

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA DE INVERTEBRADOS
LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA



ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DEL VIRUS DEL SÍNDROME
DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) EN MUESTRAS DE
CAMARONES PENEIDOS COLECTADOS EN GRANJAS DE
CENTROAMÉRICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA

LILIA IMELDA HERNÁNDEZ ESPINOSA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON FEBRERO DEL 2006

TL
QR325
.H47
2006
c.1



1080091481

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA DE INVERTEBRADOS
LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA



ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DEL VIRUS DEL SÍNDROME
DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) EN MUESTRAS DE
CAMARONES PENEIDOS COLECTADOS EN GRANJAS DE
CENTROAMÉRICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA

LILIA IMELDA HERNÁNDEZ ESPINOSA

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN FEBRERO DEL 2006

**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Zoología de Invertebrados
Laboratorio de Parasitología**



**ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA
(WSSV) EN MUESTRAS DE CAMARONES PENEIDOS COLECTADOS EN GRANJAS DE
CENTROAMÉRICA**

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

**PRESENTA
LILIA IMELDA HERNÁNDEZ ESPINOSA**

San Nicolás de los Garza, Nuevo León Febrero del 2006



Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Zoología de Invertebrados
Laboratorio de Parasitología



**ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA
MANCHA BLANCA (WSSV) EN MUESTRAS DE CAMARONES PENEIDOS
COLECTADOS EN GRANJAS DE CENTROAMERICA**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

PRESENTA

LILIA IMELDA HERNÁNDEZ ESPINOSA

FELICIANO SEGOVIA SALINAS
PRESIDENTE
DIRECTOR

JORGE LUIS HERNÁNDEZ PINERO
CO-DIRECTOR

FERNANDO JIMÉNEZ GUZMÁN
VOCAL

MARIA DE LA PAZ TIJERINA
SECRETARIO

FRANCISCO JAVIER ALVAREZ MENDOZA
SUPLENTE

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE ABREVIATURAS.....	iv
INDICE DE FOTOGRAFIAS.....	v
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVO.....	4
HIPOTESIS.....	5
IMPORTANCIA.....	6
ANTECEDENTES.....	8
MATERIAL Y MÉTODO.....	12
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	30
LITERATURA CONSULTADA.....	31

DEDICATORIA

A Dios:

Por brindarme la oportunidad de realizarme profesionalmente en esta carrera y por poner en mi camino a personas que me ayudaron a cumplir mi meta dándome su apoyo a pesar de las dificultades.

A mis padres:

Sr. José María Hernández Quintanilla

y

Sra. Sanjuana Espinosa Saucedo

Por haberme brindado su apoyo, amor y comprensión, así como por darme la oportunidad de superación a través del estudio.

A mis hermanas:

Juany

Yesenia

Ana

Erika

Por el cariño que me han brindado estos años.

A mis sobrinos:

Edward

Diane

Andrea

Alejandro

Diego

Por los momentos alegres que compartimos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Feliciano Segovia salinas, por su apoyo constante, por sus palabras de entusiasmo cuando me faltaban, por su confianza y amistad y por su valioso tiempo y consejos para la elaboración de esta investigación ya que sin su ayuda no hubiera sido posible cumplir mi meta.

Al Dr. Jorge Luis Hernández Piñero, por su tiempo brindado para la realización de este trabajo practico como teórico, por sus consejos y por compartir sus experiencias en el área de Microscopia Electrónica.

Al M.C. Fernando Jiménez Guzmán, por la disposición, motivación y por su agradable carácter. y participación en este trabajo.

A la Dra. Maria de la Paz Tijerina, por sus recomendaciones y participación en la realización de este trabajo.

Al Dr. Francisco Javier Álvarez Mendoza, por la colaboración en la revisión de esta investigación.

A MI COMPAÑERA TESISISTA: Aracely Alvarado Hernández por su amistad y colaboración en todo momento para la realización de este trabajo.

A MIS AMIGOS: Por los mejores momentos que ha pasado juntos Armando, Omar, Genaro, Luis, Jorge y especialmente Joel gracias por tus palabras. A mis amigas Laura Cantú y Adriana Morales las cuales siempre estuvieron conmigo en todo momento y espero que sigamos así. Y a Erik por los momentos de amistad que me has brindado.

Y a todos aquellos que de uno forma u otra me alentaron a seguir adelante

INDICE DE ABREVIATURAS

WSSV.-	Virus del Síndrome de la Mancha Blanca
TSV.-	Virus del Síndrome de Taura
YHV.-	Virus de Cabeza Amarilla
IHHNV.-	Virus de la Necrosis Hematopoyética e Hipodérmica Infecciosa.
ICENV.-	Virus de la Necrosis Infecciosa del Epitelio
SEMBV.-	Baculovirus Sistémico Ectodermal y Mesodermal
RV-PJ.-	Rod Shaped virus of Penaeus japonicus
BP.-	Baculovirus Penaei
TEM.-	Microscopia Electrónica de Transmisión
FAO.-	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
CNA.-	Cámara Nacional de Acuacultura
CANAIPESCA.-	Cámara de la Industria Pesquera y Acuacultura.

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Foto 1.- Observación a través de la parte anterior de una lamela branquial con tres células con núcleos hipertrofiados, sin el Virus de la Mancha Blanca (WSSV) 4448.4 X.

Foto 2.- Lamela branquial con varias células con hipertrofia nuclear, sin presencia viral. 5900 X.

Foto 3.- Áreas celulares que muestra dos núcleos alargados y citoplasma granular, no observándose virus. 14710 X

Foto.- 4.- Citopatología comparativa diagnóstica entre células con núcleos hipertrofiados sin virus de tamaño mas pequeño que la célula con núcleo hipertrofiado y presencia del Virus de la Mancha Blanca WSSV. 8.088 X

Foto 5.- Observación de las células con el Virus de la Mancha Blanca (WSSV) núcleos dañados con hipertrofia y una célula agrandada sin virus. 13500 X.

Foto 6.- Célula infectada moderadamente con el Virus de la Mancha Blanca (WSSV), nótese el núcleo hipertrofiado y los virus. 11700 X.

Foto 7.- Se observa membrana celular, núcleo hipertrofiado y presencia del Virus de la Mancha Blanca (WSSV), con áreas necrosadas severas. 6160 X.

Foto 8.- Ampliación de la célula infectada severamente por el Virus de la Mancha Blanca (WSSV), se observa el núcleo agrandado. 14400 X.

Foto 9.- Célula redondeada con el núcleo hipertrofiado ocupando la mayor parte de la estructura celular. Los virus ocupan moderadamente el núcleo. 17.024 X.

Foto 10.- Observación de dos áreas con la célula infectada por el Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y tejido dañado. 17.024 X.

Foto 11.- Ampliación de las zonas necrosadas y la observación de la forma y tamaño del Virus de la Mancha Blanca (WSSV). Azul de Toluidina – Fucsina básica. 48016 X.

Foto 12.- Zona nucleares necrosadas y zonas ocupadas por virus de diferente forma vistos en los cortes finos de lamelas branquiales. Azul de Toluídina –Fucsina básica. 66240 X.

Foto 13.- Arreglo uniforme del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) dentro del núcleo de la célula branquial hipertrofiada. 48016 X.

Foto 14.- Amplificación a través de los Virus de la Mancha Blanca (WSSV) dentro se observa su nucleocapside. 113000 X.

RESUMEN

Se investigó la microscopía fina del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en branquias del "camarón blanco del Pacífico" *Litopenaeus vannamei* cultivado en granjas ubicadas en Centroamérica. El objetivo del estudio fue la identificación y descripción ultraestructural del WSSV en *L. vannamei*.

Las muestras de los camarones fueron fijadas en glutaraldehído 3-6 % y procesadas por Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) según las técnicas estándar para el diagnóstico patológico en camarones peneidos.

Como resultado se detectaron inclusiones intranucleares en branquias de *L. vannamei* con la presencia del WSSV; el cual tenía forma cilíndrica o de varilla, y con terminación apical. El virus midió 120.8 x 312.4 nanómetros y tamaño promedio de las nucleocápsides de 64.5 X 235 nm. de longitud.

Los reportes encontrados del WSSV en camarones cultivados o silvestres de México y el extranjero indicaron que el material investigado es ^{similar} parecido al reportado en hospederos peneidos de Tailandia y Taiwán. Se concluye que el WSSV es el agente causal de daño branquial a *L. vannamei* de Centroamérica. Se logró la identificación del virus WSSV apoyándose en la forma y tamaño del patógeno visto con técnicas de TEM.

