UNIVERSIDAD TECNICA DE MANABI

Facultad de Ciencias Veterinarias

Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TESIS DE GRADO

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE :

DOCTOR EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TEMA:

EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA A INFECCIÓN MASIVA DE MANCHA BLANCA EN PREJUVENILES DE CAMARON BLANCO ***Litopenaeus vannamei.***

AUTOR

GENOVEVA VANESSA MALDONADO SABANDO

DIRECTOR DE TESIS

Dr. GILBERTO LOPEZ DUEÑAS

CO - DIRECTOR (CENAIM - ESPOL)

Ing. FRANKLIN PEREZ U. MSc.

PORTOVIEJO - MANABI - ECUADOR

2002

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABI

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Tema: "Evaluación de la supervivencia a infección masiva de mancha blanca en prejuveniles de camarón blanco ***L. vannamei***".

TESIS DE GRADO

Sometida a consideración del Tribunal de Revisión y Sustentación y legalizada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del Título de:

DOCTOR EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

APROBADA

Dr. GILBERTO LOPEZ DUEÑAS
DIRECTOR

Dr. TITO PALACIOS MOLINA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Blgo. MARJORIE IDROVO
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. ROQUE VERA INTRIAGO
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, quienes con su apoyo me han permitido estar firme y segura en medio de las vicisitudes de este mundo.

Vanessa Maldonado Sabando

AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Técnica de Manabí por brindarme la oportunidad de formarme dentro y fuera de las salas de clases y por el apoyo otorgado en el desarrollo de este trabajo.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano" (CENAIM) por darme la oportunidad de realizar este trabajo y de incursionar en el mundo de la investigación.

A mi Director y Tribunal de Tesis por el tiempo invertido en la elaboración de este documento. Gracias por el apoyo en todo sentido.

INDICE DE CONTENIDO

Página

Página

Página

INDICE DE TABLAS

Página

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Dioxinucleotidos Trifosfatos
Kb	Kilo pares de base
ml	Mililitro
mM	milimolar
nm	nanómetro
pb	pares de bases
PCR	Polymerase Chain reaction
rpm	revoluciones por minuto
TE	Tris Etilén diamino Tetracético
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Tris	Hidroximethy amino methane
ug	microgramo
ul	microlitro
UV	ultravioleta
°C	grados centígrados
ups	unidades por salinidad
PP	porcentaje de proteínas
PL	Post - larva
IHHNV	Virus de la Necrosis Hematopoyética e Hipodérmica Infecciosa
TSV	Virus del Síndrome de Taura
WSSV	Virus del Síndrome de la Mancha Blanca
WSBV	Baculovirus de la Mancha Blanca
mm	milímetro

INDICE DE GRAFICOS

Página

CTAB	Cetyltrimethy Lammonium Bromide
mg	miligramos
TAE	Tris Acetate EDTA
v	voltios

RESUMEN

Se realizó un estudio para evaluar la supervivencia cuantitativa y cualitativa de prejuveniles de camarón blanco ***Litopenaeus vannamei,*** de infección masiva con el virus de la mancha blanca, que afecta y/o interviene en la eficiencia productiva del camarón en condiciones de laboratorio. En lo que concierne a la infección masiva las post-larvas fueron alimentadas con tejido de camarones infectados por WSSV (Virus del Síndrome de Mancha Blanca) durante dos días y mantenidos con raciones de CENAIM 40 PF durante 35 días. A partir de la infección se determinó alta mortalidad, estableciendo una supervivencia de 0,031% durante el periodo experimental.

En el estudio de identificación del virus de la mancha blanca se utilizó la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en la medida que permite establecer la carga viral a partir del ADN extraído, lo que permitió cuantificar 119 individuos positivos a WSSV correspondientes a los grupos de post-infectados y supervivientes.

Entre 60 individuos supervivientes que fueron amplificados por PCR, fue posible identificar 43 individuos resistentes, por estar libres del virus de la mancha blanca. De acuerdo a los resultados positivos por PCR se catalogó como tolerantes a 17 supervivientes donde se presentó el virus.

Este trabajo presenta de manera original la primera demostración de infección masiva viral en prejuveniles ***L. vannamei***, encaminado a evaluar resultados de supervivencia a partir de PL 35 con mejor capacidad de resistencia y tolerancia, en particular frente al Síndrome del Virus de la Mancha Blanca.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la camaronicultura mundial ha sido altamente significativa a nivel de producción, así como riesgosa por los problemas patológicos y ecológicos que se incrementan en la mayoría de los países productores de camarón. Esta actividad ha seguido en el Ecuador un curso aproximado a todos los países productores.

La industria camaronera ecuatoriana ha visto afectada su productividad por la presencia e introducción sucesiva de agentes patógenos. Tradicionalmente ésta actividad en el Ecuador estuvo basada en cultivos extensivos procedentes de poblaciones silvestres, donde la ocurrencia de mortalidades es difícil de cuantificar, siendo reportado sólo cuando son grandes mortalidades (Calderón, 1993; CNA, 1996).

El impacto más grave en la rentabilidad de la camaronicultura aparece en 1999 cuando se alcanza supervivencia hasta del orden de 18% y se confirmó la presencia del WSSV denotando que la industria depende de las condiciones ambientales locales y de las fluctuaciones en el aprovisionamiento de semilla natural o de laboratorio.

Se conoce que la alta densidad de animales en cultivo facilita la transmisión de agentes virales, por lo que se siguen prácticas de manejo y se buscan camarones resistentes que posibiliten recuperar las producciones en cautiverio de nuestro país, que promediaban en supervivencia el 52% antes de la llegada de la mancha blanca (Bayot *et at.*, 2000).

La prevención y control de las enfermedades son la prioridad para la sustentabilidad de esta industria, consecuentemente la utilización de larvas provenientes de ciclo cerrado se considera la forma más adecuada para evitar la difusión de enfermedades y la alteración de estructuras genéticas en las poblaciones (Cliffort, 1997).

Dentro de este campo la genética es un elemento clave en el establecimiento de la estrategia para el control de las enfermedades. Programas de mejoramiento se llevan adelante en diversos países productores de camarón. Estados Unidos ha desarrollado líneas libres de patógenos y cumple un programa muy activo de mejoramiento. Esfuerzos paralelos se llevan a cabo en Venezuela, México, Colombia, Panamá, Perú, Brasil, Tailandia y Australia. Programas de mejoramiento dirigidos a la búsqueda de resistencia a enfermedades virales, han sido exitosos en el caso del camarón blanco. El Oceanic Institute y High Health Aquaculture reportan la existencia de líneas resistentes a IHHNV (Virus de la Necrosis Hematopoyética e Hipodérmica Infecciosa) y TSV (Virus del Síndrome de Taura) (Pérez, 1999).

A nivel local no existen experiencias previas reportadas sobre selección de animales resistentes al virus de la mancha blanca. Sin embargo aparecen reportes internacionales sobre infección masiva en Panamá. Por un lado Farallón Aquaculture reporta una supervivencia de 1%

en animales infectados masivamente con el virus de la mancha blanca. Los supervivientes al ser infectados por segunda vez al alcanzar 10g de peso promedio, 30% resisten nuevamente al ataque viral. El 90% de los animales supervivientes a las dos pruebas de desafío fueron negativos para el virus por PCR (Panorama Acuícola, 2000). Por otro lado Jones (2000) reporta que en infecciones masivas en 200 millones de postlarvas sólo 1 de cada 10.000 animales sobreviven. Los animales supervivientes fueron negativos a mancha blanca.

Los estudios de Thompson *et al.*, (1993) conllevan a asumir que la sustentabilidad de este cultivo dependerá de la selección de camarones adaptados a las condiciones de cultivo, de rápido crecimiento y resistentes a las enfermedades, avalada en el desarrollo de mejoramiento genético al mismo tiempo. Está demostrado que la resistencia es un factor muy útil en el control de virus y en otros tipos de patógenos en diferentes especies animales (James *et al.*, 2000).

Este trabajo se encaminó de manera preliminar a determinar la supervivencia en camarones prejuveniles ***L. vannamei***, infectados por WSSV en forma masiva. Además de determinar a los supervivientes libres del virus de la mancha blanca catalogados como resistentes, y tolerantes a aquellos supervivientes donde se presentó el patógeno.

2. JUSTIFICACIÓN

El cultivo del camarón a nivel mundial genera ganancias millonarias que repercuten en la economía de los países productores; sin embargo, a los programas de mejoramiento e intensificación se asocian una serie de problemas patológicos bacterianos y virales los cuales en los últimos años han afectado la producción, tanto en el hemisferio occidental como en el oriental (CNA, 2000).

Una de las peores enfermedades virales que ha impactado a la camaronicultura ecuatoriana, es la mancha blanca. Por ejemplo, en 1998 la producción nacional llegó a USD 783,7 millones. Con la presencia de la mancha blanca, en 1999 el país exportó sólo USD 591,9 millones, y en el 2000 se redujo aún más hasta USD 300 millones (CNA, 2001).

Para la situación nacional, es probable que la creación de líneas genéticas con resistencia a WSSV provea a los camaroneros de animales resistentes a la enfermedad de la mancha blanca, a más de llegar a disminuir la dependencia de larvas y reproductores silvestres.

Este tipo de estudios debe ser prioritario para el sector, y sus resultados pueden alcanzarse a mediano plazo mediante la selección genética y utilización de herramientas moleculares. Lo anterior se basa en experiencias de los Estados Unidos, donde a través de programas de desarrollo se han obtenido líneas genéticas de camarones resistentes a IHHNV y TSV (Wyban *et al.*, 1999).

El desarrollo de programas dirigidos a selección genética que permitan mejorar la supervivencia en camarón blanco ***L. vannamei***, contra el virus de la mancha blanca podrá ser uno de los mayores cambios en el manejo sostenible de la industria camaronera ecuatoriana, lo que justificó la realización de esta investigación.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El acelerado crecimiento de la industria camaronera ecuatoriana ha traído como consecuencia la presentación de diversas enfermedades, las que pueden ser catalogadas como ambientales, nutricionales e infecciosas.

Dentro de la producción de camarón se destaca la presentación de enfermedades virales y como consecuencia de ello: aumento en la mortalidad, disminución en el crecimiento, disparidad de tallas, entre otras.

Una de las enfermedades virales más importantes es el Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV), que constituye una de las mayores amenazas para el sector camaronero. La mancha blanca puede representar un nuevo genero de virus ***Whispovirus*** o quizás una nueva familia ***Whispoviridae*** (Van Hulten *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 1999), el que se presenta en crustáceos de diferentes estadios de crecimiento, con mayor incidencia de mortalidad durante los estadios de post-larva y la probabilidad de perder más del 90% de la población en un tiempo de 72 horas.

