ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

"Estudio de la posible infección de *Artemia* con el virus del síndrome de la mancha blanca y su transmisión vertical"

Requisito para optar al grado de

MAGISTER EN CIENCIAS

ESPECIALIDAD ACUICULTURA MARINA

Luis Alejandro Daqui Loureiro

2001

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:

FUNDACION CENAIM-ESPOL

COOPERACION TECNICA BELGA

UNIVERSIDAD DE GANTE BELGICA

UNIVERSIDAD CATOLICA DE LOBAINA – BELGICA

VITA

Luis Alejandro Daqui, Acuicultor graduado en ESPOL en 1999, con la tesis "Identificación de protozoarios parásitos en camarones peneidos cultivados en la Provincia del Guayas – Ecuador, empleando dos técnicas distintas de histología".

DECLARACION EXPRESA

"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL."

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

Luis A. Daqui Loureiro

TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Eduardo Cervantes
Presidente del Tribunal

Victoria Alday-Sanz, Ph.D.
Director de Tesis

Jorge Calderón V., Ph.D.
Miembro del Tribunal

Laurence Massaut, Ph.D.
Miembro del Tribunal

Patrick Sorgeloos, Prof.
Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a las instituciones que permitieron hacer posible la presente tesis: a la Cooperación Técnica Belga por la beca de estudios de postgrado, a INVE del Ecuador por el financiamiento de la tesis y la Fundación CENAIM-ESPOL por el uso de las instalaciones y laboratorios de análisis.

Así mismo se hace extensivo el agradecimiento a las personas que colaboraron con ideas, trabajos científicos, sugerencias y correcciones a los escritos, entre ellos en Ecuador a la Dra Victoria Alday, Oc Irma Betancourt, MSc Franklin Pérez, Dra Jenny Rodríguez, MSc María de Lourdes Cobo, Dra Laurence Massaut, Dr Jorge Calderón, MSc Xavier Romero, Pablo Aquino, MSc José Chang, Fanny Panchana; en Bélgica al Prof. Patrick Sorgeloos, Dr Gilbert Van Stappen, Dr Godelieve Criel; en Estados Unidos de Norteamérica a Dra Rafaela Ruiz; en México a MSc María del Pilar Torres, Dr. Francisco Correa y en Canadá al Dr. John Hobbs.

Finalmente se agradece la colaboración de mis padres Luis Enrique Daqui y Vera Augusta Loureiro, mi esposa Katiuska, y mis compañeros de maestría Ernesto Regueira, Luciano Reginatto, Leonor Rivera, Gabriel Durán, Julián Gamboa, Carlos Aramburu y Mariel Gullian, por su continuo aporte y sentido de lealtad incondicional durante toda la ejecución de la misma.

LISTA DE ABREVIATURAS

BP	Baculovirus penaei
CTAB	cetyl-trimetyl-ammonium bromide
dNTP´s	dinucleotic triphosphate
ELISA	enzime-linked inmunological standard assay
HHNBV	hypodermal and haematopoietic necrosis baculovirus
HPV	hepatopancreatic Parvovirus
IHHNV	infectious hypodermic and haematopoietic necrosis virus
PCR	polymerase chain reaction
PRDV	penaeid rod-shaped DNA virus
RAPD´s	random amplified polymorphic DNA
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
RV-PJ	rod-shaped nuclear virus of *Penaeus japonicus*
SEMBV	systemic ectodermal and mesodermal baculovirus
TAE	solución amortiguadora de Tris, Acetic Acid, EDTA
TBE	solución amortiguadora de Tris, Boric Acid, EDTA
TM	toneladas métricas
TSV	Taura syndrome virus
WSBV	white spot syndrome baculovirus
WSSV	white spot syndrome virus, virus del síndrome de la mancha blanca
YHV/GAV	yellow head virus / gill associated virus

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS

INDICE DE FIGURAS

RESUMEN

Artemia es el principal alimento en larvicultura y reproducción de peces y crustáceos. Su producción esta limitada a unos pocos países mientras que su comercialización se presenta a escala mundial. El virus de la mancha blanca tiene una amplio rango de hospedadores entre los crustáceos por lo que existe la posibilidad de que la *Artemia* sea sensible a la infección. Su amplia distribución internacional tendría implicaciones sanitarias transfronterizas de gran importancia en el control de enfermedades. Este estudio evalúa la posibilidad de infección de *Artemia* con el virus de la mancha blanca. Para ello se cultivó *Artemia* y se estimó la eficacia y sincronía de eclosión de los quistes y se optimizó el nivel de alimentación. El extracto viral se preparó a partir de infecciones experimentales en *Penaeus vannamei* y fue cuantificado por PCR. *P. vannamei* fue utilizado como control de infectividad del extracto. Se efectuaron tres pruebas de desafío con el virus de la mancha blanca, en nauplios, juveniles y adultos a 35 ups y 100 ups de salinidad. Posterior a su reproducción, se colectaron quistes y nauplios para evaluar una posible transmisión vertical. Las muestras fueron analizadas por PCR y por inmunohistoquímica. Se intentó desarrollar un control interno para PCR en el que se amplificara DNA de *Artemia* pero los resultados no fueron satisfactorios. Las muestras recogidas del primer desafío fueron positivas para PCR, pero la infección no pudo confirmarse por inmunohistoquímica, lo que sugiere que la presencia del virus era superficial y no una infección activa. El resto de las muestras fueron negativas tanto para PCR como para inmunohistoquímica, por lo que se pudo concluir que bajo las

condiciones del experimento, *Artemia* no es sensible a infección por el virus de la mancha blanca.

1 INTRODUCCIÓN

La producción acuícola es el resultado de un proceso complejo que envuelve el ambiente, el manejo, los suministros y el mejoramiento genético, siendo importante dirigirla de manera adecuada (Villalón 1991, Brock y Main 1997). Las enfermedades son el factor más limitante en la producción acuícola y se incrementan con la intensificación del sistema de explotación y la mala calidad del agua y suelo (Pillay 1992, Kautsky *et al.* 2000, Walker y Subashige 2000).

La camaronicultura asiática ha decrecido drásticamente debido a una etiología vírica, reportada desde 1992, principalmente en Tailandia, Malasia, Taiwan, China, India, Japón, conocida como virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) (Wongteerasupaya *et al.* 1995, Lo *et al.* 1996b, 1997, Chou *et al.* 1998, Otta *et al.* 1999). Este virus aparece por primera vez en América en 1996 en Estados Unidos en un caso aislado y se presenta de forma generalizada en camaroneras de la costa oeste americana a partir de 1999 (Wang *et al.* 2000).

Este virus es extremamente virulento y tiene un amplio rango de hospedadores y tejidos sobre los cuales desarrolla la infección (Wongteerasupaya *et al.* 1995). Se ha demostrado que puede infectar camarones marinos peneidos, cangrejos, langostas, camarones de agua dulce (Sahul Hameed *et al.* 2000, Corbel *et al.* 2001), y ha sido detectado en copépodos, insectos y *Artemia* (Otta *et al.* 1999, Hossain *et al.* 2001, Chang *et al.* comunicación personal).

Artemia, rotíferos, microalgas y algunos copépodos son el principal alimento suministrado a larvas de camarones peneidos durante los primeros estadíos. *Artemia* es el alimento más versátil para los estadíos larvales de crustáceos y peces y ha sido empleada ampliamente en alimentación de especies comerciales en las últimas dos décadas (Ribeiro y Jones 1998, Sorgeloos *et al.* 1998).

Biomasa enriquecida de *Artemia* también es empleada para obtener altas frecuencias de desove, mejorar los niveles de maduración de reproductores de *Penaeus vannamei*, y mejorar la calidad larvaria (Wouters *et al.* 1999). Metanauplio II es usado como un mejorador del crecimiento en los estadíos post-larvales, obteniendo mejores resultados en el control de calidad de larvas (Sorgeloos *et al.* 1998).

Artemia también se emplea como vehículo de hormonas, suministros nutricionales (Sorgeloos *et al.* 1998), antibióticos (Majack *et al.* 2000) y como vector de bacterias patógenas para realizar infecciones experimentales en camarones peneidos (Roque *et al.* 2000). Los ensayos experimentales por bioencapsulación de *Vibrio parahaemolyticus* en *Artemia* para infectar *P. vannamei* demostraron que puede ser una vía efectiva para producir enfermedad sin necesidad de contacto del camarón con la bacteria en forma de baño.

Este estudio intenta evaluar la posible infección de *Artemia* con WSSV y su transmisión vertical basándose en el amplio rango de hospedadores que tiene este virus entre los crustáceos y su previa detección en gónadas de camarones peneidos. Siendo la *Artemia* el principal alimento vivo en larvicultura de camarones y que se distribuye internacionalmente, la posible infección tendría implicaciones sanitarias de gran relevancia para los sistemas de producción y de movimiento de patógenos a través de fronteras.

2 ANTECEDENTES

2.1 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE VIRUS

Existen diferentes técnicas para la detección de virus: reconociendo los cambios que provoca en los tejidos (histopatología), por la detección morfológica del virus (microscopía electrónica), usando anticuerpos contra el virus producidos en otros animales (ELISA e inmunohistoquímica) o por la detección del ADN del virus (PCR e hibridación *in situ*) (Mialhe *et al.* 1992). Estas últimas son técnicas muy sensibles que permite detectar infecciones subclínicas. Wiedbrauk y Farkas (1995), Itami *et al.* (1998), Lightner y Redman (1998), Walker y Subasinghe (2000), presentan extensas revisiones sobre las ventajas de los métodos basados en ADN sobre los métodos clásicos, siendo la técnica de PCR más sensible y más comúnmente utilizada.

La PCR es una técnica de amplificación de ADN desarrollada en 1986 (Mialhe *et al.* 1992). En acuacultura es empleada para secuenciar ADN, detectar ADN de virus, bacterias e invertebrados y diagnosticar enfermedades (Lightner y Redman 1998, Walker y Subasinghe 2000). Su uso está recomendado para el diagnóstico de infecciones asintomáticas o certificaciones de reproductores libres de patógenos o larvas. Existen variaciones de la técnica de PCR tales como PCR anidado en que hay dos pasos de amplificación de ADN o RT-PCR que es utilizado para la detección de patógenos ARN (Nunan *et al.* 1998). En este caso, hay un paso anterior en el que se traduce un fragmento de ARN a ADN y se continua con la amplificación de este nuevo fragmento de ADN (Nunan *et al.* 1998). Esta técnica ya esta disponible para la mayoría de los virus que afectan a camarón tales como Taura Syndrome Virus (TSV), Infectious Hypodermal & Haematopoietic Necrotic Virus (IHHNV), Baculovirus (BP), Monodon Baculovirus (MBV), virus de la mancha blanca (WSSV), Yellow Head Virus/Gill

Associated virus (YHV/GAV), y Hepatopancreatic Parvovirus (HPV) (Lotz 1997, Lightner y Redman 1998, Walker y Subasinghe 2000).

