, tampoco se observó un efecto significativo ( $X^2=1.602$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0.206$ ) sobre la presencia o ausencia de WSD (Tabla V). El riesgo de que se presente las lesiones de WSD fue mayor al no usar  $\beta$ -1,3-glucanos, pero las diferencias no fueron significativas ( $RR \approx 1$ ). Estos resultados fueron confirmados por el análisis de

regresión logística, que indicó que, tanto la temperatura ( $P = 0.057$ ), como los  $\beta$ -1,3-glucanos ( $P = 0.206$ ), no influyeron en la presencia de lesiones causadas por el WSSV. Sin embargo, evaluando el efecto de los dos factores utilizando  $\beta$ -1,3-glucanos a 31° C de temperatura se obtuvo la menor probabilidad de que ocurra la enfermedad. (Tabla VI).

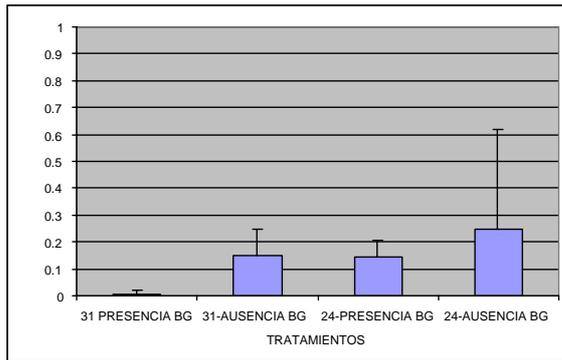
**Tabla V. Tabla de contingencia entre presencia y ausencia de mancha blanca y  $\beta$ -1,3-glucanos por análisis histológico.**

VARIABLE: B-1,3-glucanos				
NIVEL	ESTADISTICO	WSD		TOTAL
		No lesiones de WSD	Lesiones de WSD	
Ausencia	n	20	20	40
	Residuos	-1.30	1.30	
Presencia	n	25	14	39
	Residuos	1.30	-1.30	
		45	34	79

**Tabla VI. Probabilidad de ocurrencia de WSD en función de temperatura y  $\beta$ -1,3-glucanos en análisis histopatológico.**

TEMPERATURA (°C)	$\beta$ -1,3-glucanos	PROBABILIDAD DE OCURRENCIA
31	Presencia	0.260
31	Ausencia	0.390
24	Presencia	0.462
24	Ausencia	0.610

Estos resultados coincidieron con los índices de WSD calculados a partir del análisis histológico. En estos índices se observó mayor nivel de infección a 24°C en ausencia de  $\beta$ -1,3-glucanos y el menor nivel de infección a 31°C utilizando  $\beta$ -1,3-glucanos (Figura 1).



BG=  $\beta$ -1,3-glucanos  
31 y 24 representan las temperaturas a las cuales se trabajó.

**Figura 1. Índices de WSD determinado por histología para los diferentes tratamientos. Las barras representan la desviación estándar considerando una muestra de 20 animales por tratamiento.**

### 3.4. Resultados de presencia de wssv en animales de bajo nivel de infección mediante hibridación *in-situ*

Se empleó esta técnica como prueba confirmatoria de la presencia o ausencia de WSSV en animales negativos o de bajo nivel de infección. Se observó que los animales reportados por histología como negativos fueron marcados positivos por hibridación *in-situ* en alrededor del 50% de los casos en todos los tratamientos.

Mediante el coeficiente de Cohen's Kappa se determinó una baja concordancia entre los datos obtenidos por histología e hibridación *in-situ* ( $\kappa = 0.389$ ,  $p = 0.03$ ).

La mayoría de los tejidos que resultaron positivos por hibridación *in-situ* no mostraron ningún signo de WSD en el análisis histológico. Por otra parte, la mayoría de los tejidos marcados con la sonda para WSSV en animales sin lesiones detectadas por histología fueron el tejido nervioso de la cabeza, escala antenal (ANS o AS), flagelo antenular (ANF), flagelum antenal (AF), nervio del pedúnculo ocular y cerebro y las glándulas tegumentales de la región oral. Por lo tanto, se consideró estos dos tejidos para observar si los factores temperatura y  $\beta$ -1,3-glucanos tuvieron algún efecto sobre la señal positiva de WSSV.