INTRODUCCION

La industria del cultivo de camarones peneidos a nivel mundial se ha venido desarrollando significativamente en menos de treinta años debido a los múltiples avances en la investigación, hasta convertirse en una industria rentable que genera millones de empleos y divisas que comprenden billones de dólares en ventas de exportación.

Existen granjas camaronícolas ubicadas en todo el mundo, pero la mayor producción en los últimos veinte años se centra en países del Sudeste de Asia y América Latina donde predominan dos especies, el "camarón tigre" *Penaeus monodon* y el "camarón blanco" del Pacífico *Litopenaeus vannamei* respectivamente. En menor escala se cultiva a *Fenneropenaeus chinensis*, *Marsupenaeus japonicus*, *L. stylirostris* y *Fe. merguensis*.

A lo largo del crecimiento repentino de la industria camaronícola se han reconocido diversos agentes patógenos dentro de los cuales los virus son la causa más común de daño citológico y tisular al camarón peneido. Los virus patógenos han ocasionado epizootias devastadoras causando pérdidas económicas significativas en los cultivos comerciales (Lightner, 1996; Wang, 1997).

De las enfermedades más dañinas para la camaronicultura se destaca la llamada "mancha blanca", causada por el virus de la mancha blanca (WSSV) que según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) es uno de los ejemplos actuales de vulnerabilidades que tiene el cultivo de camarón en la región de América Latina y el Caribe y es hasta el momento la enfermedad más devastadora reportada para camarones peneidos cultivados (Lightner, 1996; Flegel, 1997).

En América los integrantes del complejo WSSV son similares en el cuadro clínico, histopatología e histotropismo, pero difieren en morfología ultraestructural, rango de hospederos y homología geonómica. Los miembros de este complejo se replican en núcleos de las células derivadas del ectodermo y mesodermo. En el Hemisferio Occidental del

Continente Americano los primeros casos diagnosticados ocurrieron simultáneamente en Octubre y Diciembre de 1995 en granjas camaronícolas de Texas y Carolina del Sur, EUA.

El virus de la mancha blanca, según un informe del organismo mundial, tuvo su origen en Asia y actuó en forma devastadora en China y Tailandia, así como en otros países asiáticos grandes productores de camarón de cultivo. A principios de los años noventa hasta la fecha, han causado tan solo en Ecuador daños estimados en 200 millones de dólares en el caso del Síndrome de las gaviotas (años 1990-1991), 300 millones por el Síndrome Taura (período 1994-1995) y 1 000 millones por la enfermedad de mancha blanca (período 1999-2000). Estas pérdidas millonarias impactaron en la producción de tal manera que llegar a ser el segundo país exportador a nivel mundial con 253,000 toneladas en el año de 1998 y 206,000 toneladas en 1999; estas producciones se desplomaron en un 80% durante los primeros meses del año 2000.

Esta enfermedad se diseminó a otros países del continente Americano, incluyendo Centroamérica detectándose en el año de 1999 asociado a las mortalidades masivas (Calderón et al, 1999), llegando a provocar pérdidas de hasta el 100% en los animales cultivados. Esta enfermedad continuó extendiéndose a otros países donde existen granjas camaroneras (Lightner y cols, 1996., Flegel, 1997).

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

OBJETIVO GENERAL

Identificación y descripción a nivel ultraestructural del agente causal del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en branquias de *Litopenaeus vannamei* cultivado en algunas granjas de Nicaragua, Centroamérica.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si las lesiones observadas en filamentos branquiales de camarones peneidos *Litopenaeus vannamei* cultivados fueron causados por el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) entonces se podría confirmar su presencia celular utilizando Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).

IMPORTANCIA

La camaronicultura es una actividad generadora de empleos y derrama económica hacia los núcleos de población rural, específicamente en las zonas costeras del país.

Sin duda uno de los aspectos que más preocupa a los camaronicultores es la enfermedad del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), por la diseminación geográfica mundial, las múltiples vías de infección y por amplio espectro de hospedadores, tanto silvestres como cultivados que pueden albergar al virus y actuar como reservorio (Wang y cols. 1997).

El virus de la Mancha Blanca tiene gran relevancia la acuicultura asiática, pero hasta el momento no se había considerado un peligro para la maricultura occidental. Sin embargo, como otros procesos pandémicos que comienzan en un punto concreto para después extenderse por todo el mundo, el WSSV se puede considerar hoy en día como una enfermedad cosmopolita, lo que añade mayor importancia si cabe al hecho de ser una enfermedad devastadora en términos económicos.

En términos estrictamente prácticos, la correcta y oportuna detención del agente patológico no solo permite pensar en la implementación de las correspondientes medidas para su prevención y control, sino también ganar tiempo valioso para el camaronicultor, de esa forma se tiene al menos una posibilidad de controlar las epizootias que pueden tener resultados sumamente negativos para la explotación.

Es de vital importancia que se considere de máxima prioridad en el cultivo de camarones peneidos el monitoreo periódico así como métodos y técnicas que permitan el diagnóstico temprano de estas enfermedades y cuando sea factible, el reconocimiento a tiempo de los potenciales agentes etiológicos.

Así mismo, se debe realizar un seguimiento de virus dentro del hospedero y determinar sus sitios de infección, daños histológicos y citológicos para la implementación de un método de diagnóstico preciso.

ANTECEDENTES

Zhan y cols., 1997, realizaron un estudio epizootológico en donde encontró que la infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) estaba infectando a camarones adultos de la población de *Penaeus monodon*, *P. japonicus* y *P. chinensis* observando por medio del Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) las lesiones en branquias, estomago, órgano linfoide y tejido hipodermal usando tinción negativa se mostraron los virus completos midiendo de 375 x 157 nanómetros y la nucleocápside envuelta con un promedio de 395 x 83 nanómetros.

Reyes, 1997, investigó la ultraestructura del agente causal de una enfermedad similar al Síndrome Taura en el "camarón blanco del Pacífico" *Litopenaeus vannamei* encontrando lesiones multifocales cuticulares en células epidérmicas y musculares con núcleos picnóticos o cariorrexicos.

Mohan y cols., 1998, efectuaron una comparación dos epizootias ocurridas en la India en 1994. Por medio de técnicas histopatológicas en donde se observó signos típicos y atípicos con la infección del Virus de la Cabeza Amarilla (YHV) y el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en *Penaeus monodon* y *P. indicus* indicando una posible doble infección.

Chien y cols., 1999, observaron las mortalidades en masa del camarón blanco con Síndrome Virus Taura (STV) en el cual se observó por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) las pequeñas partículas icosaédricas, y se asumió que STV se transfirió a Taiwán por contaminación de post larvas y huevos de las áreas epizooticas.

Galaviz, 1999, realizó una investigación acerca de los agentes causales del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) y el Síndrome del Virus Taura (STV) en camarones Peneidos en base a un protocolo metodológico basado en herramientas moleculares, tomando como herramienta diagnóstica de mayor efectividad la histopatología y bioensayos.

Wang y cols., 1999, estudiaron los principales signos en los órganos blancos de camarones *Penaeus monodon* y observaron que los hepatopancreocitos y células epiteliales del intestino medio no se encontraban presentes, basados en una citopatología ultraestructural donde dedujo que la formación de lesiones parecía estar relacionada con una falla de la transferencia de exudado de las células epiteliales a la cutícula.

Jiménez y cols., 1999, reportaron la presencia del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) en México encontrando que la histopatología de este virus es similar a otros, y fue diagnosticado por un análisis histopatológico y por la técnica de PCR y como parte confirmatoria con microscopía electrónica.

Jiménez y cols., 2000, trabajaron en un examen histopatológico en epizootias del Ecuador y Asia, con el Virus de la Necrosis Infecciosa del Epitelio Cuticular (ICENV) en camarón *Penaeus vannamei* donde la Microscopía Electrónica Transmisión (TEM) demuestra los tejidos afectados y la presencia de un solo tipo de partículas viral en el citoplasma de los camarones enfermos. Estos datos indicaron que la temperatura baja y los cambios ascendentes en la salinidad pueden aumentar la susceptibilidad del camarón a la infección y mortalidad por Virus de la Necrosis Infecciosa del Epitelio Cuticular.

Linne y cols., 2000, proporcionaron la importancia del monitoreo Patológico como métodos y envió de muestras de camarones para definir y describir problemas de índole patológico en condiciones tanto naturales como propias del cultivo artificial, haciendo factible de esta manera la adopción de nuevas técnicas y metodologías en el manejo y cultivo de dichos crustáceos en forma masiva.

Linne y cols., 2000, evaluaron la presencia de Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en muestras de tejidos de camarón donde encontraron que la primera sintomatología observada fue similar a la asociada con el Síndrome de Taura (TS) y se realizaron cortes de las muestras para microscopía de luz donde se considerara el criterio para una muestra positiva con la presencia del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca.