Debido a la importancia en establecer el pico máximo y/o mínimo de resistencia a la mancha blanca, este trabajo conllevó a la realización de pruebas de desafío para determinar la supervivencia y observar el comportamiento de los camarones supervivientes en cuanto a la presencia o ausencia de el virus.

El proceso se desarrolló como una investigación, que permitió relacionar a través de un cultivo larvario en 500.000 PL 35 una prueba de infección masiva con WSSV, (Síndrome del Virus de la Mancha Blanca), hasta alcanzar un gramo de peso.

Para la realización de la investigación se contó con las instalaciones del CENAIM (Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano M.") en el área de Genética y Biología Molecular ubicado en San Pedro de Manglaralto, Península de Santa Elena, provincia del Guayas.

La investigación se llevó a cabo durante el período de Marzo a Septiembre del 2001 donde se pretendió dar resultados valiosos para los estudios genéticos de la camaronicultura en búsqueda de animales resistentes y/o tolerantes a WSSV.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la supervivencia de prejuveniles de camarón blanco ***L. vannamei*** a infección masiva con el virus de la mancha blanca.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Determinar la tasa de supervivencia de prejuveniles (de PL 35 hasta 1 gramo) a infección masiva.

2. Establecer la carga viral de los individuos supervivientes a tal infección mediante pruebas de PCR.

5. MARCO TEORICO

5.1. Antecedentes

La industria camaronera en el Ecuador se inició a finales de la década del 60 con cultivos extensivos (Calderón, 1993). Esta actividad productiva es una de las más importantes en términos de ingresos de divisas por exportaciones y fuente generadora de empleo (CNA, 1996).

Tradicionalmente la camaronicultura ecuatoriana se basa en el cultivo extensivo de larvas silvestres (Calderón, 1993; CNA, 1996). Esto hace que la industria dependa fuertemente de las condiciones ambientales locales y de las fluctuaciones en aprovisionamiento de semilla natural.

Igualmente hace que el negocio sea altamente riesgoso por la posibilidad de introducción de enfermedades provenientes del medio natural.

Observaciones previas reportadas por Thompson *et al.*, (1993); Griffith en Ecuador y Wigglesworrth en Colombia (1993), sugieren que la supervivencia del camarón ***L. vannamei*** alcanzada era de 44,6% para la estación seca, en tanto que para la estación lluviosa alcazaba el 71,0%.

El virus de la mancha blanca apareció inicialmente en China en 1993, extendiéndose a Japón a través de la importación de juveniles. La dispersión al resto de Asia hasta la India no fue mediante mecanismos naturales sino por traslocación de animales infectados (Alday, 1999). En América se reportó la presencia de la enfermedad en poblaciones silvestres y cultivadas en Texas en 1995, en Carolina del Sur en 1996 y en Centroamérica en 1999 (CNA, 2000).

En 1999 se confirmó la presencia de la mancha blanca en Ecuador y como respuesta a la epidemia, se prohibió la importación de camarones en cualquier estadio de su ciclo biológico, entre otras medidas que no fueron suficientes (CNA, 2000). Sin embargo, en el 2001 se permitió la importación de nauplios y reproductores de Panamá, Guatemala y Colombia, aparentemente resistentes a la mancha blanca. (CNA, 2001).

5.2. Descripción del virus de la mancha blanca (WSV).

5.2.1. Virus: clasificación, estructura molecular.

El virus de la mancha blanca (White Spot baculovirus WSBV) de forma de bastón a elíptica, posee moléculas de ADN no segmentadas con un genomio de aproximadamente 290 Kb (Van Hulten *et al.*, 2001).

Presenta una envoltura de tres capas que forma arreglos paracristalinos en el núcleo de las células afectadas. El tamaño de la nucleocápside mide 80 - 85 nm x 230 - 270 nm.

El virión mide un promedio de 110 - 120 nm x 275 - 330 nm (Kasorchandra *et al.*, 1998).

Otros autores prefieren el tamaño de 266 x 112 nm para la envoltura y 420 x 68 nm para la nucleocápside (Saúl Hameed *et al.*, 2000). Además la maduración del virus es desarrollada en el interior de los núcleos de las células infectadas sin los cuerpos de oclusión proteicos (Kasornchandra *et al.*, 1998).

El virus de la mancha blanca tiene varias características en común con los baculovirus: estructura bacilar, presencia de envoltura, tamaño, ADN de doble hélice y método de replicación intranuclear. Por estas razones se lo clasificó inicialmente como un baculovirus (Lo *et al.*, 1997). Sin embargo, estudios de tres proteínas estructurales en el virus indican que estas distan de ser homólogas a las proteínas estructurales de otros virus. Esta característica única ayuda a sustentar la idea de que

WSSV puede representar un nuevo género de virus (***Whispovirus***) o quizás una nueva familia (***Whispoviridae***) (Van Hulten *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 1999).

El virus de la mancha blanca tiene un amplio rango de hospederos en especies tanto cultivadas como silvestres entre las que se encuentran: ***P. monodon, L. japonicus, Metapenaeus ensis, Fenneropeneus penicilillatus*** (Pérez, 1997), ***Macrobranchium rosembergii, Calappa philarigus, Charybdis feriatus, Helice tridens, Portunus pelagicus, Portunus sanguinolentus***, y ***Scylla serrata*** (Chang *et al.*, 1998; Kanchanaphum *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1998; Supamattaya *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000).

Igualmente diferentes especies de copépodos, cangrejos, camarones no cultivados y larvas de insectos de la familia ***Ephydridae*** constituyen reservorios del virus de la mancha blanca. (Lo *et al.*, 1996).

5.2.2. Patogenia del virus de la mancha blanca.

Estudios realizados (Wang *et al.*, 1995; Lightner 1996) reportan mortalidades masivas de 100% entre 5 y 7 día de post - infección, con signos externos que incluyen manchas blancas en el exoesqueleto y epidermis de 0,5 mm a 2 mm de diámetro, coloración pálida rosa o café rojiza, a más de la disminución en el consumo de alimento.

Observaciones histopatológicas (Mohan *et. al.*, 1998; Momoyama *et al.*, 1994) revelan hipertrofia nuclear en las células infectadas tanto en los tejidos mesodermal y ectodermal, destrucción celular en: tejido conectivo, glándula antenal, branquias, cordón nervioso y ectodermis. En la fase de viremia, el virus está presente en todos los órganos del camarón, reportándose infección en el sistema inmune, hemocitos, tejido hematopoyético y órganos linfoides.

Utilizando pruebas de infección experimental para determinar los órganos atacados por el virus, Chang *et al.*,

(1996) encontraron a las 16 horas post-infección células positivas al WSSV en el estómago, branquias, epidermis cuticular y hepatopáncreas. A las 22 horas diagnosticaron WSSV en el órgano linfoide, glándula antenal, tejido muscular, tejido hematopoyético, corazón e intestino medio y superior. Estos experimentos se realizaron en juveniles de 0,35 - 0,45g de ***P. monodon*** por alimentación, administrando junto con dieta artificial, tejidos de ***P. monodon*** enfermos.

Supamatamaya *et al.*, (1998), evaluaron tres métodos de inoculación de mancha blanca en ***krill***: inyección, inmersión y alimentación. Se observaron mortalidades de 100% para el grupo de animales inyectados a los 4 días de la infección. Los animales expuestos al virus por inmersión presentaron signos de decoloración y la mortalidad alcanzó 100% cinco días después de la infección. Los animales infectados por alimentación presentaron signos de la enfermedad en el 20% de la población y la mortalidad empezó a los 6 días post-infección.

Maeda *et al.*, (1998), inyectaron una solución viral en el tercer segmento abdominal de ***Marsupenaeus japonicus*** y ***P. Monodon***. Los animales fueron mantenidos en acuarios de vidrio a una temperatura de 28 - 30 °C. La mortalidad fue monitoreada diariamente por diez días, observándose mortalidades masivas a partir del tercer día después de la infección, hasta alcanzar el 100% a los diez días post-infección.

Chou *et al.*, (1998) reporta mortalidades de 100% entre el quinto y séptimo día de post-infección en ***M. japonicus*** y ***P. monodon***. En ese experimento el virus fue extraído a partir de filtrados de tejido epidermal y suministrado bajo el método de inmersión. En ***P. monodon*** de 1,5 g infectados por ingestión se observaron signos clínicos a las 48 horas post-infección. Los órganos fueron invadidos totalmente en 56 horas y se obtuvo una mortalidad de 100% a los cinco días de post-infección, (Chou *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1996).

5.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En el diagnóstico de la mancha blanca, la Reacción en Cadena de la Polimerización es un método *in vitro* utilizado para sintetizar y amplificar secuencias definidas de ADN (Lighner *et al.*, 1998) en este caso para detección del virus, aún en muy bajos niveles a través de un proceso enzimático termocíclico repetitivo. Cada ciclo permite amplificar un fragmento de ADN correspondiente a la secuencia localizada entre dos iniciadores.

Se pueden obtener amplificaciones de largas cadenas moleculares o de segmentos cortos de ADN. De esta forma es posible detectar la presencia de dicha cadena complementaria de ADN en un mezcla que incluye: DNA Polimerasa termoestable, dos iniciadores oligonucleóticos, trifosfatos deoxynucleótidos, reacción buffer, magnesio y aditivos.

Se puede obtener una amplificación exponencial en una reacción de PCR, esta reacción comprende según Newton *et al.*, (1997) tres pasos:

1. **Desnaturalización de las dos cadenas del ADN,** corresponde a la separación debido a la acción de la temperatura (rango 93° - 100°C).

2. **Hibridización,** en la base a la complementariedad de base. Los iniciadores oligonucleótidos se unen a cada una de las cadenas del ADN en un rango de temperatura (37° - 65°C).

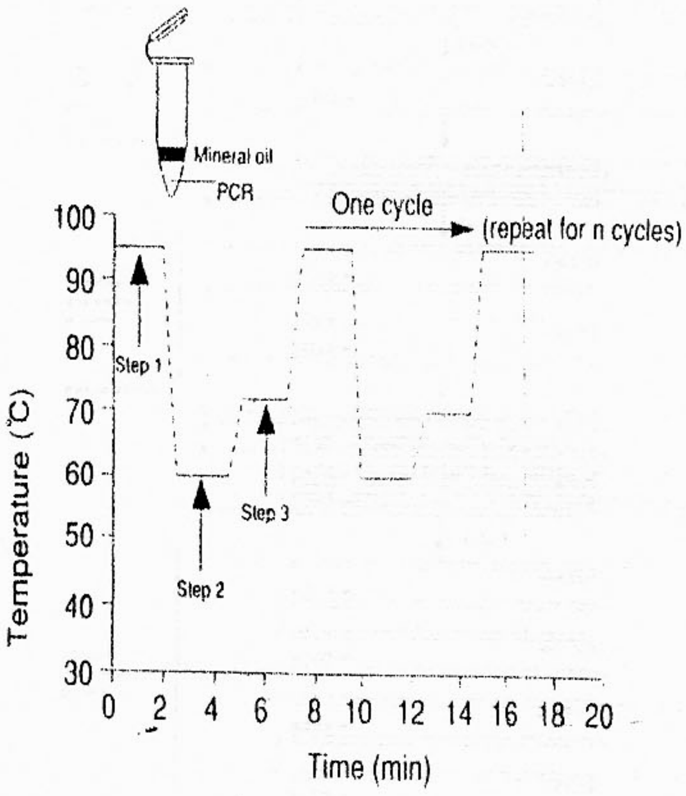
3. **Extensión,** permite que la ADN Polimerasa comience a polimerizar a partir de los iniciadores oligonucleótidos a 72°C (Graf. 1).