WSSV immunohistochemistry ShrimProbe® es un kit desarrollado por Diagxotics para determinar la ubicación exacta del ADN del virus sobre cortes histológicos usando anticuerpos monoclonales específicos para WSSV (Lightner y Redman 1998). Un segundo anticuerpo conjugado a una enzima es añadido en un segundo paso y la reacción es revelada con el uso de un substrato que genera una reacción colorimétrica en los núcleos de las células infectadas (Diagxotics 2000).

2.2 NOMENCLATURA DE WSSV

WSSV fue descrito por varios investigadores en un mismo periodo de tiempo, por lo que recibió varios nombres:

-HHNBV: Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Baculovirus en China (Huang *et al.* 1995)

-RV-PJ: Rod-shaped nuclear virus de *Penaeus japonicus* en Japón (Inouye *et al*. 1994)

-SEMBV: Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus en Tailandia (Wongteerasupaya *et al.* 1995)

-WSBV: White Spot Baculovirus en Taiwan (Chou *et al.* 1995)

Finalmente, el nombre que se ha aceptado por la mayoría de los investigadores es Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (Nunan y Lighter 1997).

2.3 MORFOLOGÍA Y PATOGENICIDAD DEL WSSV

Los viriones de WSSV son bacilos de gran tamaño (276x121nm) (Kasornchandra *et al.* 1998) con un apéndice y su afectación incluye un amplio rango de hospedadores como se definen en el acápite 2.5 de esta tesis.

Los signos externos de la enfermedad son manchas blancas sobre el carapacho, apéndices y en el interior de la cutícula en todo el cuerpo. Se presenta una mortalidad de hasta el 100% entre 3 a 7 días desde la aparición de los primeros síntomas (Chang *et al.* 1998a, Otta *et al.* 1999, Wang *et al.* 2000).

Los tejidos afectados son todos aquellos de origen ectodérmico y mesodérmico, especialmente en el epitelio subcuticular de la epidermis, del estómago, branquias, cutícula entre otros (Wongteerasupaya *et al.* 1995).

WSSV forma cuerpos de inclusión en los núcleos de las células afectadas. Los núcleos de las células infectadas son hipertróficos y pasan por dos estadíos, en el primero el núcleo se describe como cuerpo de inclusión tipo Cowdry A y al madurar se observa dos o tres veces mayor a un núcleo normal con la cromatina marginada y de aspecto basofílico. (Lo *et al.* 1997, Kasornchandra *et al.* 1998, Tsai *et al.* 1999).

2.4 VÍAS DE TRANSMISIÓN DEL VIRUS

Chou *et al*. (1998) estudiaron tres vías de infección para WSBV en *Penaeus monodon* y *P. japonicus*: inyección, contacto con cuerpos de agua contaminados e ingestión oral de partículas virales de tejidos infectados. En el estudio concluye que estas tres vías son efectivas para infectar las especies empleadas para el estudio.

La presencia del ADN de WSSV en las gónadas, principalmente en el tejido conectivo de camarones y cangrejos, sugiere fuertemente que el WSSV puede tener transmisión vertical (Lo *et al.* 1997, Chang *et al.* 1998a, Tsai *et al.* 1999). Existe la posibilidad de transmisión vertical del virus en la superficie del huevo: "*per ovum*", pero no se ha demostrado una transmisión dentro del huevo "*intra ovum*" ya que los óvulos que se han detectado infectados degeneran (Lo *et al.* 1997). Esto permite reducir el riesgo de transmisión a través de lavado de los huevos (Tsai *et al.* 1999; Mushiake *et al.* 1999).

Lo *et al* (1997) detectaron WSSV ADN por PCR, hibridación *in situ* y microscopía electrónica, en ovarios de *P. monodon* y en los nauplios descendientes de estas hembras. Los resultados del estudio sugieren que solamente los reproductores sanos o ligeramente infectados pueden desovar de manera efectiva y que el WSBV es altamente virulento para reproductores durante este período. Los ovarios que presentaban reacción positiva tenían células positivas mucho menores a las no infectadas, que sugerían que los oocitos infectados habían degenerado y no eran viables. Los autores concluyen que el virus no puede ser transmitido por los reproductores a través de los huevos pero podría serlo al liberar las partículas virales presentes en el tejido conectivo del ovario y estas ser ingeridas por las larvas durante el cultivo.

2.5 DETECCIÓN DE ADN DE WSSV E INFECCIONES EXPERIMENTALES EN CAMARONES MARINOS, COPÉPODOS, CANGREJOS, CAMARONES DULCEACUÍCOLAS E INSECTOS

Se han publicado una serie de trabajos que demuestran la infección de camarones peneidos, cangrejos, langostas y otros crustáceos a partir de extractos virales producidos a partir de cangrejos infectados, camarones peneidos infectados o baños con partículas virales en suspensión. Para la presente se han tomado algunos que demuestran los hospedadores del virus o infecciones experimentales en diferentes organismos:

Kanchanaphum *et al.* (1998) demostraron que es posible infectar *P. monodon* con WSSV a partir de extractos virales provenientes de cangrejos enfermos. En sus ensayos empleó *Sesarma sp.*, *Scylla serrata*, *Uca pugilator* infectados que cohabitaban acuarios con camarones sanos. Al cabo de 10-11 días se presentaron los síntomas y murieron. La infección fue demostrada por histología y PCR.

Lo *et al.* (1996a) detectaron ADN de WSSV en camarones cultivados, camarones salvajes, cangrejos y artrópodos, empleando PCR. Las especies examinadas incluían *P. monodon, P. japonicus, Penaeus penicillatus, Penaeus semisulcatus, Metapenaeus ensis, Macrobrachium rosenbergii, Charybdis feriatus, Portunus pelagicus y P. sanguinolentus, Helice tridens*, copépodos e insectos Ephydridae.

Wang *et al.* (1998) infectaron experimentalmente *M. ensis*, *Exopalaemon orientalis*, *P. monodon, P. japonicus, P. penicillatus, Procambarus clarkii y Trachypenaeus curvirostris* con WSSV, y encontraron altas tasas de mortalidad. Las detecciones fueron efectuadas por PCR.

Otta *et al.* (1999) examinaron algunos crustáceos cultivados y salvajes en India empleando PCR simple y anidada para WSSV. Encontraron que se presentaban reacciones positivas en *S. serrata*, *Sesarma oceanica*, *Charybdis cruciata*, *Matuta planipes*, *Artemia*, *P. japonicus* y *P. monodon*, aún cuando en algunos casos los síntomas externos daban apariencia saludable.

Corbel *et al.* (2001) infectaron experimentalmente a crustáceos europeos con WSSV, demostrando la infección con microscopía electrónica, dot blot, hibridación *in situ* y PCR. Los crustáceos presentaron elevadas mortalidades entre 7 y 21 días y en algunos casos el 100% de mortalidad. Las especies estudiadas fueron *Liocarcinus depurator*, *L. puber*, *Cancer pagurus*, *Astacus leptodactylus*, *Orconectes limosus*, *Palaemon adspersus* y *Scyllarus arctus*. Los autores concluyen que la infección demuestra el potencial epizoótico que tiene el virus en los crustáceos europeos.

2.6 DETECCIÓN DE ADN DE WSSV E INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN *Artemia*

Otta *et al.* (1999) evaluaron dos técnicas publicadas de PCR, simple y anidada, para la detección de WSSV en larvas y reproductores de *P. monodon* y otros crustáceos potenciales portadores del virus. En sus estudios encontraron que una muestra de *Artemia* que era positiva por PCR para WSSV, fue tomada de un tanque que dió resultados negativos, y especula sobre si esta está contaminada con WSSV por una posible infección o simplemente contaminada durante el manipuleo de la eclosión. Finalmente indican que *Artemia* puede ser una potencial vía de exposición de WSSV a las larvas.

Chang *et al.* (comunicación personal) encontraron reacciones positivas de PCR a WSSV en cinco lotes de quistes de *Artemia*, cosechados en 1987, 1997-1998 y 1999. Después de eclosionar los quistes y alimentar postlarvas de *P. monodon*, se evaluó la presencia del virus en nauplios de *Artemia* y larvas de camarón sin encontrar reacciones positivas. En el estudio se concluye que el ADN de WSSV podría estar en la superficie de los quistes y que los lavados empleados para la eclosión lo eliminarían.

Con los antecedentes presentados con anterioridad, se plantean para la presente tesis los siguientes objetivos:

Demostrar si *Artemia* puede ser infectada con WSSV a través de la ingestión oral de partículas virales a 35 ups y 100 ups de salinidad.

Demostrar si es posible la transmisión vertical del WSSV a quistes y/o nauplios.

Reconocer histología normal de *Artemia* y posibles histopatologías.

Obtener entrenamiento en las técnicas de PCR e inmunohistoquímica para la detección de WSSV en *Artemia*.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 USO DE *Artemia* COMO ANIMALES EXPERIMENTALES

Artemia es un organismo que tiene diapausa en su proceso embriológico y su eclosión es determinada por diferentes factores tales como el ambiente, tiempo de recolección, método de empacado, método de decapsulación y especie (Lavens y Sorgeloos 2000b). En primer lugar se estudió la eficiencia y sincronía de la eclosión de los quistes para estandarizar el proceso de obtención de animales experimentales para cada prueba. El siguiente paso fue la optimización del nivel de alimentación.

3.1.1 Estimación de la eficiencia y sincronía de la eclosión de quistes de *Artemia*

Para estimar el número de quistes por gramo, la eficiencia de eclosión y la tasa de eclosión se empleó la metodología estándar empleada por la Fundación CENAIM-ESPOL, presentada en el anexo 1.

Dos lotes de quistes fueron empleados para la tesis, proporcionados uno por el Artemia Reference Center (ARC) y otro por Inve del Ecuador. El primer lote se empleó en los dos ensayos preliminares de caracterización y pruebas de desafío y el segundo lote en los ensayos finales.