Corbel y cols., 2001, realizaron un experimento con crustáceos europeos infectados con el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) por medio de diluciones con hemolinfa donde observó por Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) las características de las partículas virales como los viriones completos y las nucleocapsides y concluyeron que la infección por medio de la hemolinfa tiene altas mortalidades en crustáceos sanos.

Soto y cols., 2001, compararon la transmisión de la infección del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en diferentes órganos de *Litopenaeus vannamei* por medio de la viabilidad en infectividad de presas de camarón por medio de la alimentación en donde se demostró que no hubo gran diferencia entre las cargas virales.

Soto y cols., 2001, desarrollaron un modelo experimental donde compararon la transmisión del virus de la mancha blanca por diferentes factores como la alimentación e ingestión en las cuales explicaron que la densidad en intestino de los hospederos infectados es importante como factor de virulencia y aparición de epizootias.

Martínez, 2002, estudió las partículas virales por medio de la purificación y caracterización de camarones moribundo *Litopenaeus vannamei* donde observo las características generales de los viriones completos en el núcleo, por medio de Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) los cuales resultaron ser Baculovirus.

Wongprasert y cols. 2003, realizó estudios enfocados en la apoptosis de varios tejidos infectados con el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en el “camarón tigre negro” *Penaeus monodon* mediante Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) en el cual se observaron la cromatina nuclear marginada y el núcleo infestado con viriones envueltos y no envueltos con WSSV, los datos sugirieron que la apoptosis ocurrió a consecuencia de la infección del virus.

Rodríguez y cols., 2003, realizaron exámenes epidemiológicos infectando animales con el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) y mostrando las lesiones causadas por

medio de estudios histopatológicos y ultraestructurales observando la presencia de partículas virales en células infectadas.

Aranguren y cols., 2003, reportaron una relación entre el número de células apoptóticas y el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en *Penaeus monodon* donde se encontró que la hipertermia apoptótica intestinal facilita la causa de muerte viral en camarones infectados con el virus.

Xie y cols. 2005 desarrollaron un método para el aislamiento de partículas virales de Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) usando tinción negativa, donde se demostró que las partículas virales de WSSV pueden ser recuperadas de tejidos infectados.

Baldenegro, 2005 estima que para el presente año cerca de tres mil toneladas de camarón se dejarán de producir en granjas a causa de la enfermedad del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) por este motivo bajará la rentabilidad y consiga la pérdida de empleos e incluso el cierre de algunas empresas en su mayoría del sector social por lo que el impacto de esta enfermedad en camarones peneidos cultivados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Zona de Colecta

Los camarones *Litopenaeus vannamei* fueron colectados directamente de los estanques, seleccionando hospederos sintomáticos al Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en algunas granjas camaronícolas de Nicaragua.

a) Fijación

Los camarones se inyectaron con fijador de glutaraldehído al 6% y posteriormente se sumergieron dentro de viales con el mismo fijador y se sellaron, identificando cada una de las muestras. Se removió el fijador y se colocó el camarón sobre una superficie plana utilizando el pulgar y el índice se procedió a cortar transversalmente en la unión del cefalotórax y el abdomen, además, se realiza una disección longitudinal del cefalotórax justo en la línea media, separando la superficie distal de la región branquial, se removieron los apéndices del área distal de la cabeza, logrando una mayor impregnación del fijador durante la inmersión. Se obtuvieron trozos de 1 a 3 mm³ aproximadamente de las áreas dañadas en los camarones seleccionados para su estudio, se colocaron en glutaraldehído al 6% a 4°C disuelto en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.2 durante aproximadamente 4 horas; Los trozos se lavaron tres veces (1 minuto c/u) en la solución amortiguadora de fosfatos y se postfijaron en Tetraóxido de osmio al 1% (P/V) disuelto en solución amortiguadora de fosfato 0.15M a pH 7.2 durante una hora.

b) Deshidratación, infiltración e inclusión

Se deshidrataron por medio de una serie de baños de etanol al 70, 80,90 y 100% (3 veces) durante 5 minutos cada cambio se sumergieron al óxido de propileno 15 minutos por dos veces, y se mezcla resina y óxido de propileno a 1:1 por 30 minutos. Se colocaron en resina epóxica en bloques de polipropileno y se polimerizaron en una estufa a 60° durante 48 horas aproximadamente.

c) Cortes semifinos y tinción.

Se realizaron los cortes semifinos utilizando una cuchilla de vidrio y se colocaron en un portaobjetos, se fijo el corte con calor y posteriormente se tiñó con Azul de Toluidina y Fucsina básica para detectar la presencia de lesiones provocadas por los virus.

d) Cortes ultrafinos y tinción

Se seleccionaran los bloques con tejidos con patógenos, lesiones patognómicas y se realizaron cortes ultrafinos de 60-90 nm en un ultramicrotomo Porter Blum. Se tiñeron con acetato de uranilo por 30 minutos en cámara húmeda y se lavaron en agua destilada. Se colocaron en una caja de petri con hidróxido de sodio para extraer el bióxido de carbono y evitar la precipitación de los agentes contrastantes. Se tiñeron con citrato de plomo durante 1 minuto y se volvieron a lavar en agua destilada descarbonatada según la técnica de Dawes (1988) y Durand y cols. (1997).

e) Observación microscópica

Los cortes se examinaron y se tomaron fotografías al Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss EM-9. Se realizaron mediciones de las dimensiones de las partículas virales, así como de su patrón de distribución dentro de las células afectadas.

RESULTADOS

Se detectó la presencia de inclusiones intranucleares en tejido branquial de *Litopenaeus vannamei*, las cuales se observaron e identificaron como pertenecientes al Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en camarones cultivados en Nicaragua, Centroamérica. Con la técnica ultraestructural se notaron caracteres diagnósticos confirmatorios para este patógeno tales como forma y tamaño de los virus así como daño citológico en células afectadas.

Se observaron a través de la parte anterior de una lamela branquial varias células de forma redondeada o alargada con núcleos hipertrofiados, sin presencia del WSSV (fotos 1-3). La citopatología comparativa diagnóstica se observó entre células pequeñas con núcleos hipertrofiados y sin presencia del WSSV y células con núcleo hipertrofiado y presencia del WSSV (foto 4). Se notaron células infectadas con el virus, núcleos dañados por la hipertrofia nuclear y el agrandamiento de las células afectadas (Foto 5). Estas estuvieron infectadas moderadamente (foto 6), o severamente (foto 7), con áreas necrosadas. En células alargadas, se observó infección severa por parte del WSSV (foto 8).

En algunas células de forma redondeada se observó el núcleo hipertrofiado ocupando la mayor parte de la estructura celular, y los virus ocupando moderadamente la zona nuclear (foto 9). Las áreas afectadas por la necrosis o las células infectadas fueron claramente evidentes (foto 10), lográndose notar la forma y tamaño del WSSV (foto 11).

Las zonas nucleares necrosadas y las zonas ocupadas por virus de diferente forma se observaron en los cortes finos de las lamelas branquiales seccionadas (foto 12).

El arreglo uniforme del “virus de la mancha blanca” (WSSV) dentro del núcleo de la célula branquial hipertrofiada y los caracteres diagnósticos típicos del virus como la forma cilíndrica y su nucleocápside son vistos claramente en las fotos 13-14.



Foto 1.- Observación a través de la parte anterior de una lamela branquial con tres células con núcleos hipertrofiados, sin el Virus de la Mancha Blanca (WSSV).
4,448 X.