Debido a que la repetición de síntesis de cadenas corresponde un ciclo de amplificación, cada nueva cadena de ADN sintetizada empieza a extenderse en ciclos siguientes y así la secuencia de ADN es selectivamente amplificada ciclo tras ciclo (Graf. 2).

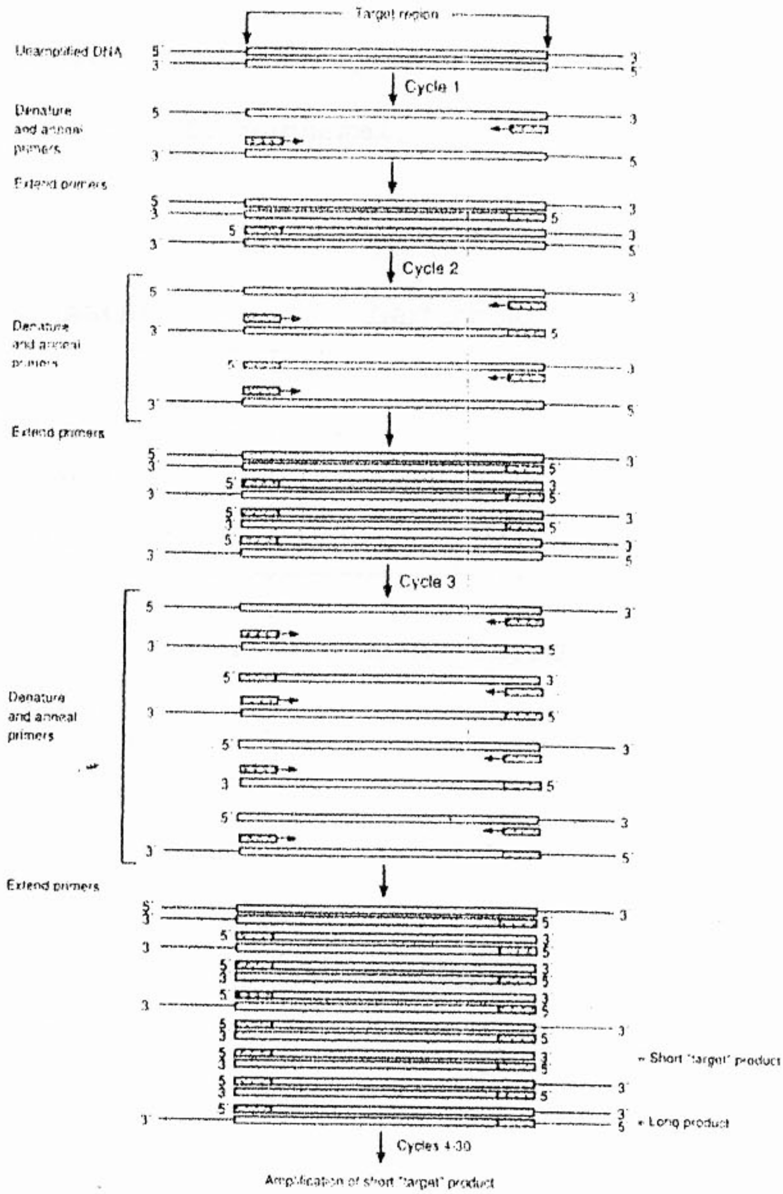
Existe una serie de protocolos y kits para la detección del virus de la mancha blanca mediante PCR (Lo *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1998).

Diversos autores han demostrado que es posible cuantificar el genoma del WSSV usando la PCR a partir de muestras de hemolinfa y tejidos de cefalotórax, logrando detectar por PCR las diferencias en la distribución de las repeticiones que constituyen polimorfismos genéticos (Tang *et al.*, 2000; Haymer, 1999).

GRAF. 1 CICLO DE TEMPERATURA PARA PCR.



GRAF. 2 REACCION EN CADENA DE POLIMERASA. CICLO DEL PROCESO.



HIPÓTESIS , VARIABLES E INDICADORES

HIPÓTESIS No. 1

Los programas de mejoramiento genético inducen a la creación de líneas resistentes a WSSV (Síndrome del Virus de la Mancha Blanca) logrando mejorar la supervivencia del camarón blanco ***L. vannamei***.

VARIABLES	INDICADORES	T. INVESTIGACIÓN
1. Programas de mejoramiento genético	Sistema de cruzamiento	P. de ADN
2. Grado de supervivencia	% de mortalidad	T. PCR

HIPÓTESIS No. 2

La supervivencia a infección masiva constituye un medio eficiente en la selección de animales resistentes a mancha blanca.

VARIABLES	INDICADORES	T. INVESTIGACIÓN
Supervivencia a infecciones	Animales infectados	Observación directa
Grado de resistencia a WSSV	Carga viral	Técnica de PCR

6. DISEÑO METODOLOGICO

6.1. Estudio experimental.

En el estudio se evaluó la infección masiva por ingestión del virus de la mancha blanca en 500.000 prejuveniles de ***L. vannamei.*** (Pérez, 1997). Se pretendió determinar si los animales supervivientes a la infección eran portadores del virus o no.

6.2. Del lugar de investigación.

La investigación se realizó en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano M." (CENAIM) ubicado en San Pedro de Manglaralto, Península de Santa Elena, Provincia del Guayas, Ecuador.

6.3. Duración del trabajo.

La investigación se realizó en seis meses, la misma que inició desde el mes de Abril del 2001 a Septiembre del mismo año.

6.4. Muestras a investigarse.

Para realizar la investigación se utilizaron 300 muestras correspondientes al grupo de supervivientes e infectados.

6.5. Materiales de investigación.

Se utilizó para el diagnóstico del virus de la mancha blanca, ADN extraído de los camarones supervivientes e infectados, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

6.6. Materiales de laboratorio.

6.6.1. Levantamiento de Animales.

Alimento CENAIM 40 PP, papilla infectada, Aquamats© , aireadores.

6.6.2. Para la Extracción de ADN.

- Materiales: tubos de 1.500 ul, puntas de 1.000 ul, puntas de 200 ul.
- Reactivos: solución de CTAB (Cetyltrimethy Lammonium Bromide), Proteínas K, Fenol, Cloroformo, etanol 70%, Solución TE (Tris Ethilén diamino Tetracético).

6.6.3. En la Técnica de PCR.

- Materiales: tubos de 200 ul para PCR, puntas de 200 ul.
- Reactivos: Solución de MgCl2, Solución buffer, solución de dNTPs (Dioxinucleótidos Trifosfatos), Polimerasa, Primers para detección del virus.

6.7. METODOS

6.7.1. Origen de las post - larvas de camarón para el ensayo.

La población cultivada para efectuar la larvicultura fue de 500.000 en PL 21, las cuales eran originales de poblaciones no seleccionadas de camarones ***L. vannamei*** provenientes de laboratorio comercial PLAYAESPEC ubicado en Palmar, Península de Santa Elena.

La densidad de siembra fue de 50 PL/lt, hasta PL 35 en tanque de 10TM con adición de algas bentónicas (***Amphora coffaeformis***). Como dieta de mantenimiento se suministró CENAIM 40 PP a razón de 8% de la biomasa. La temperatura promedio durante la larvicultura fue de 29 grados centígrados mientras que la salinidad estuvo a 34 ups.

Para el mantenimiento del sistema se utilizaron Aquamats®, la calidad del agua se mantenía por recambio cada dos días y diariamente los residuos de alimento y de metabolismo fueron extraídos por sifoneo.

El cultivo fue mantenido desde PL 26 hasta que los animales alcanzaran la edad alrededor de PL 35, durante este período se realizaron muestreos para evaluar el crecimiento.

6.7.2. Protocolo de infección masiva.

El preparado viral (papilla) proviene de camarones ***L. vannamei*** con peso promedio de 4g infectados con WSSV, verificado por PCR y preservados por tres meses a -20°C. Se utilizó la cantidad de 797,6g de camarones enfermos a los cuales se les extrajo la cabeza, para la infección se utilizó al abdomen triturado durante 30 segundos, todo el proceso fue realizado en fresco (temperatura de 12 - 13 °C).

A partir de PL 35 se efectuó la infección en dos días mediante la ingestión de papilla, se suministró el primer día dos raciones a razón de 10% de la biomasa con un intervalo de tres horas, se realizó sifoneo después de la primera dosis y recambio de agua en 80% luego de la segunda dosis, 24 horas después se administró una tercera dosis efectuando sifoneo y recambio de 80%. Se continuó la alimentación normal con balanceado CENAIM 40 PP. Durante los días de infección se mantuvo aireación constante, salinidad a 34 ups, temperatura de 26,8°C y oxígeno 3,8 mg/lt.

El periodo post-infección se extendió durante 9 días durante los cuales se realizaron muestreos aleatorios, haciendo una transferencia a tanque de 8 TM a partir de allí el cultivo fue mantenido hasta alcanzar peso promedio de 1g.

Se siguieron medidas de bioseguridad y el método usual de la clorinación en concentración de 300 g/1.000 lt durante 30 minutos para la limpieza del material utilizado.

6.7.3. Extracción del ADN genómico.

Se utilizó un método de extracción para 300 muestras correspondientes a dos grupos: post-infectados y supervivientes.

6.7.3.1. Método de extracción.

Cetyltrimethy Lammoniun bromide (CTAB).

1. Se colocó tejido de camarón (branquias) a homogenizar en 600 ul de CTAB buffer en micro tubo Eppendorf (capacidad de 1,5 ml).

2. Se incubó las muestras a 80 grados centígrados por 30 min. o 60 grados centígrados por 45 min.

3. Enfriadas las muestras a temperatura ambiente se centrifugó a 13.000 rpm por 5 min. en una centrífuga (Jouan), se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml.

4. Se adicionó 250 ul de phenol, más 250 ul de Cloroformo Isoamil (24:1), se procedió a mezclar en forma manual o con vortex.