3.1.2 Optimización del nivel de alimentación

El alga elegida fue *Tetraselmis maculata*. Cinco niveles diarios de alimentación $0{,}5x10^5$, $1{,}0x10^5$, $1{,}5x10^5$, $2{,}0x10^5$ y $2{,}5x10^5$ células/*Artemia* fueron empleados para determinar la mejor tasa de alimentación en nauplios de 48h de eclosión. La evaluación se realizó a las 24 h.

Nauplios para cada ensayo se obtuvieron a partir de 2 g de quistes. Estos fueron desinfectados (Cotteau *et al.* 1992), decapsulados (Bruggeman *et al.* 1980) y eclosionados (Sorgeloos *et al.* 1986). Se suministró fuerte aireación e iluminación de

2000-lux (Sorgeloos 1972). Después de 24 horas de incubación y 24 horas de acondicionamiento a 35 ups y 100 ups, se alimentó con las dosis de algas *T. maculata* a las concentraciones propuestas (Cotteau *et al.* 1992).

3.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE WSSV

3.2.1 Preparación del extracto viral

El extracto viral empleado se preparó a partir de *P. vannamei* infectado experimentalmente siguiendo la metodología de Melena *et al.* (2000). El extracto se realizó a partir de 450 juveniles inyectados con un extracto viral anterior. Los animales se recolectaban cuando parecían moribundos y congelados a –80°C hasta que se realizo el extracto. Los tejidos con mayor tasa de infección (epitelio subcuticular y branquias) fueron macerados 1:5 con solución amortiguadora Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) pH 7,5 y homogenizados a 45 µm en un biohomogenizador Ultraturrax. El extracto resultante se conservó a –80ºC hasta su utilización para evitar la inactivación del virus. Muestras de 200 µL de extracto viral fueron tomadas para su análisis por PCR. Se prepararon tres extractos virales, a lo largo de este estudio: el 22 de noviembre del 2000, el 10 de enero del 2001 y el 21 de agosto del 2001 siguiendo el mismo protocolo.

3.2.2 Cuantificación relativa de partículas virales por PCR

La cuantificación del extracto viral se realizó basándose en los límites de detección del PCR empleando los iniciadores para WSSV publicados en Lo *et al.* (1996b). La extracción del ADN se efectuó siguiendo el método de CTAB como se describe en el acápite PCR de esta tesis. Se prepararon 8 diluciones sucesivas del ADN extraído en agua nanopura y cada una de estas diluciones fue analizadas por PCR.

3.2.3 Control de infectividad del extracto viral

El control de infectividad del extracto viral fue realizado inyectando *P. vannamei* con el extracto para producir a su vez nuevos extractos. La infección con WSSV fue confirmada por PCR (utilizando el kit IQ2000 para WSSV) e histología.

3.3 DESAFÍOS EXPERIMENTALES DE *Artemia* CON WSSV

Se realizaron dos ensayos preliminares y un ensayo final. Se utilizaron dos salinidades 35 ups y 100 ups y una temperatura 21-26^{o}C. La salinidad de 35 ups fue elegida por ser adecuada para la sobrevivencia del virus y la *Artemia* y la de 100 ups por ser adecuada para la *Artemia* pero no para el WSSV ya que se inactiva con un 15% de NaCl (Maeda *et al.* 1998). En la tabla 1 se presentan las características de los 3 ensayos efectuados.

3.3.1 Ensayo preliminar de desafío con dos concentraciones de extracto viral de WSSV en nauplios de 3 y 8 días de edad a 35 ups de salinidad

La unidades experimentales, 16 botellas de cristal de 3 L de forma cuadrada, fueron mantenidas en baños termales a 26ºC, de tal manera que se aplicó un diseño monofactorial aleatorio. El tamaño de la muestra recogida fue determinado para detectar el 20% de prevalencia de una población de 4.000 animales empleando el software de epidemiología Win Episcope disponible en el website de la Universidad de Zaragoza (de Blas *et al.* 1998).

Para la eclosión y los ensayos se empleó agua de mar a 35 ups y una densidad de 4.000 nauplios de 72 h/L, alimentados cada 24 horas de acuerdo a los resultados de la sección 3.1.2 "Optimización de los niveles de alimentación". Las pruebas de desafío siguieron las recomendaciones de Makridis *et al*. (2000). Se utilizaron dos concentraciones virales diferentes, en uno de los ensayos se inoculó 1 mL del primer extracto viral y en el otro 2 mL del mismo extracto. Se extendió el tiempo de exposición al extracto a 72 horas para facilitar que el virus pueda ingresar en la *Artemia*. Durante este período no se administró alimento.

Tabla 1.- Detalle de ensayos efectuados

Características del ensayo	**Primer ensayo preliminar**	**Segundo ensayo preliminar**	**Ensayo final**
Estadíos desafiados			
nauplios	si	si	si
juveniles	no	si	si
adultos	no	no	si
Salinidad (ups)	35	35 y 100	35 y 100
Densidad (*Artemia*/botella)	4.000	15.000	5.000
Recambio de agua postdesafío	no	si	no
Extracto viral empleado (mL)			
primero	1 y 2		
segundo		0,3	0,3
tercero			2x0,5
Alimentación			
algas frescas	no	si	si
algas centrifugadas	si	no	no
culture selco	no	si	si
Muestras			
PCR	si	si	si
Inmunohistoquímica	si	si	si

Se mantuvieron 4 réplicas para cada tratamiento incluyendo los controles no desafiados a las que se añadió extracto de tejido de camarón WSSV PCR negativo. Los quistes de los que se originaron los animales fueron chequeados por PCR.

Las muestras se recolectaron filtrando el agua de botellas por una malla nylon de 150 µm. Las muestras para PCR fueron congeladas a –80ºC hasta su análisis. Las muestras para inmunohistoquímica fueron fijadas por inmersión en Davidson durante 48 horas y luego transferidas a etanol 70% hasta su procesamiento (Lightner 1996).

Una vez finalizado el muestreo, se realizó un recambio total de agua para eliminar las partículas virales y se continuó el curso de las pruebas de desafío, alimentándolas según Cotteau *et al.* (1992).

3.3.2 Ensayo preliminar de desafío con extracto viral de WSSV en nauplios y juveniles de 5 y 16 días a 35 ups y 100 ups de salinidad

Para este ensayo se empleó la misma metodología que en el ensayo anterior, manteniendo *Artemia* a dos salinidades: 35 ups y 100 ups. Se añadieron 0,3 mL de extracto en cada botella de 3 L y se hizo un recambio de agua 30 h después. Se mantuvieron 3 réplicas para cada tratamiento incluyendo los controles no desafiados a las que se añadió extracto de tejido de camarón WSSV PCR negativo. La prueba de desafío se efectuó los días 5 y 16 del cultivo, y las muestras fueron colectadas para PCR e inmunohistoquímica 60 h postdesafío. Los quistes de los que se originaron los animales fueron chequeados por PCR.

3.3.3 Ensayo final de desafío con extracto viral del WSSV en nauplios, juveniles y adultos de 5, 16 y 22 días a 35 ups y 100 ups de salinidad

En la ultima prueba se utilizaron 1.333 nauplios/L a 21^{o}C y se alimentó a base de *Tetraselmis maculata* y Culture Selco (0,25g culture selco/botella/día). Los animales fueron mantenidos a dos salinidades: 35 ups y 100 ups. La *Artemia* fue desafiada en tres ocasiones: a los 5, 16 y 22 días, con 0,3, 0,5 y 0,5 mL de extracto viral respectivamente (ver Fig. 1). El tiempo de exposición al virus fue de 48 h para el primer desafío y 60 h para el segundo y tercero. No hubo recambio de agua previo a la recolección de la muestra. En ese momento los animales fueron recogidos para examen por PCR e inmunohistoquímica. Las muestras se recolectaron filtrando el agua de botellas por una malla nylon de 150 µm para el caso de nauplios y juveniles y de 300 µm para los adultos.

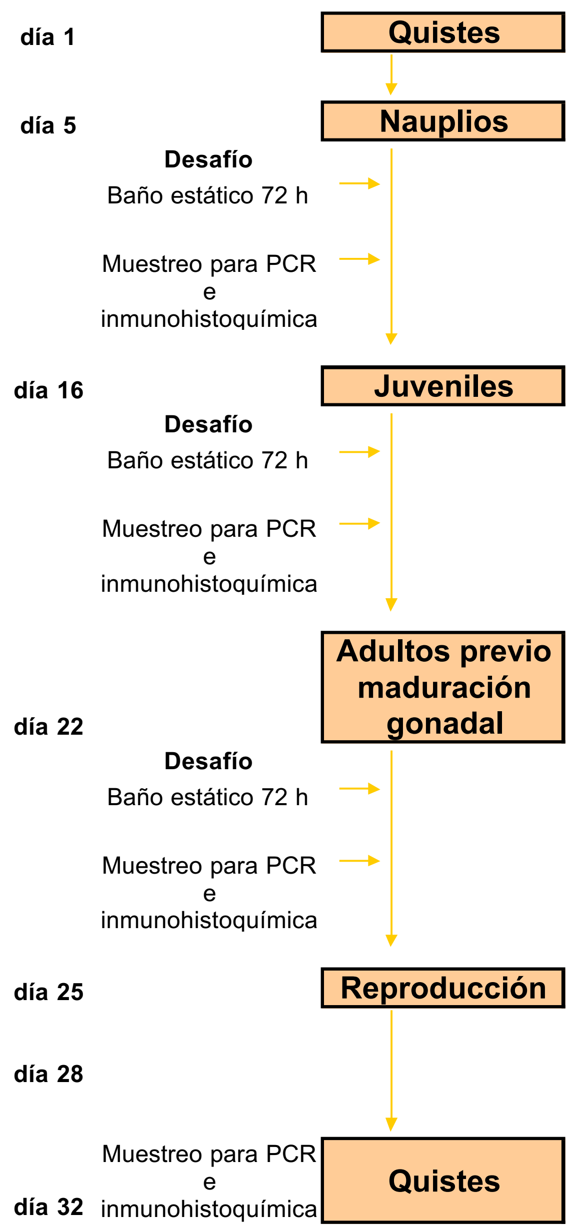

Figura 1. Esquema de desafío final

Los animales restantes se mantuvieron para obtener quistes y nauplios que fueron examinados en el día 31. Se mantuvieron 4 réplicas para cada tratamiento incluyendo los controles no desafiados a las que se añadió extracto de tejido de camarón WSSV PCR negativo. Los quistes de los que se originaron los animales fueron chequeados por PCR.