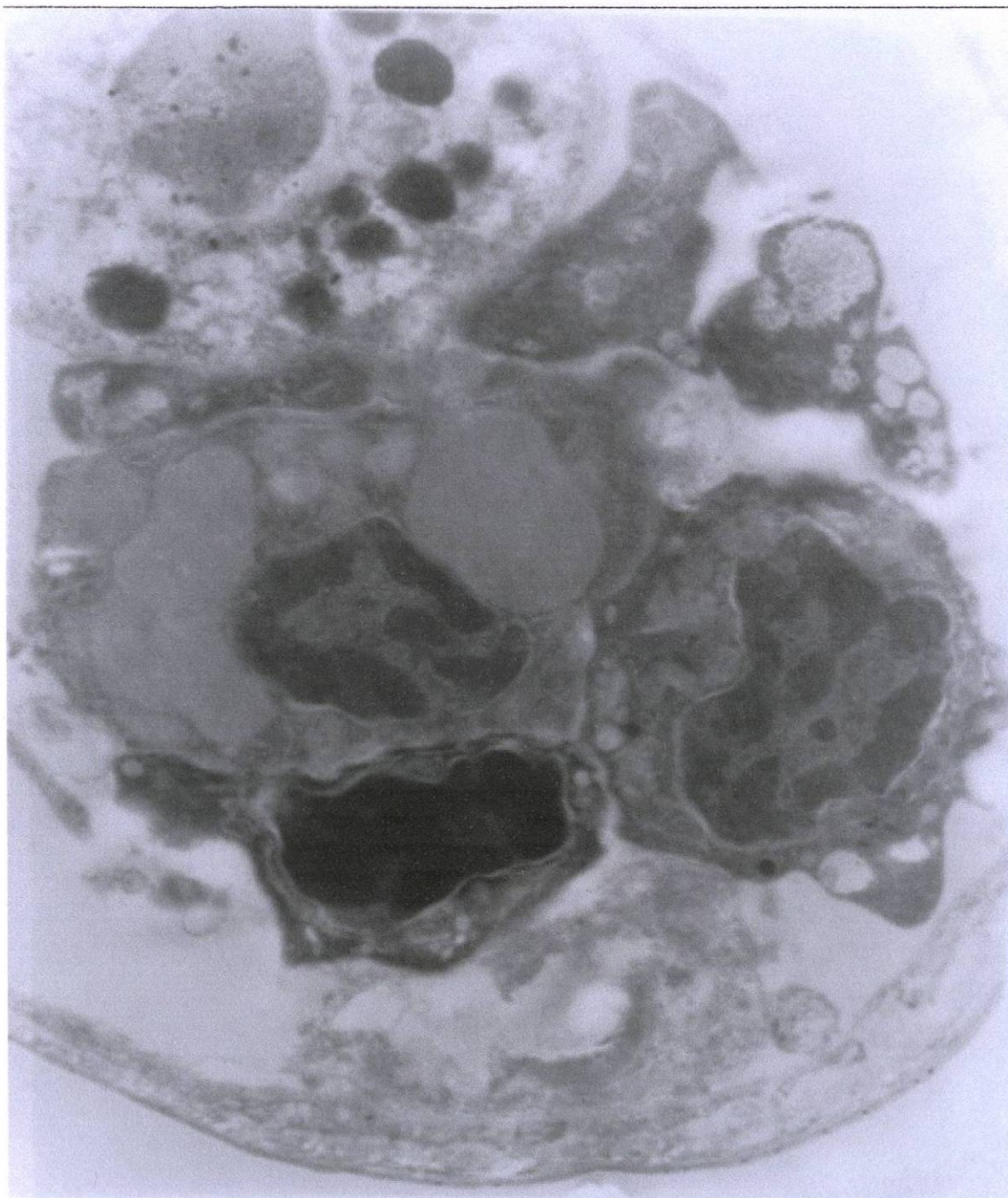


Foto 2.- Lamela branquial con varias células con hipertrofia nuclear, sin presencia viral. 5,900 X.

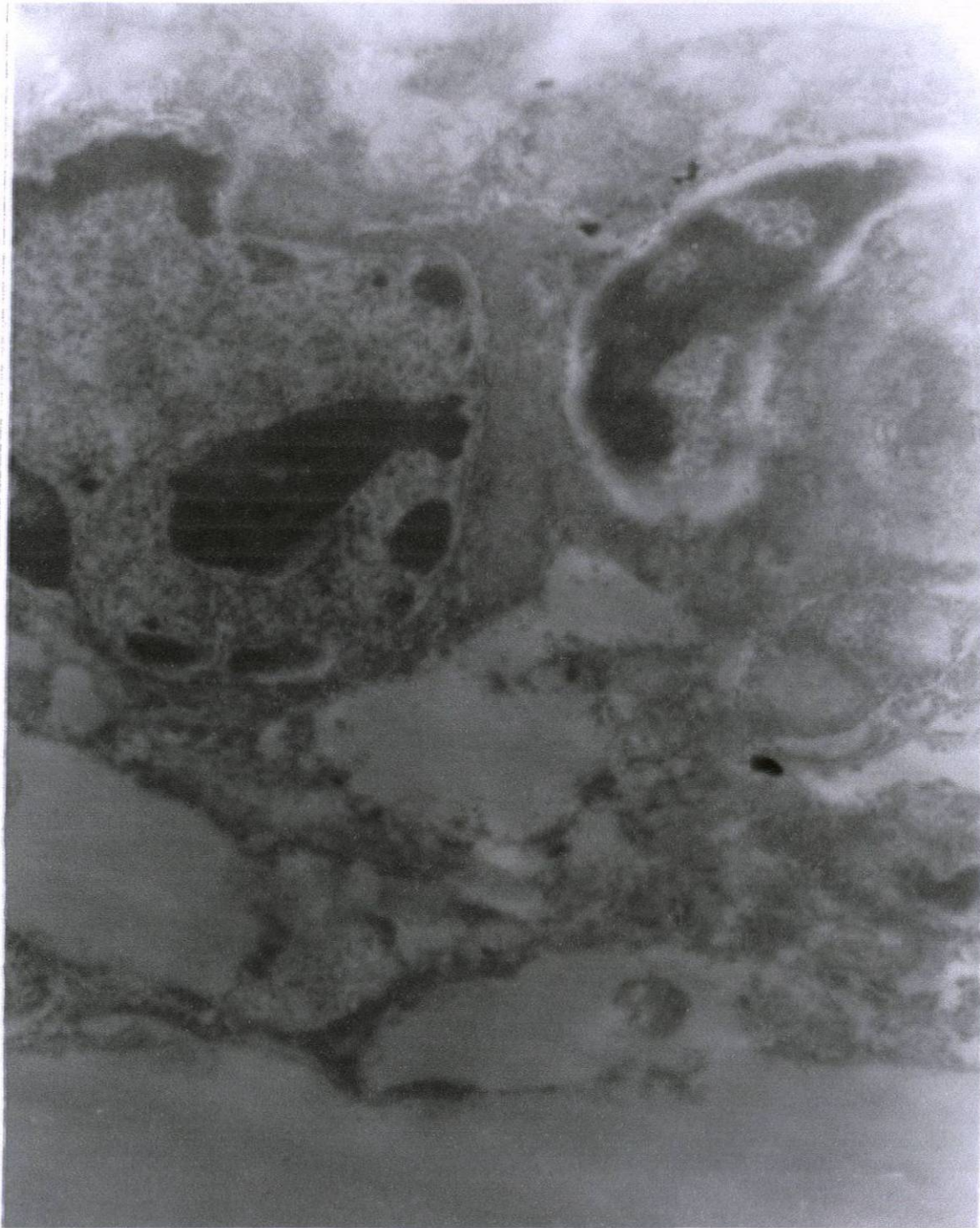


Foto 3.- Áreas celulares que muestra dos núcleos alargados y citoplasma granular, no observándose virus. 14,710 X.