5. Se centrifugó a 13.000 rpm por 5 min. recuperándose el sobrenadante, sin tocar la interfase.

6. Se adicionó 500 ul de Cloroformo - Isoamil (24:1) procediendo a mezclar y centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min.

7. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó 400 ul de Isopropanol, en este punto se pueden guardar las muestras a -20°C durante 24 horas.

8. Se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min., y se eliminó el sobrenadante, haciendo un lavado la porción esférica de la muestra con 400 ul de ethanol al 70% frío.

9. Se procedió a centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min.

10. Finalmente se procedió a secar el pellet y se resuspendió el ADN en 100 ul de TE 1 X.

6.7.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

6.7.4.1. Amplificaciones ribosomal.

Para determinar las condiciones de PCR se partió de los protocolos propuestos por Lo (1996), Kimura (1996) y Lighner (2000).

Se preparó un volumen de reacción de 13 ul por muestra, según la siguiente tabla:

Tabla 1: Contenido de la mezcla de reacción

COMPONENTE	CANTIDAD / CONCENTRACIÓN
Agua	qsp 13 ul
PCR	10 x Buffer
MgC12	25mM (1,uM)
DNTPs	10mM (0,2mM)
RiboForward441	20uM (0,2mM)
RiboReverse441	20uM (0,2mM)
TaqPolimerasa	5 U/ul (1U/reacción de 25ul)

Se adicionó a cada tubo 15 ul de aceite mineral.

6.7.4.2.Iniciadores:

Se utilizaron iniciadores WSSV Lightner (2000).

F5' - TTGTACGAGGATCGAGTGGA - 3'

441

R5' - ATGCTTTCGCAGTAGGTCGT - 3'

6.7.4.3. Amplificación con kit CENAIM WSSV.

El diagnóstico para WSSV por PCR fue llevado a cabo usando los siguientes iniciadores:

Kimura (1996)

570	F2	5' - TCTTCATCAGATGCTACTGC - 3'
	R2	5' - TAACGCTATCCAGTATCACG - 3'

Lo (1996)

941	F2	5' - GTAACTGCCCCTTCCATCTC - 3'
	R2	5' - TACGGCAGCTGCTGCACCTG - 3'

Se preparó un volumen de 13 µl por muestra, según la siguiente tabla:

Tabla 2: Contenido de la Mezcla de reacción Kit CENAIM WSSV.

COMPONENTE	CANTIDAD / CONCENTRACIÓN
EXTERNAL	
Agua	qsp 13 ul
PCR	10 x buffer
MgC12	25mM (1,5 uM)
DNTPs	10mM (0,2 mM)
ForwardPrimer941	20uM (0,2 uM)
ReversePrimer941	20uM (0,2 uM)
Taq Polimerasa	5 U / ul (1U reacción de 25 ul)
Ribosomal + Internal	
Agua	qsp 13 ul
PCR	10 x buffer
MgC12	25mM (1,5 uM)
DNTPs	10mM (0,2 uM)
Ribo441F	20uM (0,2 uM)
Ribo441R	20uM (0,2 uM)
Interno570F	20uM (0,2 uM)
Interno570R	20uM (0,2 uM)
Taq Polimerasa	5 U / ul (1 U / reacción de 25 ul)

Se adicionó 15 ul de aceite mineral para cada muestra.

Las mezclas para amplificar se llevaron a un termociclador automático (Genius, USA). Los parámetros de tiempo y temperatura utilizados para 34 ciclos fueron: 94°C por 2 min., 92°C por 30 seg., 55°C por 30 seg., 72°C por 1 min. y luego 1 ciclo a 72°C por 5 min.

6.7.5. Método de separación de geles.

Se elaboraron geles de agarosa al 2% utilizando buffer TAE 1X (40 ml de buffer 50X y se enrasa a 2000 ml).

Se dejó a baño maría durante 30 min. a 80 grados centígrados para permitir la disolución completa de la agarosa. Se colocaron los geles en charoles de 160 ml.

Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% por tinción con bromuro de etidio (SIGMA). Se adicionó 2 ul de azul di bromo fenol con utilización de marcador de peso molecular (1 Kb ladder Gibco BRL) en la cantidad de 5 ul fueron comigrados. Se colocaron las muestras en los respectivos hoyos del gel en un volumen igual de 12 ul. Después de separación de las bandas en el gel por electroforesis cerca de 2 h de migración a 95 v, las bandas de ADN fueron documentadas mediante fotografías del sistema 2D Kodak.

Se obtuvieron así amplificaciones de diferentes grados de infección para cada uno de los individuos que fueron completamente analizados tantos para post-infectados como para supervivientes.

6.7.6. Análisis estadístico.

La evaluación del virus de la mancha blanca: las 300 muestras fueron evaluadas mediante PCR de dos pasos siguiendo el protocolo de Lo *et al.*, (1996). Utilizando pruebas de Chi cuadrado (X^2) se determinó si la frecuencia de animales infectados detectados con uno o dos pasos de PCR era similar para los dos grupos (supervivientes *vs.* infectados inicialmente).

7. RESULTADOS - DISCUSIÓN

La experimentación inició con un grupo de 500.000 animales. Como inóculo se utilizó papilla infectada durante dos días, la alimentación diaria de las post - larvas en toda la prueba fue con balanceado CENAIM 40 PP con el 8% de la biomasa. Considerando el crecimiento observado antes de la infección y que se ubica en promedio de 0,0134 g/día (Graf. 3). El incremento de peso durante el levantamiento de post - larvas hasta 1 g varió por las condiciones mantenidas en el tanque, así los resultados de muestreos realizados en el periodo post-infección revela 0,1304 g/día en promedio de crecimiento. En el gráfico 4 se presentan datos de crecimiento de la población realizado bajo los protocolos implementados. Se observaron mortalidades acumulativas diariamente durante 15 días después de la infección.

La supervivencia debía ser de aproximadamente el 5% considerando la mortalidad observada en pruebas de desafío en laboratorio (F. Pérez, comunicación personal), en la práctica esta tasa llegó apenas al 0,031% durante 35 días siguientes a la infección, mientras que los resultados de infecciones masivas controladas es 0,3% para el reporte de Farallón Aquaculture y 0,0125% para el reporte de Jones (2000) no se observan altas diferencias en porcentajes. Sin embargo los datos de supervivencia en piscinas camaroneras en presencia de la mancha blanca en el Ecuador es de 18% (Bayot *et al.*, 2000) lo que permite observar diferencias en porcentajes.

Gráfico 3. Resultados antes de infección. Crecimiento en post - larvas *L. vannamei* durante un período de 2 semanas.

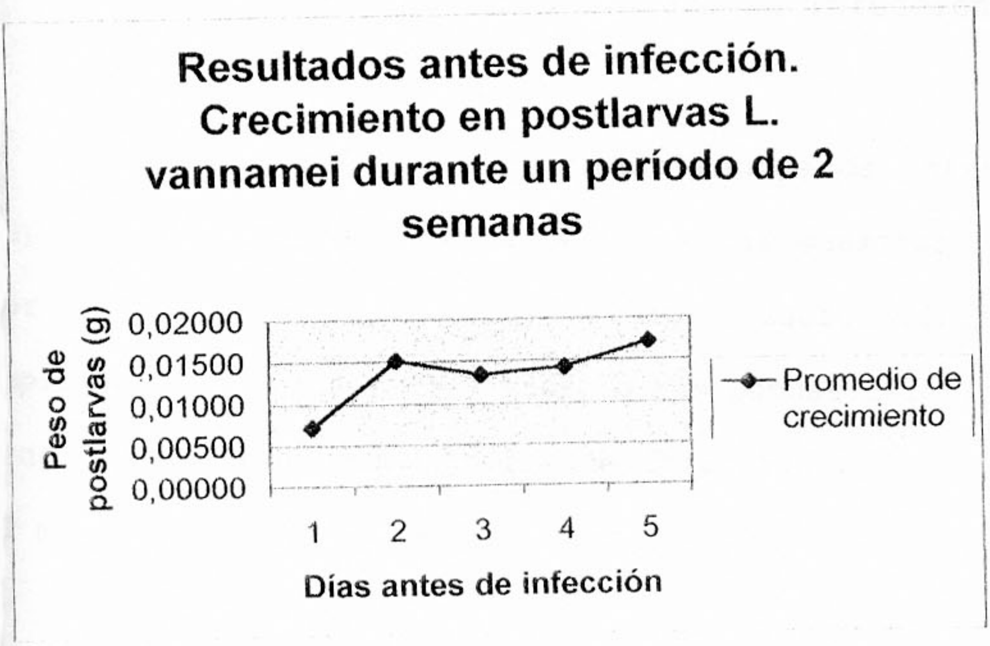
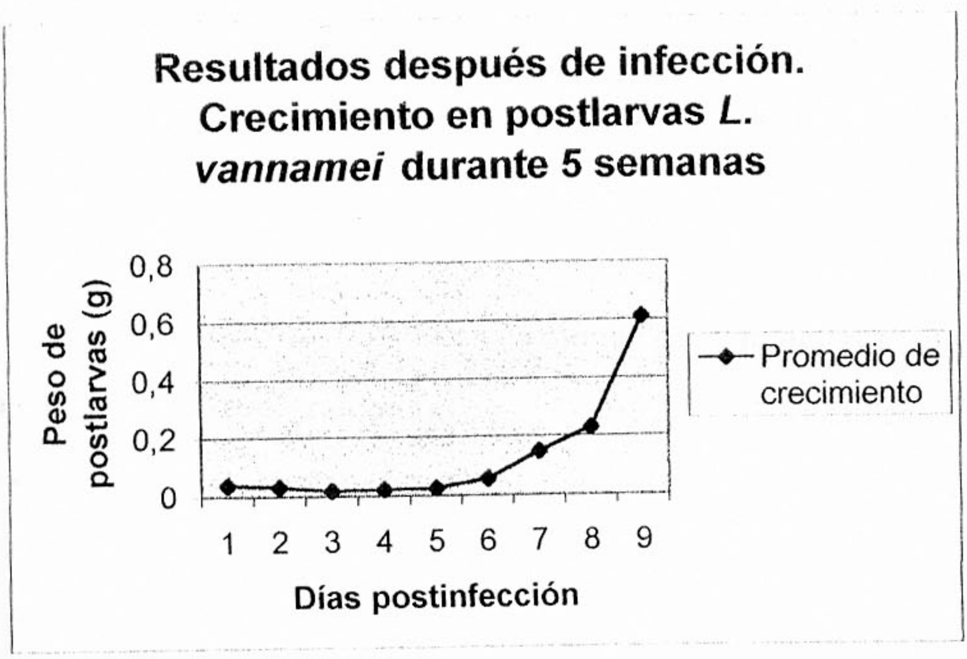


Gráfico 4. Resultados después de infección. Crecimiento en post-larvas *L. vannamei* durante 5 semanas



7.1. Análisis de individuos infectados y supervivientes por PCR.

7.1.1. Determinación del grado de infección.

Los productos de PCR incluyen bandas de intensidad, cuya observación es fluctuante entre las muestras de ADN. Por este hecho los productos de amplificación ribosomal y amplificación de una, dos, tres, o más bandas del virus han sido considerados como grados de infección por referencia al marcador de peso molecular (1Kb Ladder GIBCO BRL).