3.4 DETECCIÓN DE WSSV EN *Artemia* POR PCR E INMUNOHISTOQUÍMICA

3.4.1 PCR

El ADN de las muestras fue extraído empleando el protocolo de fenol:cloroformo:alcohol isoamil 25:24:1 según se describe en Clapp (1996) y Wongteerasupaya *et al.* (1995), sustituyendo el buffer lysis con amortiguador de lisis CTAB. El ADN fue resuspendido en 200 µL de agua miliQ esterilizada y la densidad óptica cuantificada según se describe en la sección 3.4.3 "Cuantificación de ADN por espectrofotometría".

Reacciones de PCR anidadas fueron llevadas a cabo para detectar la presencia de ADN viral en las muestras de *Artemia* siguiendo el protocolo de Lo *et al.* (1996b) en un termociclador Peltier modelo PTC-200. Se utilizaron tubos de pared fina de 200 µL. Los ingredientes de las reacciones para el primer y segundo paso de amplificación están descritas en la tabla 2. El protocolo de amplificación siguió la metodología de Lo *et al.* (1996b)

Las soluciones resultantes de la PCR fueron mezcladas con 4 µL de solución coloreada para cargar geles de electroforesis 6X y corridas en geles de agarosa al 2%, en solución amortiguadora Tris-ácido acético-EDTA (TAE) 1X, por 40 minutos. Posteriormente, los geles fueron teñidos en 0,1% bromuro de etidio (Davis *et al.* 1986). Las bandas fueron detectadas y comparadas con los positivos de ADN extraídos de camarones inf64ectados y con un marcador estándar de 1Kb (Gibco BRL, USA), buscando las bandas de 941 bp y 1441 bp de virus.

Tabla 2.- Soluciones de PCR empleadas para la detección del ADN viral de WSSV

PCR WSSV 1er paso		**PCR WSSV 2do paso**	
Agua miliQ estéril	15,70 µL	Agua miliQ estéril	15,65 µL
Buffer para PCR 10X	2,5 µL	Buffer para PCR 10X	2,5 µL
Cloruro de magnesio 25 mM	1,5 µL	Cloruro de magnesio 25 mM	1,5 µL
dNTP´s 10 mM	0,5 µL	dNTP´s 10 mM	0,5 µL
TAQ (5 u/µL)	0,2 µL	TAQ (5 u/µL)	0,2 µL
Iniciador 146F1	1,22 µL	Iniciador 146F2	1,05 µL
Iniciador 146R1	1,38 µL	Iniciador 146R2	1,10 µL
ADN extraído	2,0 µL	ADN PCR WSSV 1er paso	2,5 µL

3.4.2 Desarrollo del control interno

Para la amplificación de ADN de *Artemia* se probaron varios iniciadores por medio de RAPD´s (reacciones de PCR con un sólo primer de 10bp), que generan patrones de bandas aleatorios según los fragmentos amplificados. Los iniciadores probados incluyen los de Bossier *et al.* (1998), Eric1RA, García *et al.* (1994), opa9 y opa10, el control interno del fragmento 18S del ADN ribosomal de crustáceos decápodos (Lo *et al.* 1996b) y uno (ARDIS1AD) diseñado a partir de una región no codificante del ADN ribosomal de *Artemia* (GeneBank accession number X06395). La composición de las soluciones de PCR se encuentra en la tabla 3. Se utilizó ADN bacteriano de la cepa ILI (*Vibrio* spp.-CENAIM) como control.

El protocolo de amplificación, sigue los esquemas tradicionales de análisis para RAPD´s (Michelis y Bova 1997): 94ºC por 1 min, 40 ciclos de [94ºC por 30 s; 46ºC por

Tabla 3.- Soluciones de PCR empleadas en RAPD´s para el control de calidad del ADN extraído

RAPD´s de un solo iniciador: Bossier (1998), García *et al.* (1994),		RAPD´s de dos iniciadores: ARDIS1AD	
Agua miliQ estéril	11,3 µL	Agua miliQ estéril	13,56 µL
Buffer para PCR 10X	2,6 µL	Buffer para PCR 10X	2,6 µL
Cloruro de magnesio 25 mM	2,1 µL	Cloruro de magnesio 25 mM	2,1 µL
dNTP´s 10 mM	0,5 µL	dNTP´s 10 mM	0,5 µL
TAQ (5 u/µL)	0,2 µL	TAQ (5 u/µL)	0,2 µL
Iniciador RAPD´s 5 µM	4,2 µL	Iniciador 1	0,97 µL
ADN extraído	4,1 µL	Iniciador 2	0,97 µL
		ADN extraído	4,1 µL

3.4.3 Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Muestras de ADN fueron diluídas 1:20 y leídas a 230 nm, 260 nm, 280 nm y 320 nm en una calculadora de ADN/ARN marca Pharmacia modelo GeneQuant, para determinar los niveles de pureza y la concentración de ADN en ng/uL (Michelis y Bova 1997).

3.4.4 Uso de diferentes iniciadores

Para la detección de WSSV en la *Artemia* se utilizaron los iniciadores y protocolo de Lo *et al.* (1996b) excepto para el segundo desafío del ensayo final que se utilizaron los iniciadores y protocolos de Kimura *et al.* (1996). Los ingredientes de la reacción del protocolo de Kimura *et al.* (1996) en un PCR anidado en un solo tubo están descritos en la tabla 4 y los productos amplificados se corrieron en geles de agarosa al 2% como se ha mencionado en la sección 3.4.1 “PCR”.

Tabla 4.- Solución de PCR para detección del WSSV con iniciadores de Kimura *et al.* (1996)

PCR WSSV 1er paso		**PCR WSSV 2do paso**	
Agua miliQ estéril	10,02 µL	Agua miliQ estéril	10,02 µL
Buffer para PCR 10X	1,30 µL	Buffer para PCR 10X	1,30 µL
Cloruro de magnesio 25 mM	0,78 µL	Cloruro de magnesio 25 mM	0,78 µL
dNTP´s 10 mM	0,26 µL	dNTP´s 10 mM	0,26 µL
TAQ (5 u/µL)	0,103 µL	TAQ (5 u/µL)	0,103 µL
primer F	0,14 µL	primer F	0,14 µL
primer R	0,14 µL	primer R	0,14 µL
ADN extraído	1,0 µL	ADN PCR WSSV 1er paso	14,0 µL

3.4.5 Inmunohistoquímica

Para la examinación histológica e inmunohistoquímica se tomaron en cada muestreo aproximadamente 10.000 quistes, de 100 a 150 nauplios, de 25 a 100 juveniles, y 10 adultos fijando sus tejidos por inmersión en fijador Davidson durante 48 h y luego en etanol 70% hasta su procesamiento. La inclusión en parafina se ejecutó siguiendo las descripciones de Lightner (1996). Cinco láminas de 6 µm fueron preparadas de cada bloque, dos de ellas sobre placas cargadas positivamente (Superfrost/plus®, Fisherbrand) para inmunohistoquímica y tres sobre placas convencionales para histología normal.

3.4.5.1 Histología normal

Las laminas de tejido en placas normales fueron desparafinadas, hidratadas y teñidas con hematoxilina de Mayer´s por 15 min y contrateñidas con eosina-floxina por 2 min, para comparar los resultados de la inmunohistoquímica con la tinción estándar (Wang *et al.* 1999).

3.4.5.2 Inmunohistoquímica

Los tejidos sobre placas cargadas positivamente se emplearon para inmunohistoquímica usando el kit de Diagxotics ShrimProbe: Immunohistochemistry for the WSSV detection, siguiendo el protocolo del fabricante, incluyendo un lavado con peróxido de hidrógeno justo después de la hidratación y antes del acondicionamiento del tejido con PBS (Ausubel *et al.* 1992; Diagxotics 2000), para eliminar la acción de las peroxidasas innatas del tejido. Como control positivo se utilizaron secciones de camarones *P. vannamei* infectados con WSSV.

Las placas fueron observadas en microscopio de luz con sistema de campo claro. La reacción positiva se observa como precipitados de color morado a negro sobre el tejido. La contratinción se realizó con eosina-floxina.

4 RESULTADOS

4.1 USO DE *Artemia* COMO ANIMALES EXPERIMENTALES

4.1.1 ESTIMACIÓN DE LA EFICIENCIA Y SINCRONÍA DE LA ECLOSIÓN DE QUISTES DE *Artemia*

Artemia suministrada por ARC tuvo 307,667 quistes/g, con una eficiencia de eclosión de 87%. Esta *Artemia* no requiere decapsulación. *Artemia* suministrada por INVE tuvo 325,241quistes/g, con una eficiencia de eclosión de 63%. Con el proceso de decapsulación previa a la eclosión, esta eficiencia sube al 81%. La sincronía de eclosión se evaluó como el número de horas que tardan en eclosionar el 90% de los quistes viables. El resultado de la muestra de ARC fue de 9,60 h y la de Inve 9,67 h.

4.1.2 Optimización del nivel de alimentación

Nauplios de *Artemia* de 48h de eclosión presentaron la mayor tasa de consumo a las 24h con una densidad de 150,000 células de *T. maculata*/*Artemia*/día.

4.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE WSSV

4.2.1 Preparación del extracto viral

Todos los animales inoculados fueron recolectados moribundos entre 3 y 11 días después de la infección. De los tres extractos virales se obtuvieron 100mL, 250mL y 50mL respectivamente. Se conservaron a -80^{o}C hasta su utilización.

4.2.2 Cuantificación relativa de partículas virales por PCR

El extracto original y las seis primeras diluciones de cada uno de los extractos dieron positivos. La cuantificación podría referirse como $Xx10^{6}$ partículas virales. En la figura 2 se observan los resultados de electroforesis del primer y segundo extracto viral.