En el tejido nervioso no hubo efecto significativo de la temperatura sobre la presencia de señal para WSSV ( $\chi^2 = 0.994$ ;  $gl = 1$ ;  $P = 0.319$ ) (Tabla VII)

**Tabla VII. Tabla de contingencia entre presencia y ausencia de señal para WSSV por análisis de hibridación *in-situ* en tejido nervioso y temperaturas**

VARIABLE: TEMPERATURA (°C)				
NIVEL	ESTADISTICO	INFECCIÓN EN TEJIDO NERVIOSO		TOTAL
		No infectados	infectados	
24	n	12	9	21
	Residuos	-1.00	1.00	
31	n	11	4	15
	Residuos	1.00	-1.00	
		23	13	36

Por el contrario los  $\beta$ -1,3-glucanos incrementaron la presencia de animales con señal positiva para WSSV en el tejido nervioso ( $\chi^2 = 5.063$ ;  $gl = 1$ ;  $P = 0.024$ ), (Tabla VIII). El riesgo de que se infecten usando  $\beta$ -1,3-glucanos fue de 2.8 veces más que sin usar  $\beta$ -1,3-glucanos (IC = 1.128 - 7.012). Resultado que se confirmó al realizar la regresión logística. Los  $\beta$ -1,3-glucanos incrementaron la probabilidad de encontrar señal positiva para el WSSV en el sistema nervioso ( $P = 0.040$ ).

**Tabla VIII. Tabla de contingencia entre presencia y ausencia de WSSV en tejido nervioso por análisis de hibridación *in-situ* y  $\beta$ -1,3-glucanos**

VARIABLE: B-1,3-glucanos				
NIVEL	ESTADISTICO	INFECCIÓN		TOTAL
		No infectados	infectados	
Ausencia	n	16	4	20
	Residuos	2.3	-2.3	
Presencia	n	7	9	16
	Residuos	-2.3	2.3	
	TOTAL	23	13	36

La mayor probabilidad de encontrar una señal positiva para WSSV en el tejido nervioso fue utilizando  $\beta$ -1,3-glucanos a 24 °C, en tanto la menor probabilidad de detectar una señal positiva para WSSV fue a 31°C sin  $\beta$ -1,3-glucanos (Tabla IX).

**Tabla IX. Probabilidad de ocurrencia de señal positiva a WSSV en tejido nervioso en función de temperatura y  $\beta$ -1,3-glucanos mediante hibridación *in-situ***

TEMPERATURA (°C)	$\beta$ -1,3-glucanos	PROBABILIDAD DE OCURRENCIA
31	Ausencia	0,16
24	Ausencia	0,24
31	Presencia	0,47
24	Presencia	0,60

Al analizar estadísticamente la presencia de señal positiva para WSSV en glándulas tegumentales se encontró una mayor presencia de animales con señal positiva para WSSV en alta temperatura (Tabla X) ( $P = 0.028$ ;  $\chi^2 = 4.822$ ;  $gl = 1$ ). Se observó además, 2.5 veces más protección en los animales sometidos a 24 °C que a 31°C. (RR= 0.397 CI = 0.166-0.947).

**Tabla X. Tabla de contingencia de presencia y ausencia de señal para WSSV en glándulas tegumentales bajo condiciones de 2 temperaturas en análisis de hibridación *in-situ***

VARIABLE: TEMPERATURA (°C)				
NIVEL	ESTADISTICO	INFECCIÓN		TOTAL
		No infectados	infectados	
24	n	15	5	21
	Residuos	2.2	-2.2	
31	n	6	9	15
	Residuos	-2.2	2.2	
TOTAL		22	14	36

Por otra parte, la utilización de  $\beta$ -1,3-glucanos influyó significativamente en la ausencia de WSSV ( $P = 0.000$   $\chi^2 = 12.910$ ;  $gl = 1$ ). Considerando que la mayor probabilidad de que la enfermedad se presente en glándulas tegumentales ocurrió cuando no se usó  $\beta$ -1,3-glucanos (Tabla XI). El riesgo de que se presente señal positiva para WSSV en glándulas tegumentales es de 10.40 veces mayor cuando no se usa  $\beta$ -1,3-glucanos (IC = 1.517-71.278).

**Tabla XI. Tabla de contingencia de presencia y ausencia de señal positiva para WSSV en glándulas tegumentales bajo el factor  $\beta$ -1,3-glucanos en hibridación *in-situ*.**

VARIABLE: B1,3-glucanos				
NIVEL	ESTADISTICO	INFECCIÓN		TOTAL
		No infectados	infectados	
Ausencia	n	7	13	20
	Residuos	-3.6	3.6	
Presencia	n	15	1	16
	Residuos	3.6	-3.6	
TOTAL		22	14	36

Al evaluar la probabilidad de ocurrencia mediante regresión logística se observó que existieron diferencias significativas ( $P = 0.005$ ) solo para la utilización de  $\beta$ -1,3-glucanos.