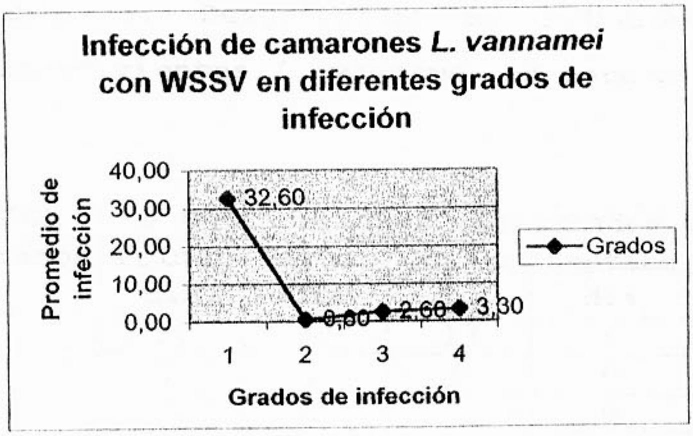
Se identificaron dos tipos de bandas en función de sus intensidad, fuerte y reducida, lo que podría deberse a la cantidad de ADN ya sea por la presencia de factores inhibidores o por la baja concentración de ADN (Anexo 3).

Se establecieron cuatro grados de infección de WSSV para los que fue necesario determinar el porcentaje de individuos post-infectados y supervivientes positivos, detectando la presencia del virus correspondiente al grado

1 de infección con el más alto porcentaje de individuos (estimados 32% y 11%) respectivamente (gráfico 5a y 5b).

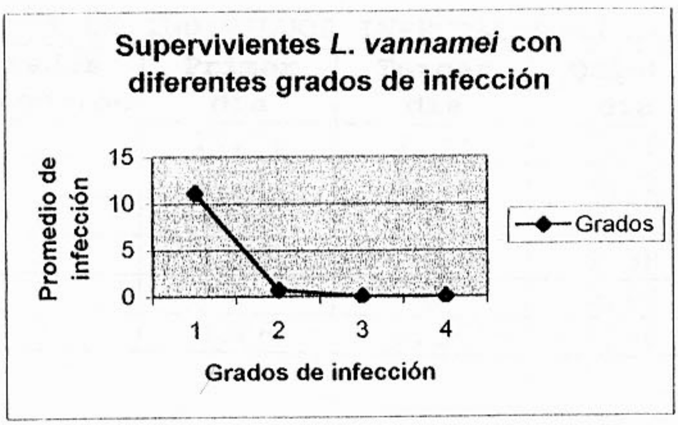
Los resultados de las amplificaciones por PCR de post-infectados y supervivientes se presentan en la tabla 3 y tabla 4.

Gráfico 5a Infección de camarones *L. vannamei* con WSSV en diferentes grados de infección



Promedio Infección	Grado de Infección
32,6	1
0,6	2
2,6	3
3,3	4

Gráfico 5b Supervivientes *L. vannamei* con diferentes grados de infección



Promedio Infección	Grado de Infección
11,1	1
0,7	2
0	3
0	4

Tabla 3: Descripción de individuos post-infectados y supervivientes *L. vannamei* en detección de WSSV por PCR.

PCR	# De individuos infectados en días post-infección					
Grados	Primer día	Tercer día	Quinto día	Séptimo día	Noveno día	Supervivientes
*1	15	12	13	6	3	16
*2	1	0	0	0	0	1
*3	2	0	2	0	0	0
*4	0	0	1	4	0	0

Tabla 4: Resultados en porcentajes de individuos post-infectados *L. vannamei* en detección de WSSV por PCR.

% DE INDIVIDUOS INFECTADOS EN DÍAS POST- INFECCIÓN					
Grados Infección	Primer día	Tercer día	Quinto día	Séptimo día	Noveno día
0	17,36	2,77	1,38	0	0
1	10,41	8,33	9,02	4,16	2,08
2	0,69	0	0	0	0
3	1,38	0	1,38	0	0
4	0	0	0,69	2,77	0
9	4,86	6,25	4,16	10,41	11,11

Leyenda: Grados de Infección

Grado 0: (Ribosomal + 1° banda)

*Grado 1: (Ribosomal + 1° banda) (1° banda)

*Grado 2: 2 bandas virus

*Grado 3: 3 bandas virus

*Grado 4: 4 bandas virus

Grado 9: no amplificaciones

7.1.2. Determinación del promedio de infección por día.

En lo que concierne al promedio de infección / día se evaluó tiempo y porcentaje de individuos infectados. Los camarones fueron muestreados en los días 1, 3, 5, 7 y 9, de infección.

Los resultados por PCR indican un valor más alto en el día primero de post-infección (estimado 12%) de entre los demás días. Gráfico 6. Esto indica que las partículas virales invadieron en tiempo variable a los camarones infectados por ingestión.

7.1.3. Análisis integrado de la carga viral de individuos post-infectados y supervivientes.

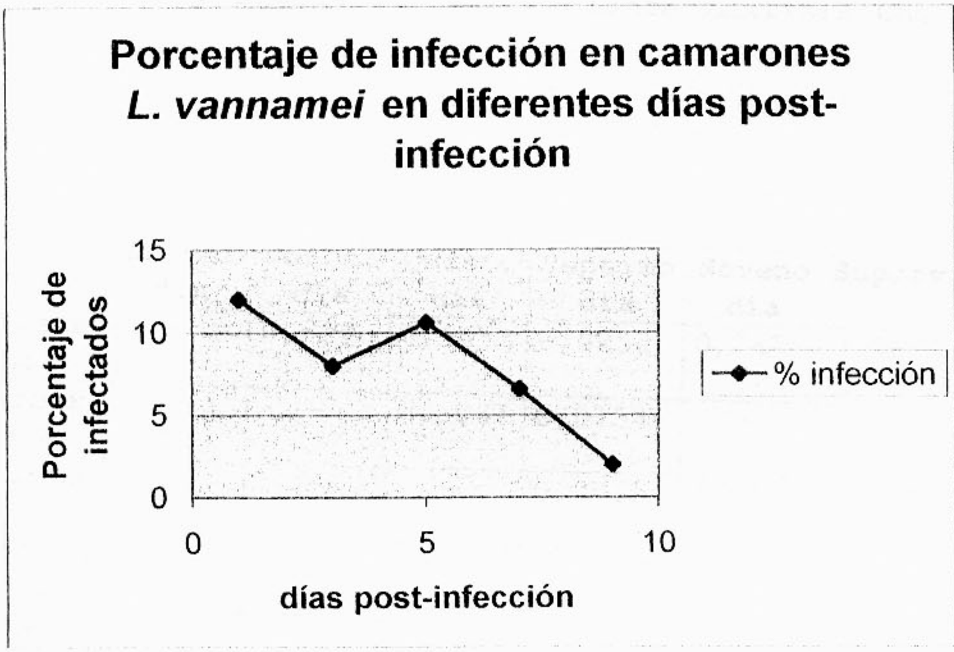
En la práctica la muestras de ADN fueron obtenidas para 150 camarones post-infectados y 144 para los animales supervivientes.

En efecto tanto para los iniciadores #441, #5[illegible] y #941 ciertas bandas fueron posibles observarse para 59 camarones post-infectados y 60 camarones supervivientes, lo que indica la amplificación del ADN del camarón y del ADN del virus, estos resultados permiten establecer diferencias en porcentajes 39,3% y 41,6% respectivamente.

Al comparar las experiencias de infecciones masivas llevadas a cabo en Panamá se muestran resultados contrastantes. Por un lado Farallón Aquaculture reporta que el 90% de los animales supervivientes a dos pruebas de desafío fueron negativos para WSSV por PCR (Panorama Acuícola, 2000). Por otro lado Jones (2000) reporta que infecciones masivas en 200 millones de post-larvas sólo una de cada 80.000 animales fueron negativos a mancha blanca.

La PCR permitió obtener la carga viral de los camarones analizados por Chi Cuadrado (X^2) encontrándose que en el séptimo día de post-infección no es significativamente diferente ($p < 0,05$) con respecto a la determinada en los supervivientes ($p = 0,0159$) y en los días primero ($p = 0,0252$) y tercero ($p = 0,0154$) de post-infección. Con respecto al quinto ($p = 0,0715$) y noveno día ($p = 0,188$) después de la infección existe una diferencia significativa, llegando a mantenerse la carga viral en el mismo nivel que en el día séptimo de post- infección durante los treinta y cinco días en que se llegó al final del ensayo (tabla 5).

Gráfico 6. Porcentaje de infección en camarones *L. vannamei* en diferentes días post-infección



Días Post-infección	% Infección
1	12
3	8
5	10,6
7	6,6
9	2

Tabla 5: Resultados por PCR de la carga viral de post-infectados y supervivientes mediante Análisis Chi cuadrado (X^2)

	Primer día	Tercer día	Quinto día	Séptimo día	Noveno día	Supervivientes
Primer día	-	0,329	0,5657	0,0252	0,7470	0,3669
Tercer día	-	-	0,2837	0,0154	-	0,3925
Quinto día	-	-	-	0,0715	0,5023	0,2021
Séptimo día					0,1880	0,0159
Noveno día						0,6665

8. CONCLUSIONES

El presente trabajo constituye el primer estudio de infección masiva controlada con WSSV y que considera la supervivencia y carga viral en prejuveniles de camarón blanco ***L. vannamei.***

Se ha demostrado la factibilidad de realizar infecciones masivas por ingestión a partir de camarones infectados con WSSV conservado a -20°C.

El método de infección planteado induce niveles de resistencia y/o tolerancia cuya validéz en el camarón se ha demostrado en los datos recopilados en 60 individuos positivos de los 150 supervivientes al virus de la mancha blanca.

A pesar de que animales menores a PL 30 no muestran diferencias estadísticamente significativas en mortalidad al ser sometidos a pruebas de desafío con respecto a controles no infectados e igualmente si el inóculo es almacenado por un período mayor a tres meses las mortalidades son menores que si se utiliza un inóculo fresco (F. Pérez, comunicación personal). En la práctica en ***L. vannamei*** la ingestión de papilla contaminada con WSSV causa mortalidad en tiempos variables dependiendo de el estado del animal y de el tiempo de conservación de la muestra infectada, así los resultados obtenidos indican que a partir de PL 35 se puede alcanzar una supervivencia de 0,031% en la población frente a un ataque de mancha blanca.