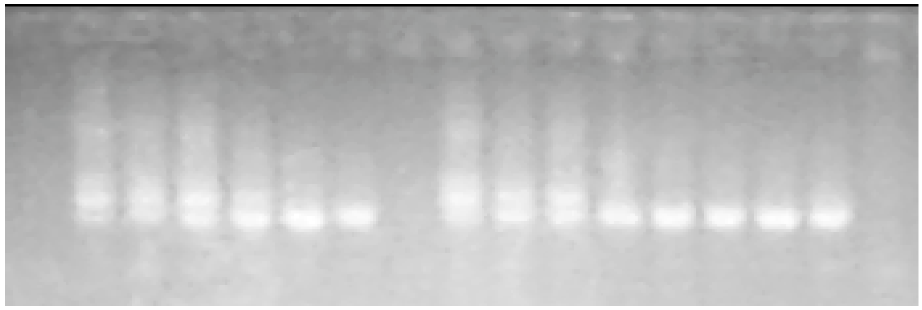

Figura 2. Resultado de electroforesis de extracto viral de WSSV. Primer extracto: Primer pozo extracto viral, 7 siguientes pozos diluciones, (sólo 6 positivas); Segundo extracto: Primer pozo extracto viral, 6 siguientes pozos diluciones (6 positivas), ADN positivo para WSSV, agua empleada para preparar las diluciones.

4.2.3 Control de infectividad del extracto viral

Los camarones infectados presentaron mortalidad del 100% entre 2 y 11 días después del desafío. Para cada ensayo, la infección con WSSV fue confirmada por PCR usando el kit IQ2000 dando como resultado positivo fuerte y por histología mostrando las lesiones patognomónicas de WSSV.

4.3 DESAFÍOS EXPERIMENTALES DE *Artemia* CON WSSV

4.3.1 Ensayos preliminares de desafío con extracto viral de WSSV en nauplios de 3 y 8 días de edad a 35 ups de salinidad con dos concentraciones virales de WSSV

Aproximadamente el 90% de los animales murieron 6 horas después del primer desafío e inmediatamente se desintegraron. Las muestras se tomaron de los animales restantes con los que se continuó el segundo desafío. Las algas centrifugadas que se añadieron como alimento presentaban rotura de las paredes. En el día 7 de la prueba, se presentó una mortalidad de aproximadamente el 20% de los animales. Los controles a los que se inoculó extracto de tejido de camarón WSSV PCR negativo no presentaron mortalidades significativas excepto el séptimo día. Los quistes de los que se originaron los animales fueron PCR negativos.

4.3.2 Ensayo preliminares de desafío con extracto viral de WSSV en nauplios y juveniles de 5 y 16 días a 35 ups y 100 ups de salinidad

Después del primer desafío se observaron intestinos y toracópodos rojos en animales mantenidos a 35 ups y 100 ups. En el séptimo día se detectó una mortalidad del 30% en los animales en ambas salinidades y una mortalidad del 95% después del segundo desafío en la *Artemia* a 35 ups a los quince días. Los controles a los que se inoculó extracto de tejido de camarón WSSV PCR negativo no presentaron mortalidades significativas excepto el séptimo día. Los quistes de los que se originaron los animales fueron PCR negativos.

4.3.3 Ensayos finales de desafío con extracto viral de WSSV en nauplios, juveniles y adultos de 5, 16 y 22 días a 35 ups y 100 ups de salinidad

Durante este desafío sólo se produjo una mortalidad de aproximadamente el 30% al séptimo día en *Artemia* a ambas salinidades. Los controles a los que se inoculó extracto de tejido de camarón WSSV PCR negativo no presentaron mortalidades significativas excepto el séptimo día. Los quistes de los que se originaron los animales fueron PCR negativos. La mayor parte de la descendencia de la *Artemia* a 100 ups era en forma de quiste mientras que la mantenida a 35 ups era en su mayoría nauplios.

4.4 DETECCIÓN DE WSSV EN *Artemia* POR PCR E INMUNOHISTOQUÍMICA

4.4.1 PCR

Los resultados de PCR de las muestras del primer ensayo dieron todas positivas incluyendo los controles negativos usando el protocolo de Lo *et al*. (1996b). El tamaño de los productos amplificados eran de: 1441 y 941pb. Los resultados de las muestras del segundo desafío fueron negativas con el protocolo de Lo *et al*. (1996b). Los resultados del desafío final en el que se utilizó el protocolo de Lo para las dos primeras pruebas dieron negativos.

4.4.2 <u>Desarrollo del control interno</u>

Todos los iniciadores fueron probados en reacciones con ADN de *Artemia*, y en algunos casos con ADN bacteriano como control. Solamente los iniciadores García *et al.* (1994) (Opa 9 y Opa 10) produjeron bandas mostrando un polimorfismo en *Artemia*. Sin embargo, estos iniciadores al ser empleados en el ADN de *Artemia* desafiadas, no conseguían desarrollar patrones confiables.

4.4.3 <u>Cuantificación de ADN por espectrofotometría</u>

Las muestras de ADN presentaban concentraciones entre 50 y 2.000 ng/µL. Todas las muestras fueron diluidas a 50 ng/µL para poder ser empleadas en PCR.

Las tasas de absorbancia 230 nm/260 nm, varíaban entre 0,75 y 4,0, así como la tasas de absorbancia 260 nm/280 nm variaban entre 1,2 y 1,76.

4.4.4 <u>Uso de diferentes iniciadores</u>

Las muestras de la última prueba del desafío final se procesaron por el protocolo de Kimura *et al.* (1996). Todas las muestras fueron negativas. Los controles positivos amplificaron en cada ocasión. Los productos amplificados por los iniciadores de Kimura *et al.* (1996) eran de 982 bp y 570 bp.

4.4.5 <u>Inmunohistoquímica</u>

4.4.5.1 <u>Histología normal</u>

Los cortes teñidos con hematoxilina y eosina/floxina permitieron el estudio de la histología normal de *Artemia*. Los principales tejidos se describen en las figuras 3-6.

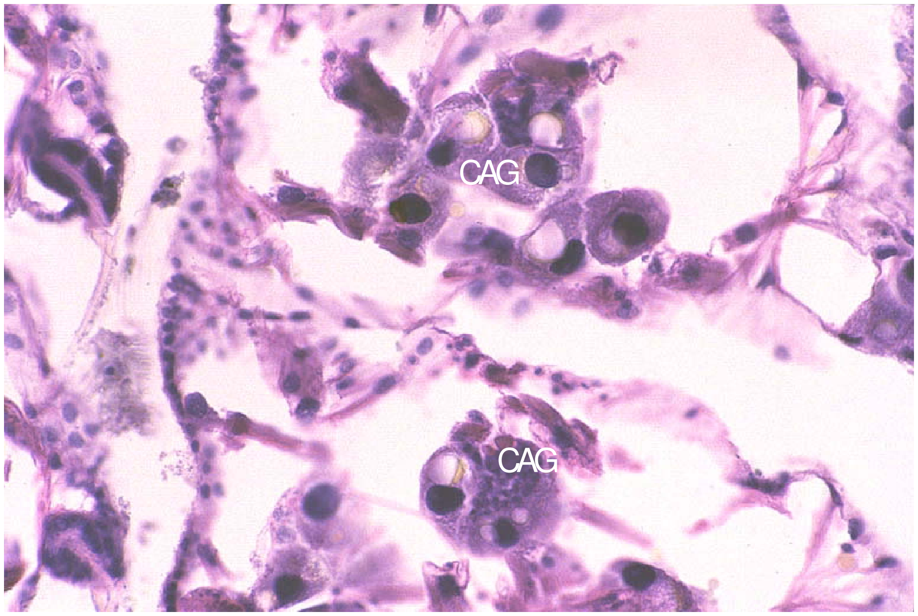

Figura 3. Corte sagital de nauplio de *Artemia*. Las células almacenadoras de grasa (CAG) de un toracópodo son de gran tamaño en comparación al resto de las células y se presentan en gran número. Tinción basofílica, H&EF, 400X.

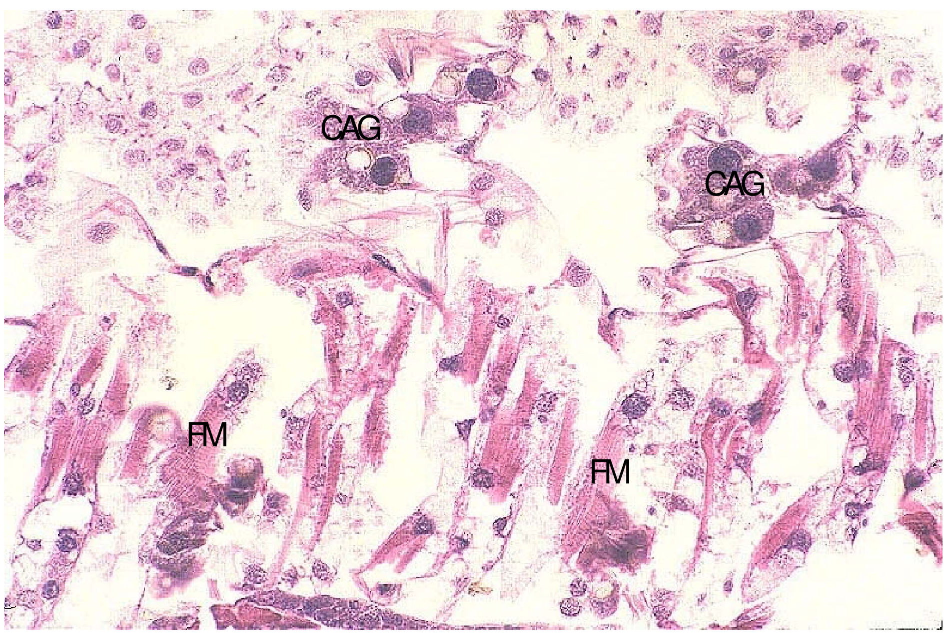

Figura 4. Corte longitudinal de juvenil de *Artemia*. Las estructuras de fibras musculares (FM) son similares a las observadas en camarón. Se aprecian algunas células almacenadoras de grasa (CAG). Tinción H&EF, 400X.