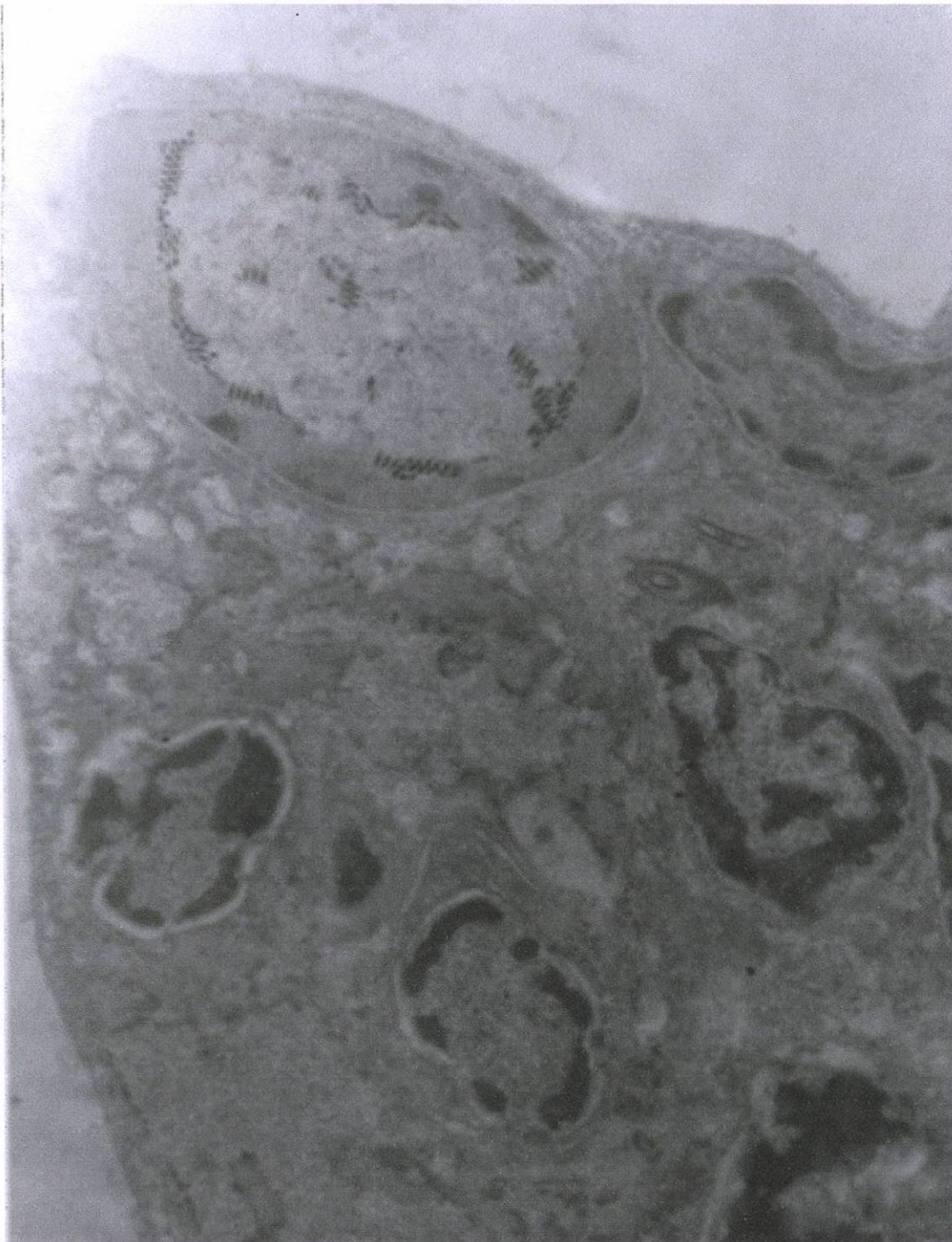


Figura 4.- Citopatología comparativa diagnóstica entre células con núcleos hipertrofiados sin virus de tamaño mas pequeño que la célula con núcleo hipertrofiado y presencia del Virus de la Mancha Blanca WSSV. 8,088 X.

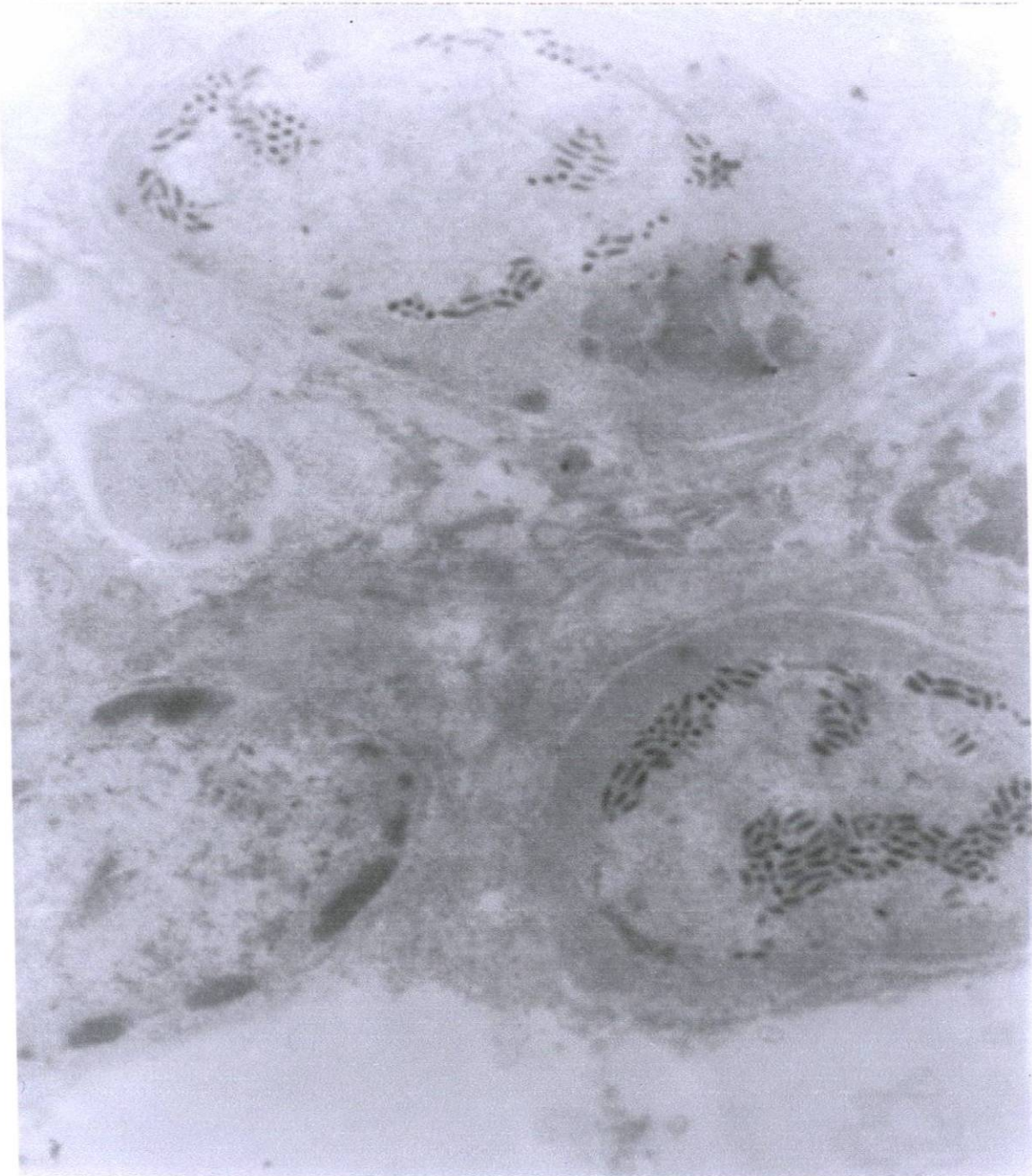


Foto 5.- Observación de las células con el Virus de la Mancha Blanca (WSSV) núcleos dañados con hipertrofia y una célula agrandada sin virus. 13,500 X.