En estudios realizados por Soto et al., (2001) se ha determinado que la carga viral no difiere significativamente en el abdomen y cefalotórax de los camarones infectados con WSSV. Por ende la exposición es aleatoria ya que el virus no está homogéneamente distribuido, considerando que algunos camarones son menos agresivos al alimentarse en el tanque.

A pesar de algunos problemas en las amplificaciones, la utilización de la técnica de PCR permitió obtener las amplificaciones del ADN del camarón y del ADN del WSSV para 300 animales en estudio correspondiente a dos grupos post-infectados y supervivientes, fue posible distinguir algunos productos amplificados característicos de la presencia del virus y que pueden ser considerados como positivos, lo que confirma su utilidad para el diagnóstico de patógenos específicos (Lo *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1998).

Los datos de supervivencia recolectados al término del experimento denotan diferencias altas en porcentajes con respecto a la supervivencia de 18% (Bayot *et al.*, 2000) alcanzado en presencia de mancha blanca, esto indica que los animales supervivientes en piscinas comerciales probablemente no fueron sometidos a cargas virales mortales o que simplemente no entraron en contacto con el virus. Por lo tanto, la utilización de animales supervivientes de piscinas comerciales no sería un medio eficiente para selección de animales resistentes a la mancha blanca, aún cuando se puedan obtener cierto nivel de ganancia genética en este caracter.

9. RECOMENDACIONES

1. El presente trabajo conduce a recomendar un estudio a mayor escala a fin de, por una parte conocer mejor la supervivencia en prejuveniles y juveniles ***L. vannamei*** y, por otra parte aportar con resultados prácticos de los animales seleccionados como reproductores. En base a estos resultados, adaptar los protocolos de selección a condiciones de piscinas comerciales y en lo posible aportar con material genético de negativa carga viral frente a WSSV y/o cualquier epizootia dentro de un proceso de mejoramiento genético bajo condiciones locales.

2. Emprender un estudio acerca de la determinación del parentesco entre individuos no identificados, asignando el correcto par de parentales. Considerando la identificación de los progenitores y su contribución genética será posible seleccionar reproductores resistentes a la mancha blanca y de igual manera su progenie.

3. Emprender el método de infección planteado adaptando el Protocolo a condiciones de estanques locales de tal manera que el productor pueda iniciar un ciclo con animales resistentes y con 0,031% de supervivencia a WSSV en la población a partir de PL 35.

PRESUPUESTO

Presupuesto establecido en la realización de la investigación durante el año 2001

RUBRO	UNIDAD	Cantidad	$ Unitario	$ Total
Post-larva	Millar	500	2.5	1250
Cloro	Kg.	10	5	50
Alimento	Kg.	10	1.5	15
Aquamats	Metro	5	15	75
Piedras difusoras	Piedra	4	5	20
Extracción DNA	muestra	300	0.7	210
Detección WSV	muestra	600	0.2	120
Optimización PCR	muestra	600	0.2	120
TOTAL				1860

Presupuesto del Material utilizado en la Extracción de ADN.

Extracción ADN	Unidad	Cantidad	Presentación	USD	Costo unidad	Costo total
Fenol	Ml	0.25	400	104.625	0.261	0.0653906
Cloroformo	ml	0.7	500	196.3	0.392	0.2748200
Proteinaza K	G	0.0001	1	411	411	0.0411000
TE	Ml	0.0001	1000	4	0.004	0.0000004
Solución CTAB	g	0.00001	1000	200	0.200	0.0000020
Etanol	ml	1.5	500	44.9	0.089	0.1347000
Tubos de 1.5 ml	tubo	4	500	12	0.024	0.0960000
Tubos de 0.5 ml	tubo	1	1000	18	0.018	0.0180000
Puntas de 200 ul	punta	2	1000	13	0.013	0.0260000
Puntas de 1000 ul	punta	4	1000	14	0.014	0.0560000
COSTO POR MUESTRA						0.7120130

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES								
ACTIVIDADES	AÑO 2001 - 2002							
	MES DE EJECUCION							
	SEPT.	OCT.	NOV.	DIC.	ENERO	FEB.	MARZO	ABRIL
1. Recopilación de literatura e incorporación de sugerencias de la C.I.								
2. Análisis de resultados - conclusiones – recomendaciones								
3. Revisión del borrador y presentación del informe final al H.C.D.								
4. Corrección de la tesis - sustentación - incorporación								

BIBLIOGRAFÍA

1. **ALDAY, V.** 1999. Aclaraciones sobre el virus de la mancha blanca y la técnica del PCR. El Mundo Acuícola. 5(4): 6-10.

2. **ALDAY, V.** 1999. Diagnóstico y Prevención de la enfermedad del Punto Blanco. El Mundo Acuícola. 5(1): 3-6.

3. **ARCIER, J.M.**, F. Herman, D.V. Lighner, R.M. Redman, J. Mari & J.R. Bonami. 1999. A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn ***Macrobrachium rosembergii***. Dis Aquat Org. 38:177-181.

4. **BAYOT, B.**, I. Betancourt, F. Panchana & J. Melena. 2000. Monitoreo exploratorio de Patologías de camarón. El Mundo Acuícola. 6(1): 5-7.

5. **CALDERON, V.** 1993. El estado actual de la acuacultura en Ecuador y perfiles de nutrición y alimentación. Programa cooperativo gubernamental FAO-Italia.

6. **CNA**. 1996. Estadísticas. Acuacultura del Ecuador. 15:61.

7. **CNA**. 2000. En vigencia importación de camarón congelado Acuacultura del Ecuador. 40:27-28.

8. **CNA**. 2001. Hacia el mejoramiento de la producción. Acuacultura del Ecuador. 41: 3-4.

9. **CHANG, P. S.**, C. F. L, Y. C. Wang & G. H. Kou. 1996. Identification of White Spot Syndrome associated baculovirus (WSSV) target organs in the shrimp ***Penaeus** monodon* by *in situ hybridization* Dis Aquat Org. 27: 131-139.

10. **CHANG, P. S.**, H. C. Chen & Y. C. Wang 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crap and lobsters by *in situ hybridization*. Aquaculture. 164: 233-242.

11. **CHEN, L. L.**, C. F. Lo, Y. T. Chiu, C. F. Chang, G. H.

Kou. 2000. Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. Dis Aquat. Org. 40: 157-161.

12. **CHOU, H. Y. C. Y.** &G. H. Kou 1998. Studies on transmission of White Spot Syndrome associated Baculovirus in ***Penaeus monodon*** and ***P. japonicus*** via waterborne contact and oral ingestion. Aquaculture. 164:263-276.

13. **CLIFFORD, III H. C.** 1997. Shrimp Farming in Venezuela. World Aquaculture. 28:60-61.

14. **FILOSE, J.** 1999. El siempre cambiante mundo del camarón. Acuacultura del Ecuador. CNA. 34: 47-48.

15. **GERVAIS, N. E.**, F. & Y. Teng. 2000. Patogenicidad del virus de la enfermedad de la "Mancha Blanca" (WSSB) en diferentes líneas genéticas de camarón blanco ***Litopenaeus vannamei***. Acuacultura del Ecuador, CNA. 40: 44.

16. **JAMES, R. F.** 1993. Insect Resistance to Viruses. Parasites and Pathogens of Insects Vol. 2: 197-207.

17. **JONES, K.** 2000. Improving Shrimp Stocks with Micro satellite. Genetic Selection for Viral Resistance. Global Aquaculture Advocate. 3(6): 35-36.

18. **KANCHANPHUM, P.C.,** Wongteerrasupaya, N. Sitidilokratana, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul &T. W. Flegel. 1 998. Experimental Tran mission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp. Dis. Aquat. Org. 34: 1-7.

19. **KASORNCHANDRA, J. S.,** Boonyaratpalin & T. Itami. 1998. Detection of white - spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. Aquaculture. 164: 243-251.

20. **LO, C. F.,** C. H., S. E. Peng, Chen, H. C. Hsu, Y. L. Chiu, C. F. Chang, K. K. Liu, M. Su, C. H. Wang & G.

H. Kou. 1996. White Spot syndrome Baculovirus (WSBV) detected in cultured and capture shrimp, crabs and other arthropods. Dis Aquat Org. 27: 215-225.

21. **LO, C. F.**, J. H. Leu, C. H. Ho, C. H. Chen, S. E. Peng, Y. T. Chen. C. M. Chou, P. Y. Yeh, C. J. Huang, H. Y. Chou, C. H. Wang & G. H. Kou. 1996. Detection of baculovirus associated with White Spot Syndrome Virus (WSSV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction Dis Aquat Org. 25: 133-141.

22. **LO, C. F.**, C. H. Ho, C. H. Chen, K. F. Liu, Y. L. Chiu, P. Y. Yeh, S. E. Peng, H. C. Hsu, C. F. Chang, M. S. Su, C. H. Wang & G. H. Kou, 1997. Detection and tissue tropism of White Spot Syndrome Baculovirus (WSBV) in captured brooders of ***Penaeus monodon*** with a especial emphasis on reproductive organs. Dis Aquat Org. 30: 53-72.

23. **LO, C. F.**, H. C. Hsu, M. F. Tsai, C. H. Ho, S. E. Peng, G. H. Kou & D. V. Lighner 1999 Specific genomic DNA

fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp White Spot Syndrome Virus. Dis Aquat Org. 35: 175-185.

24. **MAEDA, M.**, T. Itami, N. Susuki, O. Henning, M. Kondo, J. D. Albadarejo & Y. Takahashi. 1998 Effect of various treatments on White Spot Syndrome Virus (WSSV) from ***Penaeus japonicus*** (Japan) and ***Penaeus monodon*** (Thailand), Fish Pathology. 33: 381-387.

25. **OTTA, SK.**, G. Shubha, B. J. Joseph, A. Chakraborty, I. Karunasagar & I. Karunasagar. 1999. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. Dis Aquat Org. 38: 67-70.

26. **NEWTON, C. R.** & A. Graham. 1997. PCR Second Edition Bios Scientific Publishers Limited. New York. PP 1-9.

27. **PENG, S. E.**, C. F. Lo, C. H. Ho, C. F. Chang & G. H. Kou. 1998. Detection of white spot baculovirus (WSBV)

in giant freshwater prawn, ***Macrobrachium rosembergii***, using Polymerase chain reaction. Aquaculture. 164: 253-262.