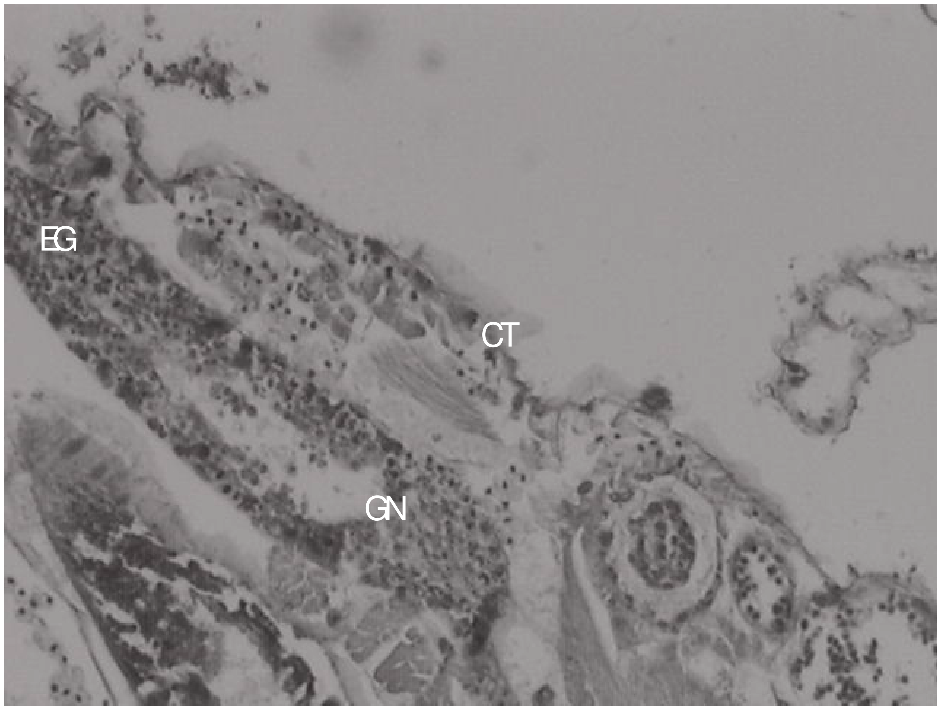

Figura 5. Corte sagital de adulto de *Artemia*. Testes en un estado avanzado de maduración (GN) con presencia de espermatocitos viables en el extremo contrario al epitelio germinal del ovario (EG). Se aprecia la cutícula (CT). Tinción H&EF, 200X.

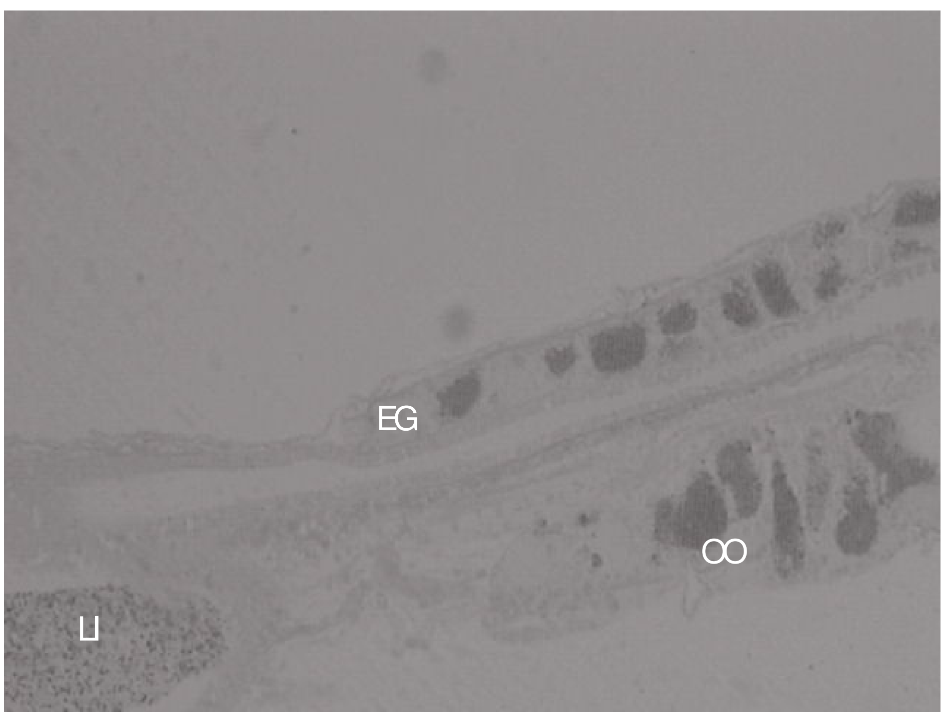

Figura 6. Corte sagital de un adulto de *Artemia*. Epitelio germinal del ovario (EG) con estadíos intermedios de producción de oocitos viables (OO). Se aprecia el lumen intestinal (LI). Contratinción EF, 400X.

4.4.5.2 Inmunohistoquímica

Se examinaron un total de 205 cortes tratados por inmunohistoquímica sin observar ninguna reacción positiva (Fig. 7). Los controles positivos de camarón dieron positivo (Fig 8).

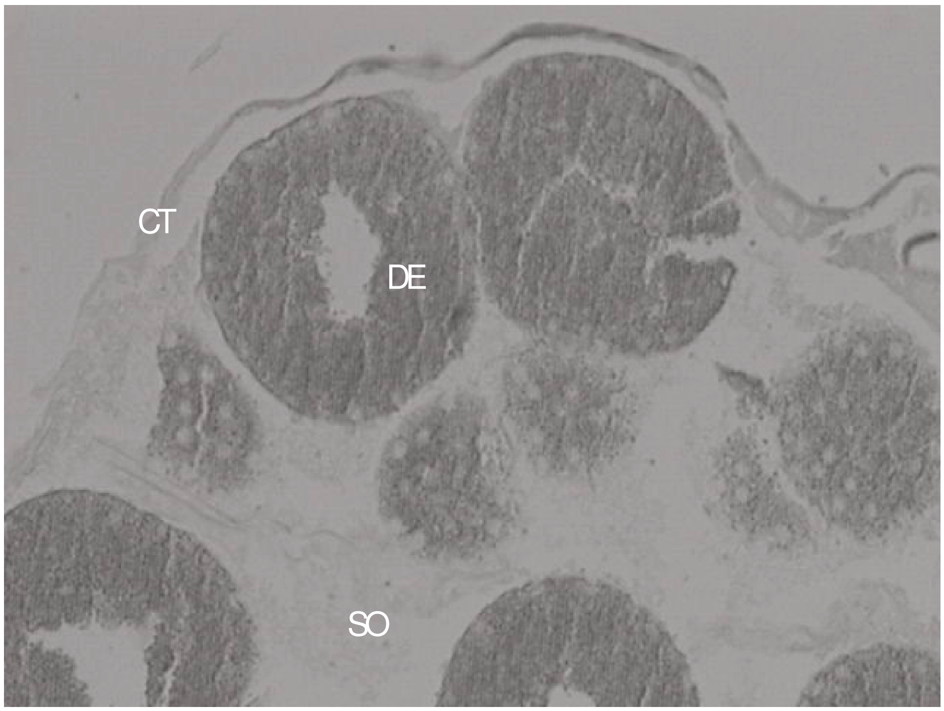

Figura 7. Corte sagital de juvenil de *Artemia* desafiada con WSSV, tratado con inmunohistoquímica para WSSV. Se observa el saco ovígero (SO) conteniendo huevos fecundados (DE), y la cutícula exterior (CT). No hay reacción positiva. Contratinción EF, 400X.

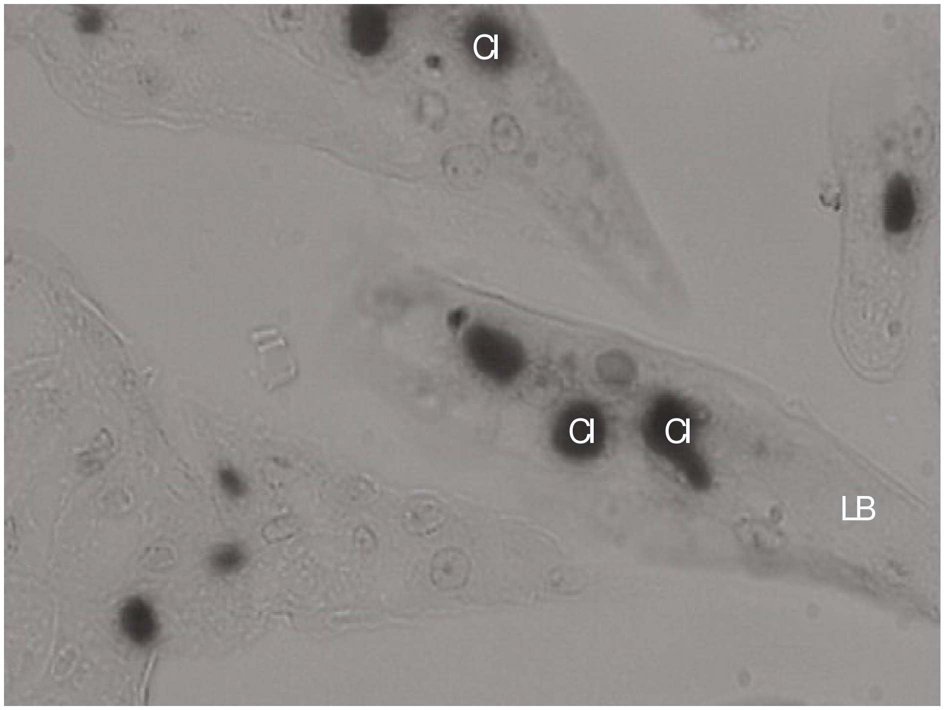

Figura 8. Control positivo de infección con WSSV (CI) en lamelas branquiales (LB) de camarones *P. vannamei*. Contratinción EF, 400X.

5 DISCUSIÓN

Los quistes de *Artemia* utilizados para los bioensayos se consideraron adecuados para su uso después de evaluar la eficiencia y sincronía de eclosión y se comparan con los rangos de eclosión descritos por Bruggerman *et al.* (1980) para quistes provenientes de San Francisco Bay mostraron un 71.4±4.5% de eclosión sin decapsular y un 82.1±7.9% decapsulados. En el caso de los quistes utilizados, el tiempo de eclosión fue menor a 10/12h que se considera el tiempo máximo (Bruggerman *et al.* 1980). El tasa de alimentación que se escogió por ser la de mayor consumo esta dentro del rango considerado óptimo para el crecimiento de nauplios y juveniles de *Artemia* por Cotteau *et al.* (1992).