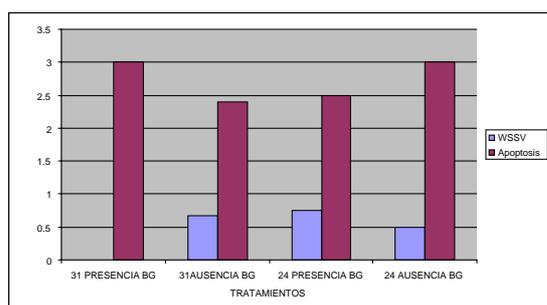
El análisis de probabilidad de ocurrencia presentado en la tabla 18 indica que la mejor condición para que no se presente señal positiva para WSSV mediante hibridación *in-situ* en glándulas tegumentales se dio utilizando  $\beta$ -1,3-glucanos y 24°C y la mayor probabilidad de detectar señal en glándulas tegumentales en la región oral se obtuvo en animales tratados a alta temperatura sin  $\beta$ -1,3-glucanos.

**Tabla XII. Probabilidades de que ocurra la infección, detectada mediante hibridación *in situ*, en glándulas tegumentales para los factores temperatura y  $\beta$ -1,3-glucanos**

TEMPERATURA (°C)	$\beta$ -1,3-glucanos	PROBABILIDAD DE OCURRENCIA
24	Presencia	0.028
31	Presencia	0.138
24	Ausencia	0.469
31	Ausencia	0.830

### 3.5. Detección de apoptosis

Se analizó aleatoriamente el nivel de apoptosis en diferentes animales de los 4 tratamientos. Observándose una relación inversa entre incidencia de WSSV observada por histología y nivel para la señal de apoptosis. Estos datos no fueron sometidos a análisis estadístico.



BG=  $\beta$ -1,3-glucanos

**Figura 2. Índice de apoptosis e índice histológico de los animales sometidos a los cuatro tratamientos**

La mayor cantidad de células en apoptosis se observó en los epitelios de los apéndices de la cabeza. Además se pudo detectar apoptosis en otros tejidos como esferoides del órgano linfoide, epitelio del estómago, tejido hematopoyético, tejido conectivo, glándula antenal, epitelio general, branquias, base del pedúnculo ocular, cordón nervioso e intestino.

#### 4. Conclusiones

Aparte de los vectores y reservorios para WSSV presentes en los estanques, las propias larvas llevarán el WSSV al sistema de cultivo y el agua actuará como vehículo de transmisión horizontal. Por lo tanto, deben diseñarse estrategias para minimizar el riesgo de transmisión del virus de la Mancha blanca.

Se ha visto que la temperatura tiene un efecto positivo en cuanto al nivel de infección, actuando sobre la morbilidad y la mortalidad, pero no sobre la susceptibilidad, mientras que la utilización de inmunoestimulantes en este caso los  $\beta$ -1,3-glucanos, impiden que el virus ingrese por vía oral (efecto sobre transmisión horizontal).

La combinación de estos dos factores para tratar las larvas antes de la siembra, permitiría minimizar los riesgos de infección y brote en estanques.

La combinación de estas dos estrategias puede optimizarse. En este trabajo se procuró trabajar con una temperatura superior a 31°C, considerando que el rango óptimo para el desarrollo del camarón sin presencia de brotes en los estanques se ubica entre 28 y 31°C<sup>[7,24,13,25]</sup>. En el futuro se puede ensayar temperaturas mayores de 32°C (hipertermia) o inmunoestimulación por baño a fin de verificar si esta forma de suministrar  $\beta$ -1,3-glucanos tiene un efecto protector sobre las terminaciones nerviosas de la cabeza.