28. **SAHUL HAMEED A. S.**, M. X. Charles & M. Anilkumar. 2000 Tolerance of ***Macrobrachium rosembergii*** The white spot syndrome virus. Aquaculture. 183: 207-213

29. **PANORAMA ACUICOLA** 2000. Panamá Industria Acuícola en Recuperación. 5 (6): 44-48.

30. **PEREZ, F.** 1999. Perspectivas del Mejoramiento del Camarón en Ecuador. El Mundo Acuícola. 4 (2): 28.

31. **SUPAMATTAYA, K.**, R. W. Hoffmann, S. Boonyaratpalin & P. Kanchanaphum. 1998. Experimental Transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from black tiger shrimp ***Penaeus monodon*** to the sand crab ***Portunes pelagicus*** mud crab ***Scylla serrata*** and ***krill Acetes*** sp. Dis Aquat Org. 32: 79-85.

32. **TANG, K. F. J.,** S. V. Durand, B. L. White, R. M. Redman, C. R. Pantoja, D. V. Lighther 2000. Postlarvae and juveniles of a selected line of ***Penaeus stylirostris*** are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. Dis Aquat Org. 190: 203-210

33. **TANG, K. F. J.,** D. Lighther. 200[illegible] . Quantification of WSSV DNA through a comparative PCR Aquaculture [illegible]9: 11-11

34. **TAKAHASHI, Y.,** & T. Aoki 1996. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in ***Penaeid japonicus*** Bate and systemic.

35. **THOMPSON, J. A.** & A. L. Lawrence. [illegible]. An investigation into survivorship and growth rates on al Ecuador shrimp far. Department of large animal medicine and surgery, Texas veterinary Medicinal Center, College Station, T. X., 77843-4475 (409: 845-9158).

36. **TOSHIAKI, I.** 1999 Prevención y control del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en camarón ***kuruma*** en el Japón Acuacultura del Ecuador, CNA. 33: 24-32

37. **TSAI, M. F.,** G. H. & C. F. Lo. 1999-Long-Term presume of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp populatation without disease outbreaks DAO. 38: 107-114.

38. **VAN HULTEN M.,** R. W. Goldbach & J. M. Valk 2000. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. Journal of General Virology. 81: 2525-2529

39. **VAN HULTEN M.,** S. Witteveldt., M. Snippe & J. Vlak. 2001. White Spot Syndrome Virus Envelope Protein VP 28 IS Involved in the Systemic Infection of Shrimp. Virology. 285: 228-233

40. **WYBAN, J.** 1999. Selective Breeding for TSV - resistant Shrimp. The Advocate. 2(6): 30.

10. SUMMARY

A survival study of postlarvas PLs of ***L. vannamei*** White Shrimp was conducted to realize a quantitative and qualitative evaluation of massive infection with WSSV (White Spot Syndrome Virus), that it affected at efficiency productive of the shrimp in laboratory's conditions.

In the concerns to the massive infection the PLs were fed with minced WSSV infected shrimp tissue for 2 days and the PLs were maintained on a pelletized ration (CENAIM 40PP) for the following 35 days. Hight mortalities were observed after of the infection, were established 0,031% of survivals during the experimental period.

The Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to detected the presence of WSSV in the measure that it obtained the viral charge of the extracted DNA the results showed that 119 individuals were positive for

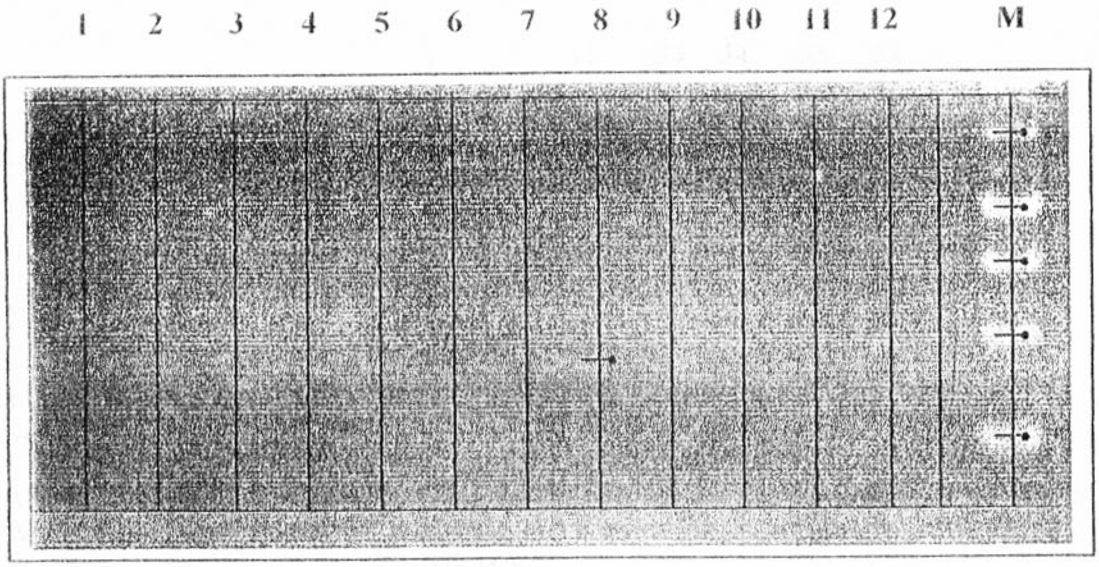
WSSV for both groups post infected and survivals respectively.

In 60 survivals individuals that were amplified by PCR, were detected 43 resistants which were resultated negative for the white spot virus. Since these positive data that were generated by PCR detection were named tolerants to 17 survivals where the virus was detected.

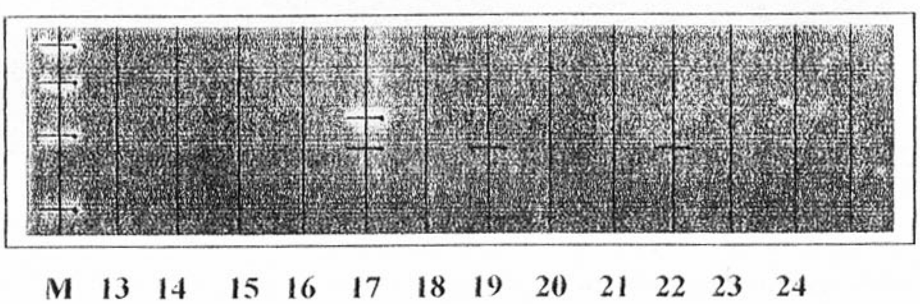
This report describes WSSV challenge study in ***L. vannamei*** PLs for evaluate results of survivals in PL 35 with best capacity of resistance and tolerance to WSSV infection.

ANEXOS

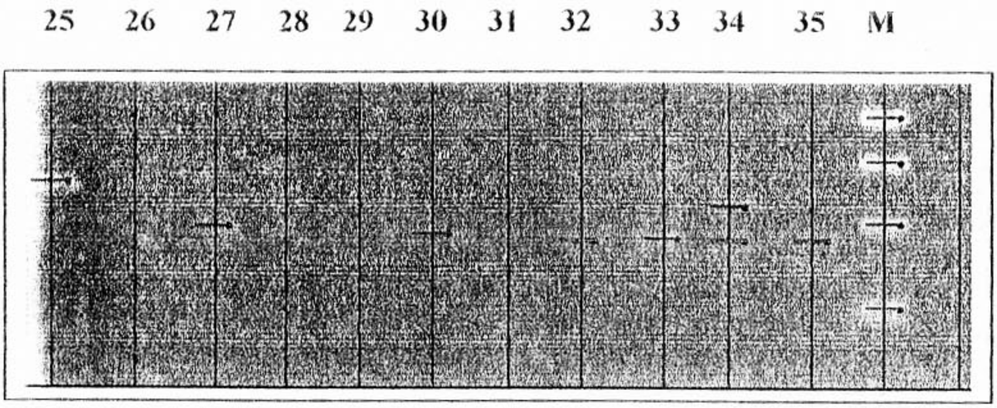
ANEXOS



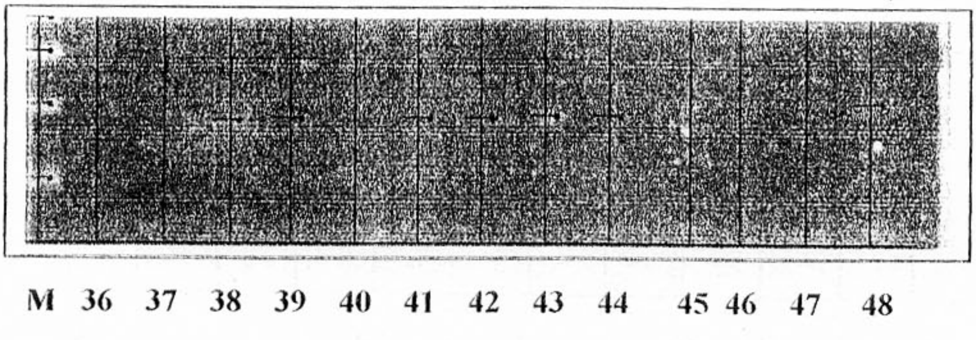
Anexo 1.1. PCR para WSSV en PLs: amplificación de supervivientes, detección de WSSV en individuo 8. M: marcador de peso molecular 1Kb.



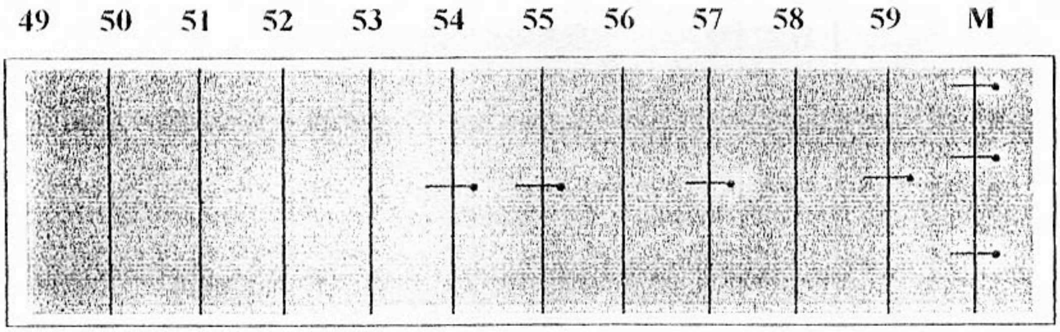
Anexo 1.2. PCR para WSSV en PLs: amplificación de supervivientes, detección de WSSV en individuos 17, 19 y 22. M: marcador de peso molecular 1Kb.