Se realizaron infecciones experimentales en *P. vannamei* para comprobar que durante el proceso de extracción y almacenamiento la infectividad del extracto se mantenía. Las mortalidades se presentaron dentro del rango normal para el caso de WSSV y la causa de la mortalidad fue determinada por PCR e histología. En este caso el sistema de elección de PCR fue el Kit IQ2000, este sistema tiene la capacidad de hacer una cuantificación relativa de la muestra. En este caso las muestras fueron positivas fuerte lo que confirmaba que WSSV era la causa de la muerte. Por histología se observaron las lesiones patognomónicas de WSSV.

Uno de los problemas con los que nos encontramos en este estudio es la cuantificación del extracto viral para poder comparar los resultados de los diferentes desafíos. Para resolver este problema se realizo una cuantificación relativa por medio del examen por PCR de diluciones sucesivas de la muestra, considerando la ultima dilución positiva como X.

Se utilizaron dos métodos para la detección de posibles infecciones: PCR e inmunohistoquímica. PCR se escogió por su sensibilidad y rapidez, sin embargo esta técnica por si sola no puede diferenciar una infección de una contaminación por lo que se requirió realizar inmunohistoquímica y así detectar el virus en los tejidos y comprobar que la infección es real. La inmunohistoquímica permitió además estudiar la histología normal de *Artemia*.

Se utilizaron dos protocolos diferentes de PCR anidado para la detección de WSSV: Lo *et al.* (1996b) y Kimura *et al.* (1996). La mayor parte se realizo con Lo excepto el último análisis que se utilizo el de Kimura por su mayor sensibilidad. El uso de iniciadores que generen amplicones de menor tamaño da una mayor sensibilidad a la técnica ya que hay una mayor probabilidad de hibridación con la cadena original y la menor generación de errores en la adición de bases (Otta *et al*. 1999).

Los elevados niveles de ácidos grasos altamente insaturados y de pigmentos en la composición corporal de *Artemia* (Sorgeloos *et al.* 1998) pueden actuar como inhibidores de la reacción de PCR. Por lo que se intento desarrollar un control interno para PCR en el que se amplificara DNA de *Artemia* y así poder diferenciar una reacción negativa y un fallo en la amplificación. Para ello se utilizaron varios iniciadores y el sistema de RAPD pero solo se consiguió amplificación con los iniciadores de García *et al.* (1994) pero no lo suficientemente consistente como para poder ser usados. Existe la posibilidad de que los resultados PCR negativos de este estudio sean debido a una inhibición en vez de una falta de infección y que esta infección estuviera por debajo del nivel de sensibilidad de la inmunohistoquímica.

La cantidad de ADN que se utiliza para cada amplificación tiene que estar dentro de un rango (2-1.000 ng/µL) dependiendo del protocolo de amplificación que se utilice. Si la cantidad de ADN es insuficiente, la amplificación no llegará a visualizarse y si es excesiva, puede inhibir la amplificación. Por este motivo todas las extracciones de ADN fueron cuantificadas por espectrofotometría. Las tasas de absorbancia 260 nm/280 nm y 230 nm/260 nm demostraban contenidos de sales y niveles medios de pureza cuando se las comparaba con los sugeridos por Michelis y Bova (1997). Además se realizaron varios lavados con fenol:cloroformo:alcohol isoamil para mejorar la purificación del ADN.

Para los desafíos se escogieron dos salinidades. La salinidad de 35 ups que es una salinidad en las que tanto la *Artemia* como el WSSV pueden sobrevivir y 100 ups es una salinidad adecuada para *Artemia*, pero WSSV seria inviable (Maeda *et al.* 1998). Los desafíos se realizaron en distintos estadios para descartar la posibilidad de que *Artemia* no fuera susceptible a la infección en alguno de ellos. La alimentación vario entre los diferentes bioensayos. En primer lugar se suministro microalga congelada, pero se observo daño en las paredes del alga por lo que se decidió administrar microalga fresca en el segundo bioensayo. Finalmente, también se utilizo cultivo selco para reducir el estrés del intercambio de agua necesario cuando se administra microalga.

En el primer desafío, se presentaron mortalidades masivas 6h después de agregar el extracto. Este es un periodo muy corto como para considerar que las mortalidades fueran debidas a infección por WSSV u otro organismo. Es mas probable que la mortalidad fuera debida a un shock tóxico por lo que se decidió disminuir la cantidad de extracto usada en los siguientes desafíos. Los controles con extracto de tejido de camarón WSSV negativo no presentaron esta mortalidad por lo que la causa pudo ser debida a la presencia de toxinas de origen bacteriano y no relacionado a la presencia de componentes de tejido de camarón. Adicionalmente se realizo en el agua un conteo bacteriológico y lectura de amonio y pH (datos no presentados). El cultivo bacteriano mostró $1x10^6$ CFU/mL lo que se considera dentro del margen de seguridad según Makridis *et al.* (2000) que indican que niveles hasta de $5x10^7$ CFU/mL no son nocivas para *Artemia.* La concentración de amonio fue de 0.025 mg/L y el pH 7,8, lo que se considera dentro de condiciones óptimas para el cultivo de *Artemia* (Ribeiro y Jones 1998). En este primer ensayo todas las muestras, incluidas los controles negativos fueron PCR positivo, mientras que por inmunohistoquímica fueron negativas. Este resultado indica que la presencia de WSSV o DNA de WSSV era superficial y no una infección de *Artemia* o que el nivel de infección esta por debajo de la sensibilidad de la inmunohistoquímica. Chang *et al.* (comunicación personal) utilizaron nauplios de *Artemia* originarios de quistes PCR positivos para WSSV en desafíos en *P. monodon* sin poder provocar una infección por lo que sugiere que la presencia de DNA de WSSV esta en el corión de los quistes y no en los nauplios de *Artemia*. El hecho de que los controles negativos se contaminaran evidencio que la disposición de las botellas fue incorrecta y los controles necesitaban colocarse en un lugar aislado.

En el segundo desafío se incremento la densidad de la *Artemia* esperando provocar estrés en los animales haciéndolos más sensibles a la infección. Los animales mostraron intestinos y toracópodos rojizos y una alta mortalidad a 35 ups después del segundo desafío por lo que se decidió reducir de nuevo la concentración de *Artemia* para el siguiente ensayo. Las muestras procesadas por PCR e inmunohistoquímica dieron negativas por lo que no se consiguió la infección de los animales.

En el tercer bioensayo no se presentaron mortalidades significativas por lo que hubo suficientes animales que llegaron a estadio adulto y se reprodujeran. Todas las muestras tomadas incluidas las de la descendencia fueron negativas para PCR e inmunohistoquímica por lo que no se consiguió la infección.

Los resultados de los desafíos a 35 ups y 100 ups dieron los mismos resultados. Sin embargo *Artemia* en todos los tratamientos presento una mortalidad entre 20% y 30% el día 7 de cultivo. Aparentemente esto es innato a la cepa de *Artemia* según personal del CENAIM y las mortalidades aumentan con la densidad.

6 CONCLUSIONES

Los resultados WSSV positivos de *Artemia* por PCR durante el primer ensayo no pudieron ser confirmados por inmunohistoquímica por lo que se descartó una infección activa en estos animales. Esto demuestra que la técnica de PCR por si sola no es suficiente para detectar infecciones en organismos ya que no diferencia entre una infección y una contaminación.

Ninguna de las muestras de *Artemia* fueron positivas a WSSV al nivel de detección de la técnica de inmunohistoquímica empleada por lo que podemos concluir que *Artemia* no es sensible a la infección por WSSV bajo las condiciones descritas en este estudio.

Empleando las condiciones experimentales escogidas, no fue posible infectar adultos y por consiguiente no se pudo determinar una posible transmisión vertical. Sin embargo, se requiere ampliar los estudios de desafíos bajo condiciones diferentes a las escogidas para este estudio antes de poder descartar completamente la posibilidad de infección de *Artemia* con WSSV.

7 BIBLIOGRAFÍA

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl. 1992. Short protocols in molecular biology, 2nd Edition. Current Protocols, USA.

Bossier, P., G. Van Stappen, T. J. Abatzopoulos y P. Sorgeloos. 1998. Long-primer RAPD for authentication of Artemia species. Poster presented at the Annual ICES symposium, Cascais, 16-19 September.

Boulo, V., E. Mialhe, H. Rogier, F. Paolucci y H. Grizel. 1989. Immunodiagnosis of Bonamia ostreae (Ascetospora) infection of Ostrea edulis L. and subcellular identification of epitopes by monoclonal antibodies. Journal of Fish Diseases 12:257-262.

Brock, J. y K. L. Main. 1994. A guide to common problems and diseases of cultured Litopenaeus vannamei. WAS, Baton Rouge, USA.

Browne R. A. y G. Wanigasekera. 2000. Combined effect of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of Artemia. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 244:29-44.

Bruggeman E., P. Sorgeloos y P. Vanhaecke. 1980. Improvements in the decapsulation technique of Artemia cysts. Páginas 261-269 en G. Persoone, P. Sorgeloos, J. Roels y E. Jaspers, editores, The Brine Shrimp Artemia, Volume 3. Ecology, culturing, use in aquaculture. Universa Press, Wetteren-Belgium,.

Chang, P. S., Chen H. C. y Wang Y. C. 1998a. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. Aquaculture, 164(1-4), 233 – 242.

Chang, Y. S., C. F. Lo, S. E. Peng, K. F. Liu, C. H. Wang y G. H. Kou. Comunicación personal. White spot virus (WSSV) PCR positive Artemia cysts yield PCR negative nauplii that fail to transmit WSSV to shrimp post lavae.

Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. H. Wang, H. C. Chiang y C. F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Diseases of Aquatic Organisms 23:165-173.

Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. F. Lo y G. H. Kou. 1998. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in Penaeus monodon and P. japonicus via waterborne contact and oral ingestion. Aquaculture 164:263-276.

Clapp, J. P. 1996. Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods. Methods in Molecular Biology, Volume 50. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA:25-37.

Corbel, V., Z. Zuprizal, C. Shi, C. Y. Huang, Sumartono, J. M. Arcier y J. R. Bonami. 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Fish Diseases 24(7):377-382.

Cotteau, P., L. Brendonck, P. Lavens y P. Sorgeloos. 1992. The use of manipulated baker´s yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca. Hydrobiologia 234:25-32.

Davis, L. G., M. D. Dibner y J. F. Battey. 1986. Basic methods in molecular biology. Elsevier Science, New York-NY-USA:58-61,320-323,363-369.