#### 5. Bibliografía

- [1] **Valladares A.**, Tratamientos basados en alta temperatura y  $\beta$ -1,3-glucanos para disminuir la prevalencia del síndrome de la mancha blanca (WSD) en postlarvas de *Penaeus vannamei*, (Tesis de Maestría, Facultad de Ingeniería marítima, CENAIM-ESPOL, 2006)
- [2] **Sonnenholzner S.**, Supervivencias de Camarón Cultivado en el Ecuador antes de la Mancha Blanca. CENAIM informa, boletín Informativo N°113, (2004)
- [3] **Aqua Bounty Pacific**, 2005, The SYBR Shrimp Kit Line, <http://www.aquabounty.com/virus.htm>
- [4] **Kanchanaphum P., C. Wongteerasupaya, N. Sitidilokratana, V.Boonsaeng, S.Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, T.W.Flegel**, Experimental transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*, Diseases Aquatic Organisms, Vol.34 (1998), pp1-7
- [5] **Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang and C.F.Lo**. Pathogenicity of a baculovirus infection causing White Spot Syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Disease Aquatic Organism. Vol 23 (1995), pp:165-173.
- [6] **Wu J.L., A. Namikoshi, T.Nishizawa, K.Mushiake, K. Teruya, K.Muroga**, Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route, Diseases of aquatic organisms, Vol.47 (2001), pp: 129-135
- [7] **Rodríguez R.**, La tilapia y su efecto en la prevalencia del virus de la mancha blanca (WSSV) en poblaciones de camarón, Tesis de Maestría, Centro Ecuatoriano Nacional de Investigaciones Marinas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, N° 164, (2003<sup>a</sup>)
- [8] **Peng, S.E., C.F. Lo, C.H. Ho, C.F. Chang, and G. h. Kou**. Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. Aquaculture vol.164 (1998).pp:253-262
- [9] **de la Vega E., B. M. Degan, M. R. Hall, J. A. Cowley, K. J. Wilson**, Quantitative real-time RT-PCR demonstrates that handling stress can lead to rapid increases of gill-associated virus (GAV) infection levels in *Penaeus monodon*, Diseases Aquatic Organisms Vol. 59 (June 11 2004), pp: 195-203.

- [10] **Bayot B.**, Dinámica de la epidemia de WSSV. Parte 2: Análisis a 33 °C, CENAİM INFORMA, Boletín informativo No 127 (2005).
- [11] **Vidal O. M., C. B. Granja, F. Aranguren, J. A. Brock y M. Salazar.** A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus, Journal of the World Aquaculture Society Vol. 32 No.4 (2001), pp: 364-372.
- [12] **Granja C., L. F. Aranguren., O. M. Vidal, L. Aragón, y M. Salazar,** Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Litopenaeus vannamei.*, Diseases of Aquatic Organisms Vol. 54 (2003), pp: 73-78.
- [13] **Sonnenholzner S., J. Rodríguez, F.Perez, I. Betancourt, F. Echeverria, y F. Panchana,** Supervivencia, prevalencia del virus y respuesta inmune de camarones juveniles, *L. Vannamei*, desafiados a WSSV a diferentes temperaturas, CENAİM INFORMA Boletín informativo No.48 (2002<sup>a</sup>)
- [14] **Sonnenholzner S., Rodríguez J. Calderón,** Temperatura y WSSV: Estudios prometedores del CENAİM sobre técnicas de cultivo de camarón Advocate, (Agosto 2002c), pp:55-57
- [15] **Chang C.F., Su M.S., Chen H.Y., Lo C.F., Kou G.H., Liao I.C.,** Effect of dietary  $\beta$ -1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*, Diseases of Aquatic Organisms, Vol 36 (1999), pp:163-168
- [16] **des Clers S.,** Sampling to detect infections and estimate prevalence in aquaculture, Centre for Environmental Technology, London UK (1994), pp: 39-44
- [17] **Bell, T. y D. Lightner.** A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. The World Aquaculture Society. State of Hawaii, Arizona. USA. (1988) pp: 2-3.
- [18] **Promega,** DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System, INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS G7130 AND G7360 (2005).  
www.promega.com
- [19] **Lo, C.F., J.H Leu., C.H Ho, S.E Peng., Y.T Chen., C.M Chour., P.Y Yeh., C.J Huang., H.Y.Chou., C.H Wang. and G.H Kou.** Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase Chain reaction. Diseases Aquatic Organisms. Vol.25 (1996), pp:133-41.
- [20] **Kimura T., K. Yamano, H.Nakano, K. Momoyama, M.Hiraoka., K. Inouye,** Detection of Penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV) by PCR, Fish Pathology, Vol. 31No.2 (1996),pp 93-98
- [21] **Lightner D. y K. Tang,** Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase Chain reaction. Aquaculture. Vol. 189 (2000). pp 11-21
- [22] **Espinosa Y.,** Inmunoestimulación temprana de *Litopenaeus vannamei* para inducir una mayor respuesta inmune al virus de la mancha blanca, Tesis CENAİM (2003)
- [23] **Molinero, L.** La Regresión Logística. Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión (2001). <http://www.seh-lelha.org/rlogis2.htm>
- [24] **Wyban, J., W.A. Walsh, and D.M. Godin,** Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture. Vol.138 (1995), pp 267-279
- [25] **Ponce-Palafox J., C. A. Martínez, L. Ross,** The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931, Aquaculture 157 (1997), pp 107-115