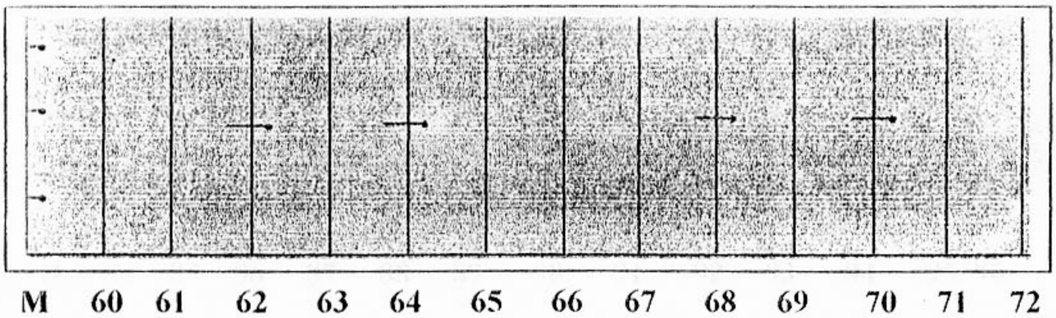
Anexo 1.3. PCR para WSSV en PLs: amplificación de supervivientes, detección de WSSV en individuos 27, 30, 32, 33 ,34 y 35. Amplificación ribosomal en individuo 25. M: marcador de peso molecular 1Kb.



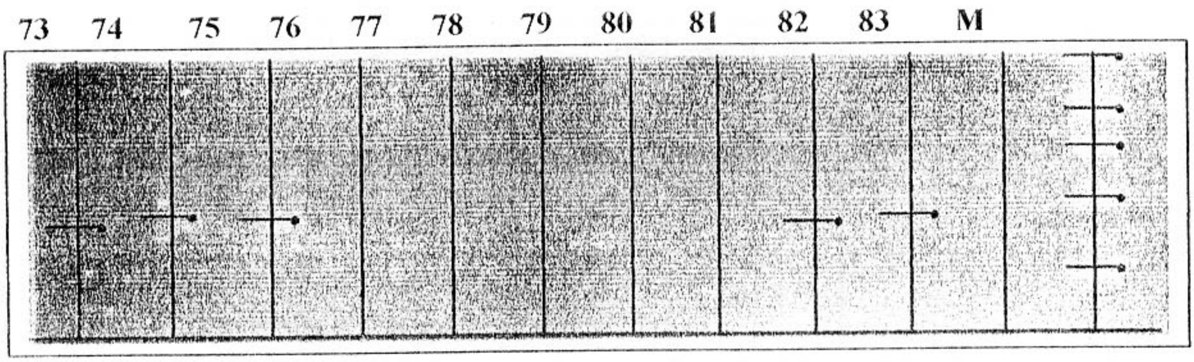
Anexo 1.4. PCR para WSSV en PLs: amplificación de supervivientes, detección de WSSV en individuos 38, 39, 41, 42 ,43, 44 y 48. M: marcador de peso molecular 1Kb.



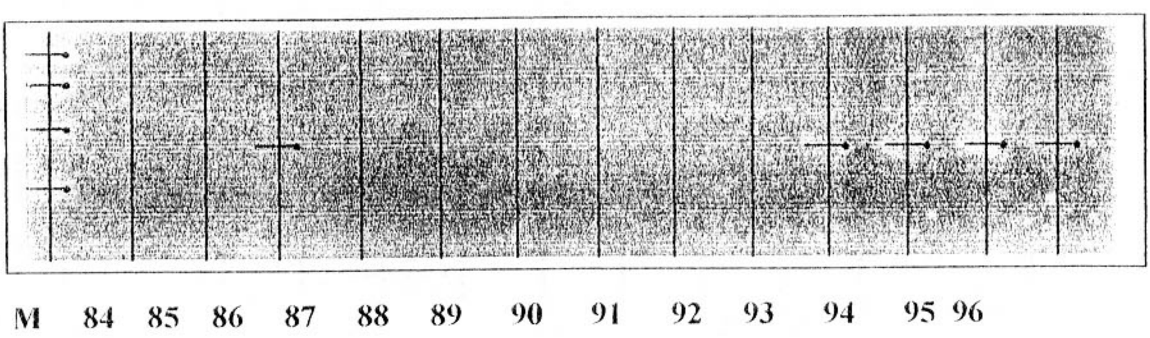
Anexo I.5. PCR para WSSV en PLs: amplificación de supervivientes, detección de WSSV en individuos 54, 55 y 57. M: marcador de peso molecular 1Kb.



Anexo I.6. PCR para WSSV en PLs: amplificación de supervivientes, detección de WSSV en individuos 62, 64, 68 y 69. M: marcador de peso molecular 1Kb.

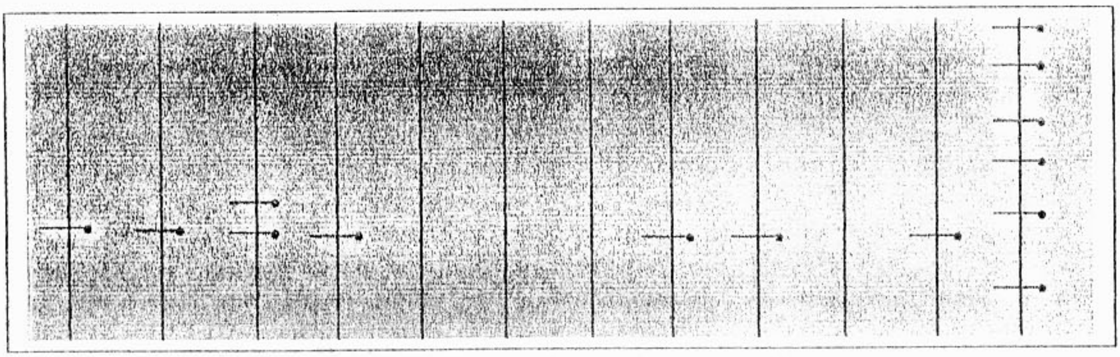


Anexo 1.7. PCR para WSSV en PLs: amplificación de supervivientes, detección de WSSV en individuos 73, 74, 75, 82 y 83. M: marcador de peso molecular 1Kb.

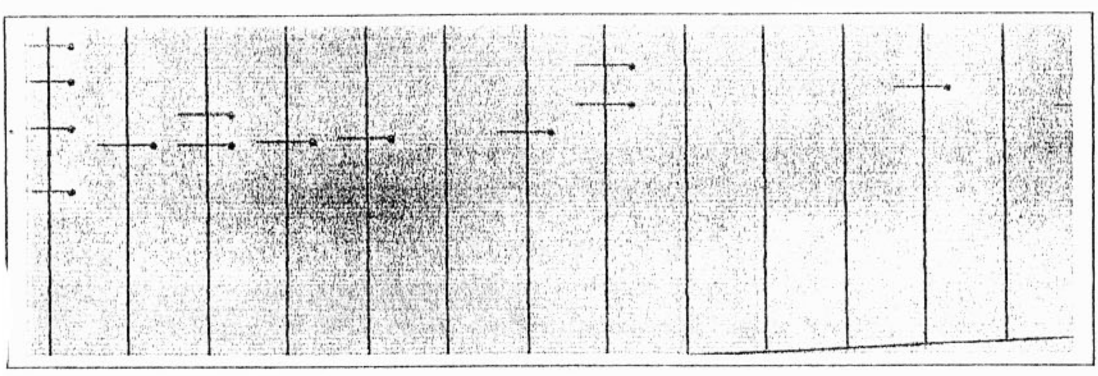


Anexo 1.8. PCR para WSSV en PLs: amplificación de supervivientes, detección de WSSV en individuos 86, 93, 94, 95 y 96. M: marcador de peso molecular 1Kb.

97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 M

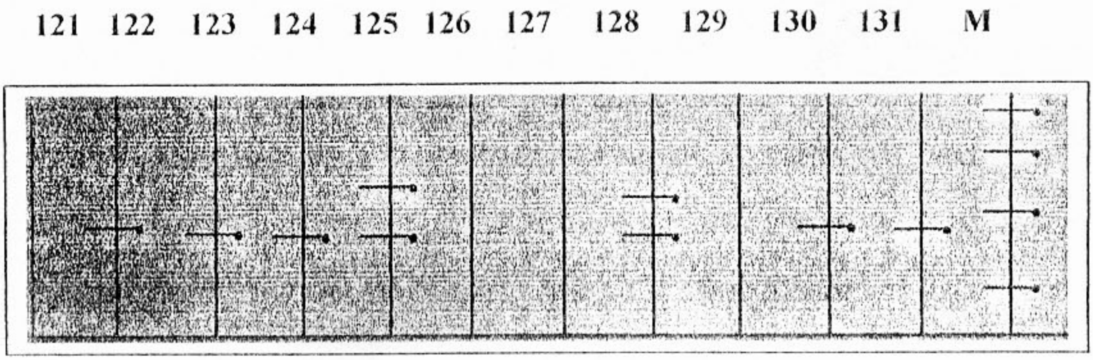


Anexo 1.9. PCR para WSSV en PLs: amplificación de supervivientes, detección de WSSV en individuos 97, 98, 99, 100, 104, 105 y 107. M: marcador de peso molecular 1Kb.

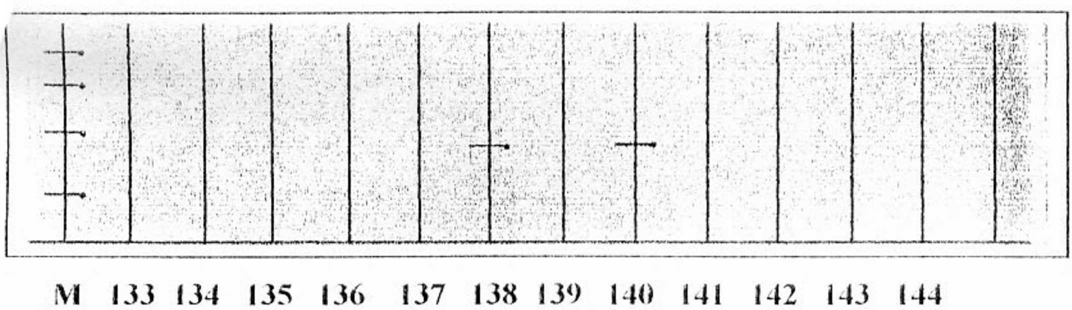


M 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120

Anexo 1.10. PCR para WSSV en PLs: amplificación de supervivientes, detección de WSSV en individuos 108, 109, 110, 111, 113, 114, 118 y 120. M: marcador de peso molecular 1Kb.



Anexo 1.11. PCR para WSSV en PLs: amplificación de supervivientes, detección de WSSV en individuos 122, 123, 124, 125, 128, 130 y 131. M: marcador de peso molecular 1Kb.



Anexo 1.12. PCR para WSSV en PLs: amplificación de supervivientes, detección de WSSV en individuos 138 y 140. M: marcador de peso molecular 1Kb.