De Blás N., C. Ortega, K. Frankena, J. Noordhuizen y M. Thrusfield. 1998. WinEpiscope, Version 2.0. Universidad de Edimburgh y de Wageningen, http://infecepi.unizar.es/pages/ratio/soft_sp.htm

Diagxotics, 2000. White spot syndrome virus ShrimProbe Brochure: Immunohistochemistry for the detection WSSV in shrimp.

García, D. K., M. A. Faggart, L. Rhoades, J. A. Wyban, W. H. Carr, J. N. Sweeney y K. M. Ebert. 1994. Genetic diversity of cultured Penaeus vannamei shrimp using three molecular genetic techniques. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3(5):270-280.

Gibco. 1999. The basics of PCR and RT-PCR. Life Technologies, http://www.lifetech.com.

Hossain, M. S., A. Chakraborty, B. Joseph, S. K. Otta, I. Karunasagar y I. Karunasagar. 2001. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. Aquaculture 198:1-11.

Huang, J., X. Song, J. Yu y C. Yang. 1995. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis - study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp. Marine Fisheries Research 16:1-10. (En Chino)

Inouye, K., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano, T. Kimura, K. Momoyama y M. Hiraoka. 1994. Mass mortality of cultured kuruma shrimp Penaeus japonicus in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. Fish Pathology 29:149-158.

Itami, T., M. Maeda, O. Henning, M. Kondo, N. Susuki, J. Kasornchandra, K. Uehara, I. Hirono, T. Aoki, R. Kusuda y Y. Takahashi. 1998. Possible prevention of white spot syndrome (WSS) in kuruma shrimp shrimp, Penaeus japonicus, in Japan. Páginas 291-295 en T.W. Flegel, editor. Advances in Shrimp Biotechnology. National Center for Genetic Engineer and Biotechnology, Bangkok, Thailand.

Kanchanaphum, P., C. Wongteerasupaya, N. Sitidilokratana, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, Withyachumnarnkul, Y. Flegel. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp Penaeus monodon. Diseases of Aquatic Organisms 34:1-7.

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

Kautsky, N., P. Rönnbäck, M. Tedengren y M. Troell. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture 191:145-161.

Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraoka y K. Inouye. 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. Fish Pathology 31:93-98.

Lavens, P. y P. Sorgeloos. 2000a. Experiences on importance of diet for shrimp larval quality.

Lavens, P. y P. Sorgeloos. 2000b. The history, present status and prospects of the availability of Artemia cysts for aquaculture. Aquaculture 181:397-403.

Lightner, D. V. 1996. Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.

Lightner, D. V. y R. M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture 164:201-220.

Lo, C. F., C. H. Ho, C. H. Chen, K. F. Liu, Y. L. Chiu, P. Y. Yeh, S. E. Peng, H. C. Hsu, H. C. Liu, C. F. Chang, M. S. Su, C. H. Wang y G. H. Kou. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of Penaeus monodon with a special emphasis on reproductive organs. Diseases of Aquatic Organisms 30(1): 53-72.

Lo C. F., C. H. Ho, S. E. Peng, C. H. Chen, H. C. Hsu, Y. L. Chiu, C. F. Chang, K. F. Liu, M. S. Su, C.H. Wang y G.H. Kou. 1996a. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Diseases of Aquatic Organisms 27(3):215-225.

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 y G. H. Kou. 1996b. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms 25(1-2):133-141.

Lotz, J. M. 1997. Special topic review: viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology 13:405-413.

Mackridis, P., A. J. Fjellheim, J. Skjermo y O. Vadstein. 2000. Control of the bacterial flora of Brachionus plicatilis and Artemia franciscana by incubation in bacterial suspension. Aquaculture 185:207-218.

Maeda, M., J. Kasornchandra, T. Itami, N. Susuki, O. Henning, M. Kondo, J. D. Albaladejo y Y. Takahashi. 1998. Effect of various treatments on white spot syndrome virus (WSSV) from Penaeus japonicus (Japan) and P. monodon (Thailand). Fish Pathology 33(4):381-387.

Majack, T. J., K. C. Massee, G. W. Kissil, R. W. Hardy y M. E. Peterson. 2000. Bioencapsulation of erythromycin using adult brine shrimp, Artemia franciscana (Latreille). Journal of Fish Diseases 23:71-76.

Melena, J., T. Flegel y J. Calderón. 2000. Ensayos para determinar los factores que influyen en la mortalidad por WSSV. Mundo Acuicola 6(2):5-12.

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

Michelis M. R. y R. Bova, editores. 1997. Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR. Springer Lab Manual, Germany, 15-63.

Momoyama, K., M. Hiraoka, H. Nakano, H. Koube, K. Inouye y N. Oseko. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, Penaeus japonicus, in Japan in 1993: histopathological studi. Fish Pathology 29(2):141-148.

Mushiake, K., K. Shimizu, J. Satoh, K. I. Mori, M. Arimoto, S. I. Ohsumi y K. Imaizumi. 1999. Control of penaeid acute viremia (PAV) in Penaeus japonicus: selection of eggs based on the PCR detection of the causative virus (PRDV) from receptaculum seminis of spawned broodstock. Fish Pathology 34(4):203-207.

Nunan, L. M. y D. V. Lightner. 1997. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Virological Methods 63:193-201.

Nunan, L. M., B. T. Poulos y D. V. Lightner. 1998. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. Diseases of Aquatic Organisms 34(2):87-91.

Otta, S. K., G. Shubha, J. B. Chakraborty, I. Karunasagar y I. Karunasagar. 1999. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. Diseases of Aquatic Organisms 38:67-70.

Pillay, T. V. R. 1992. Aquaculture and the environment. Fishing News Books, Cambridge, UK:89-93.

Ribeiro, F. A. L. T. y D. A. Jones. 1998. The potential of dried, low-hatch, decapsulated Artemia cysts for feeding prawn post-larvae. Aquaculture International 6:421-440.

Roque, A., A. Mazari y B. Gómez-Gil. 2000. Infección oral experimental de postlarvas de Litopenaeus vannamei a través de bioencapsulación de Vibrio parahemolyticus en Artemia franciscana. Ciencias Marinas 26(1):65-77.

Sahul Hameed, A. S., M. X. Charles y M. Anilkumar. 2000. Tolerance of Macrobrachium rosenbergii to white spot syndrome virus. Aquaculture 183:207-213.

Sorgeloos, P. 1972. The influence of light on the growth rate of larvae of the brine shrimp, Artemia salina L. Biol. Jb. Dodonaea 40:317-322.

Sorgeloos, P., P. Cotteau, P. Dhert, G. Merchie y P. Lavens. 1998. Use of brine shrimp, Artemia spp., in larval crustacean nutrition: a review. Reviews in Fisheries Science 6(1-2):55-68.

Sorgeloos, P., P. Lavens, P. Léger, W. Tackaert y D. Versichele. 1986. Manual para el cultivo y uso de Artemia en acuicultura. FAO, Documento de Campo No. 10:301pp.

Tsai, M. F., G. H. Kou, H. C. Liu, K. F. Liu, C. F. Chang, S. E. Peng, H. C. Hsu, C. H. Wang y C. F. Lo. 1999. Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. Diseases of Aquatic Organisms 38:107-114.

Villalón, J. R. 1991. Practical manual for semi-intensive commercial production of marine shrimp. TAMU-SG Publication, No. 91-501:104pp.

Walker, P. y R. Subasinghe. 2000. DNA-based molecular diagnostic techniques: research needs for standarization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. FAO Aquaculture Newsletter 24:15-19.

Wang, Q., L. M. Nunan y D. V. Lightner. 2000. Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. Diseases of Aquatic Organisms 43:175-181.

Wang, Y. C., C. F. Lo, P. S. Chang y G. H. Kou. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. Aquaculture 164:221-231.

Wang, Y. G., M. D. Hassan, M. Shariff, S. M. Zamri y X. Chen. 1999. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured Penaeus monodon from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. Diseases of Aquatic Organisms 39:1-11.

Wiedbrauk, D. L. y D. H. Farkas. 1995. Molecular methods for virus detection. Academic Press Inc., San Diego-CA-USA:1-24.

Wongteerasupaya, C., J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul y T.W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn Penaeus monodon. Diseases of Aquatic Organisms 21:66-77.

Wouters, R., L. Gómez, P. Lavens y J. Calderón. 1999. Feeding enriched Artemia biomass to Penaeus vannamei broodstock: its effect on reproductive performance and larval quality. Journal of Shellfish Research 18(2):651-656.

ANEXOS

Metodologías estándar:

EFICIENCIA DE ECLOSION

Es el número de nauplios de Artemia que pueden ser producidos por gramo de quistes, bajo condiciones estándar.

La evaluación es realizada bajo las siguientes condiciones:

Temperatura:	28˚C
Salinidad:	35 ups
Iluminación:	2.000 lux
Tiempo de incubación:	24 horas
Peso de la muestra de quistes	2 g
Volumen de agua:	1000 mL
Número de réplicas:	5
Número de submuestras:	6
Volumen de la submuestra	0,2 mL

EE = N ∗ 2,500 => Número de nauplios / g de quistes de *Artemia*

EE = Eficiencia de eclosión

N = Número promedio de nauplios por submuestra

2,500 = Factor de conversión para calcular el número de nauplios por gramo

NOTA: Los resultados son redondeados a las unidades de mil, aunque por la exactitud de la determinación solo desde las unidades de diez mil son significativas.

TASA DE ECLOSION

Este criterio refiere al periodo de tiempo para eclosión total desde el comienzo de la incubación (= hidratación de los quistes) hasta la liberación del nauplio (eclosión).

Considera una serie de intervalos de tiempo:

t_{10} = tiempo de incubación hasta que aparece el 10% de los nauplios eclosionables

t_{50} = tiempo de incubación hasta que aparece el 50% de los nauplios eclosionables

t_{90} = tiempo de incubación hasta que aparece el 90% de los nauplios eclosionables

$t_s = t_{90} - t_{10}$; este valor da una idea de la sincronía de la eclosión.

Los datos de la tasa de eclosión permiten calcular el periodo de incubación óptimo para poder cosechar los nauplios conteniendo altos niveles de energía. Es importante que t_{90} sea alcanzado dentro de las 24 horas, en caso contrario se requerirán más tanques de eclosión para asegurar un suministro diario requerido de nauplios Instar I.

Para la construcción de la curva se determina la eficiencia de eclosión (EE) cada dos horas a partir de las 10 horas de incubación.