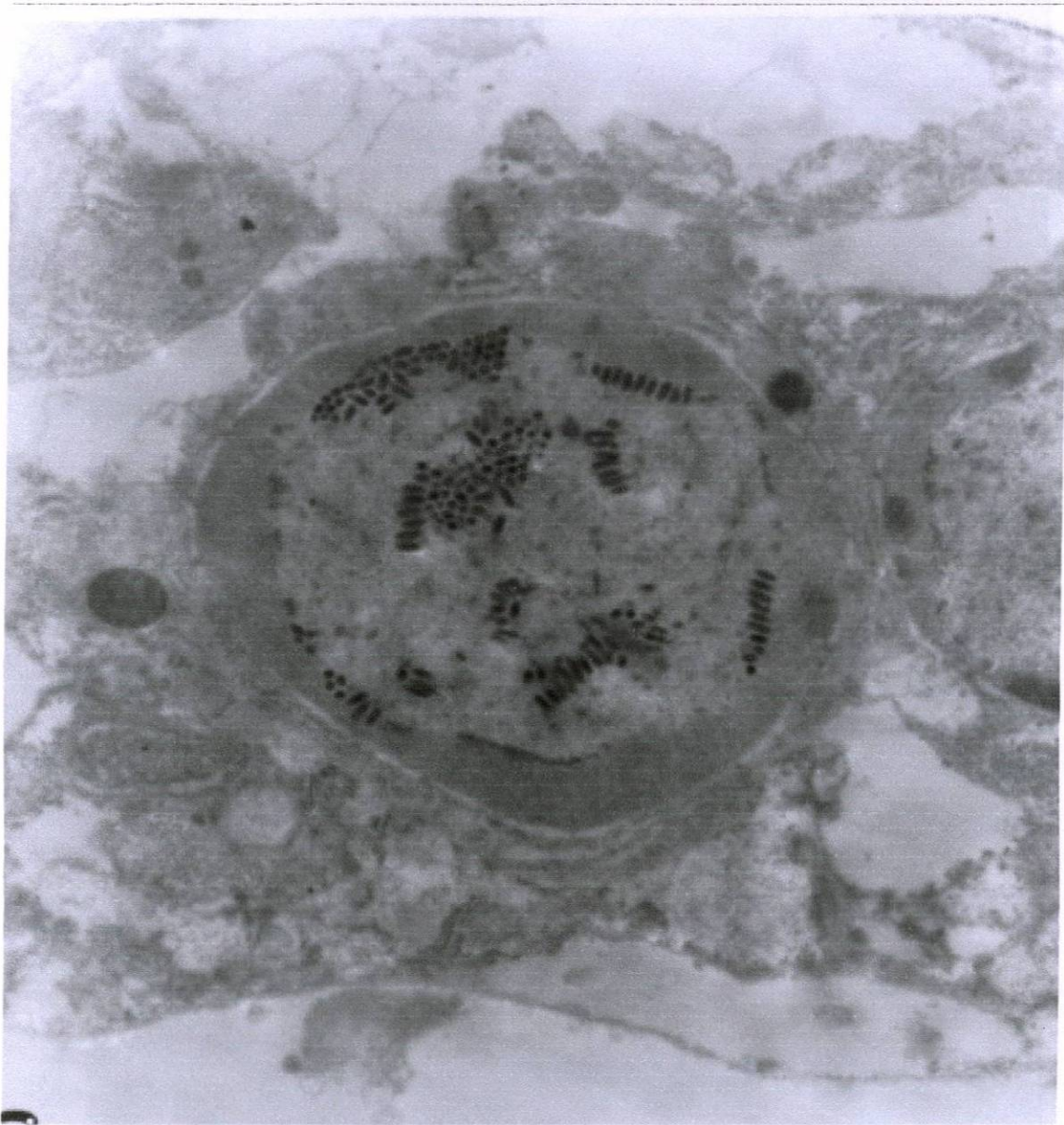


Foto 6.- Célula infectada moderadamente con el Virus de la Mancha Blanca (WSSV), nótese el núcleo hipertrofiado y los virus. 11,700 X.

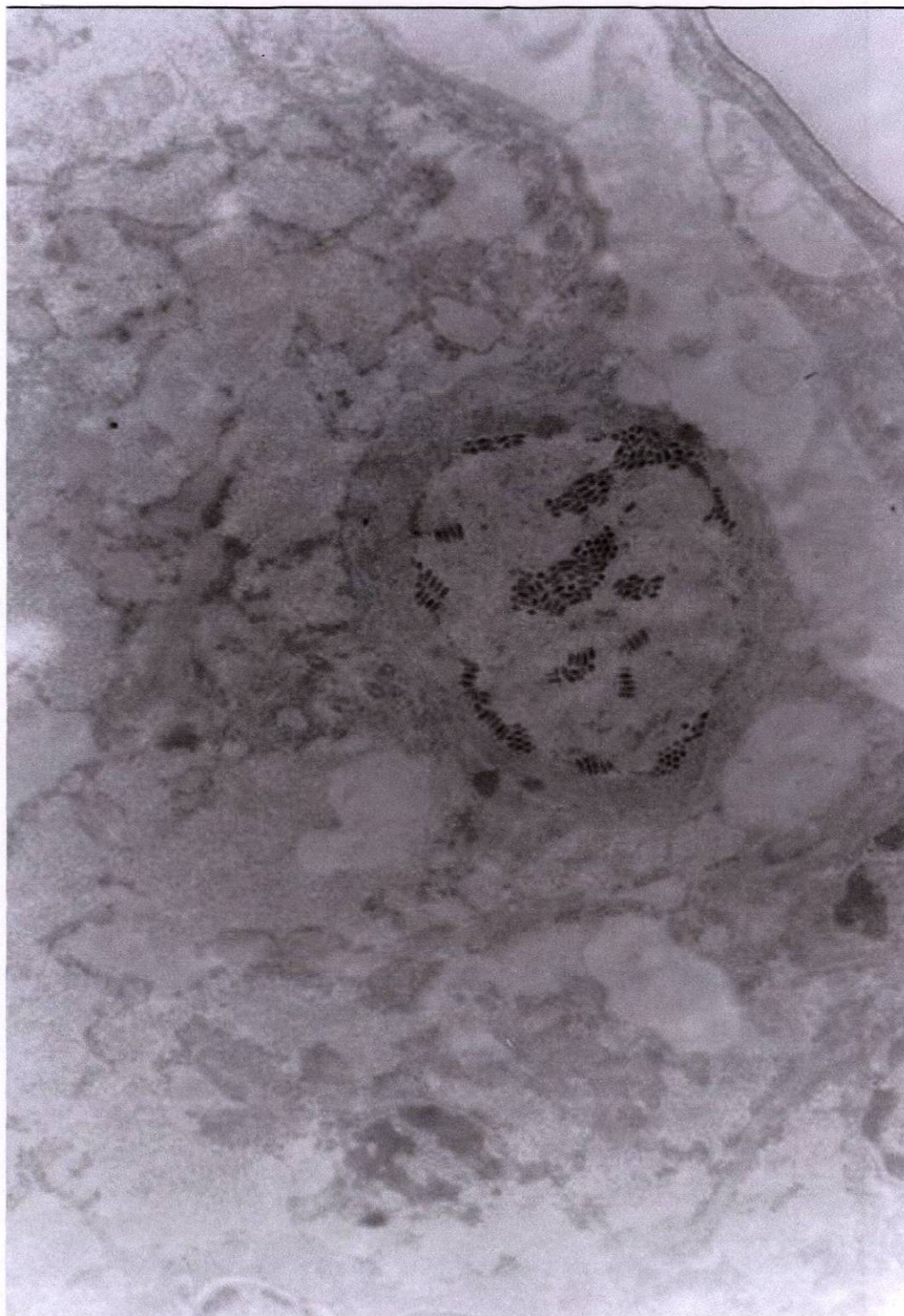


Foto 7.- Se observa membrana celular, núcleo hipertrofiado y presencia del Virus de la Mancha Blanca (WSSV), con áreas necrosadas severas. 6, 160 X.

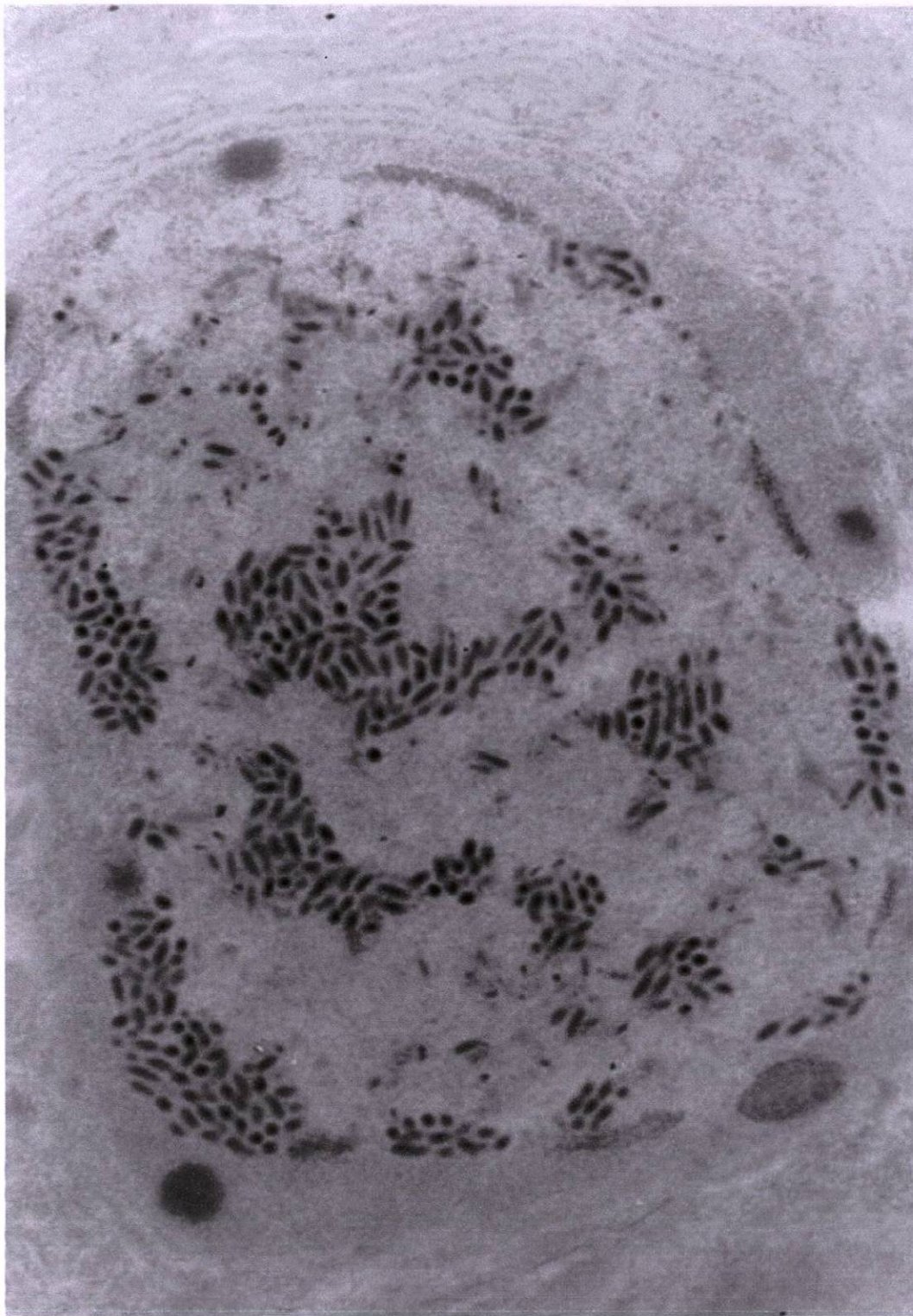


Foto 8.- Ampliación de la célula infectada severamente por el Virus de la Mancha Blanca (WSSV), se observa el núcleo agrandado. 14,400 X.

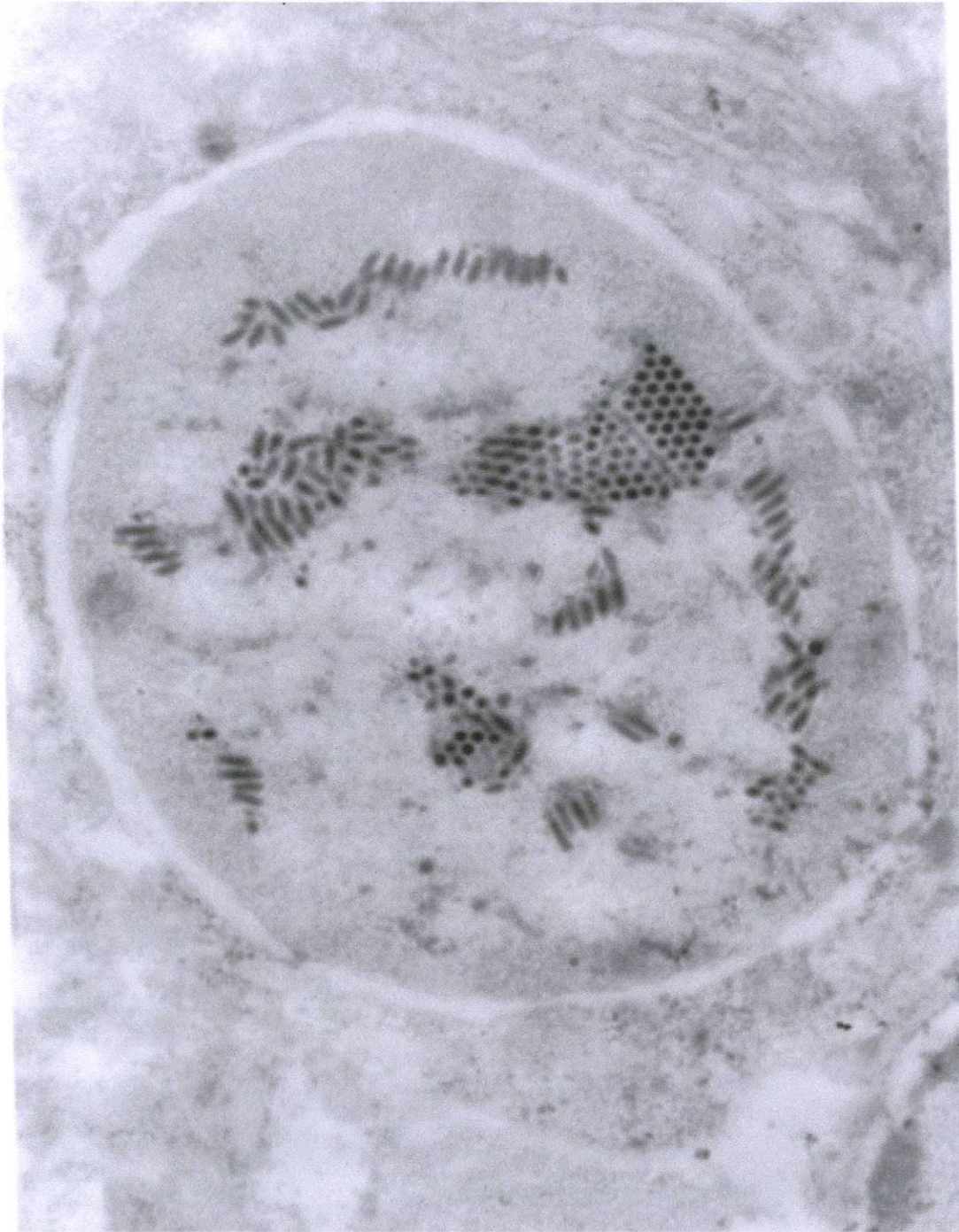


Fig. 9.- Célula redondeada con el núcleo hipertrofiado ocupando la mayor parte de la estructura celular. Los virus ocupan moderadamente el núcleo. 17,024 X.

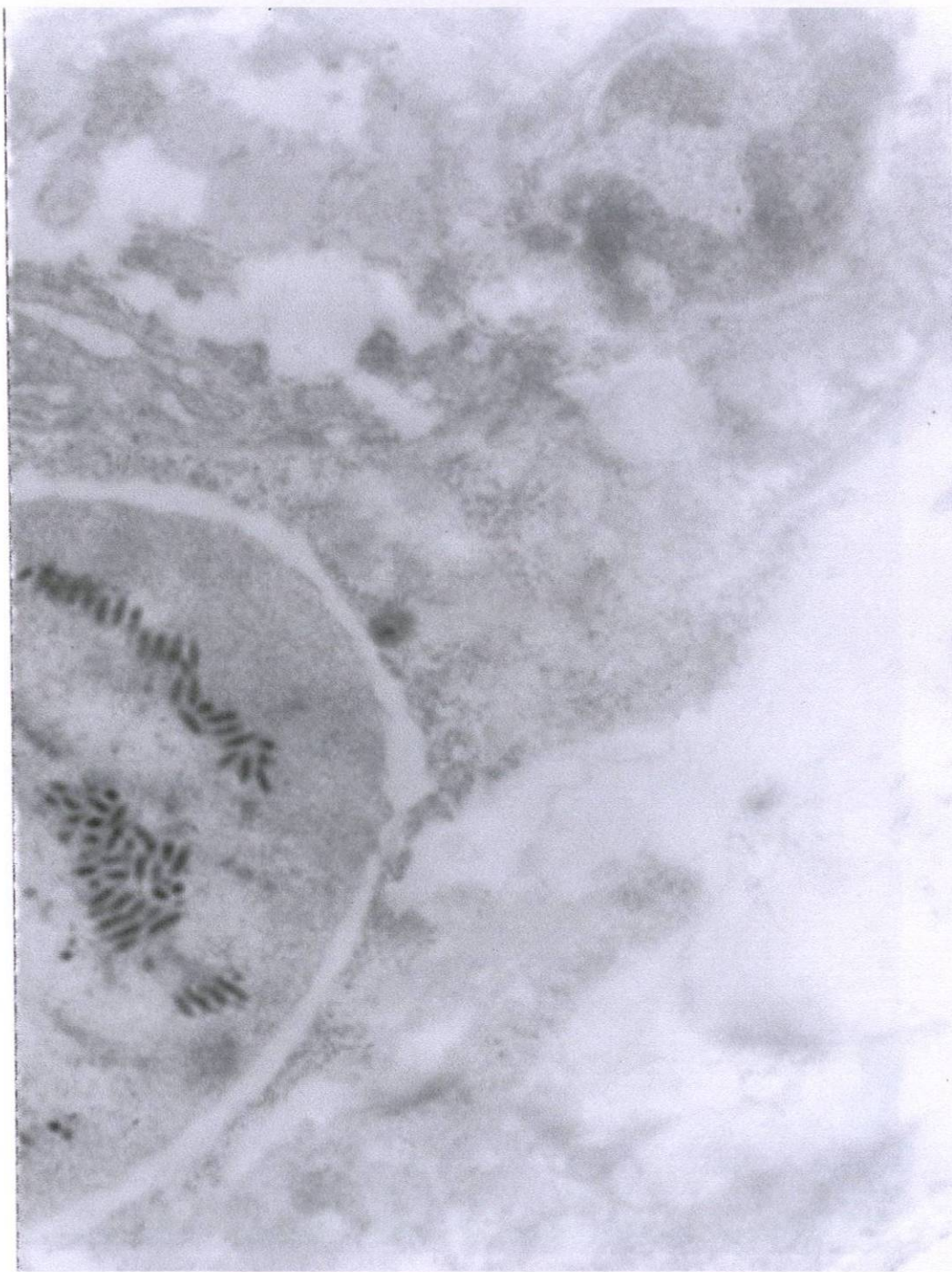


Foto 10.- Observación de dos áreas con la célula infectada por el Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y tejido dañado. 17.024 X.

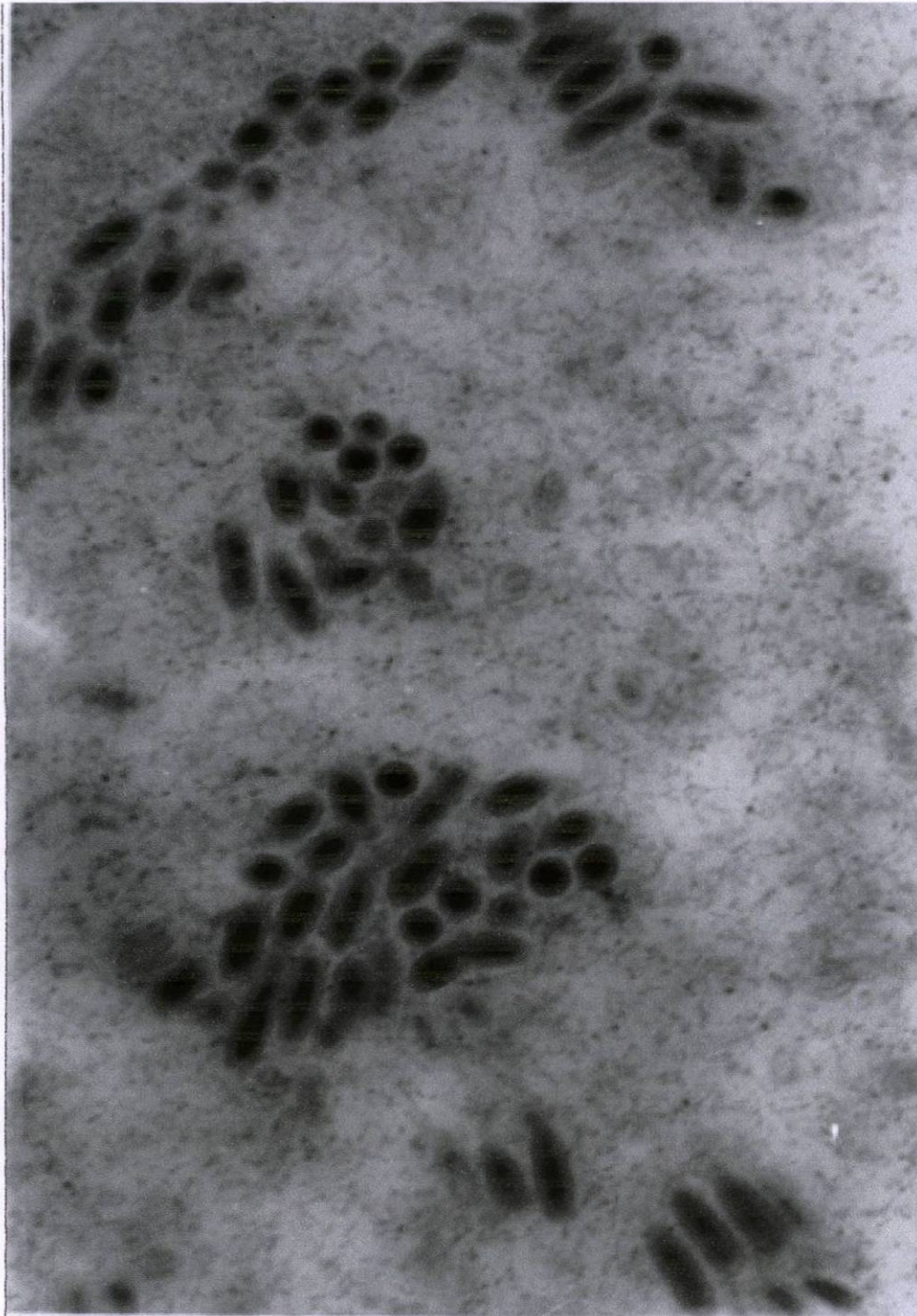


Foto 11.- Ampliación de las zonas necrosadas y la observación de la forma y tamaño del Virus de la Mancha Blanca (WSSV). Azul de Toluidína – Fucsina básica. 66,240 X.

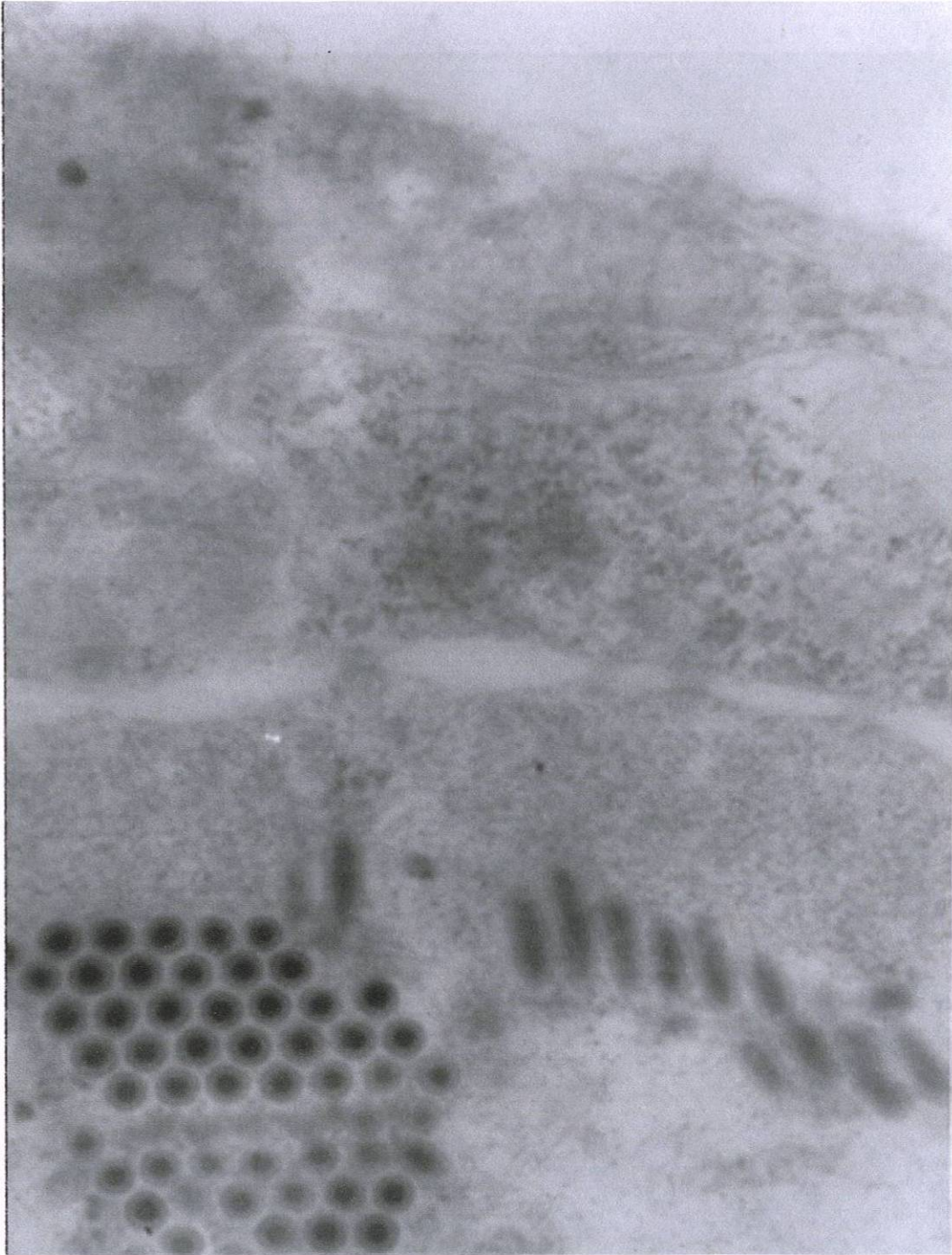


Foto 12.- Zona nucleares necrosadas y zonas ocupadas por virus de diferente forma vistos en los cortes finos de lamelas branquiales. Azul de Toluídina – Fucsina básica. 48,016 X.

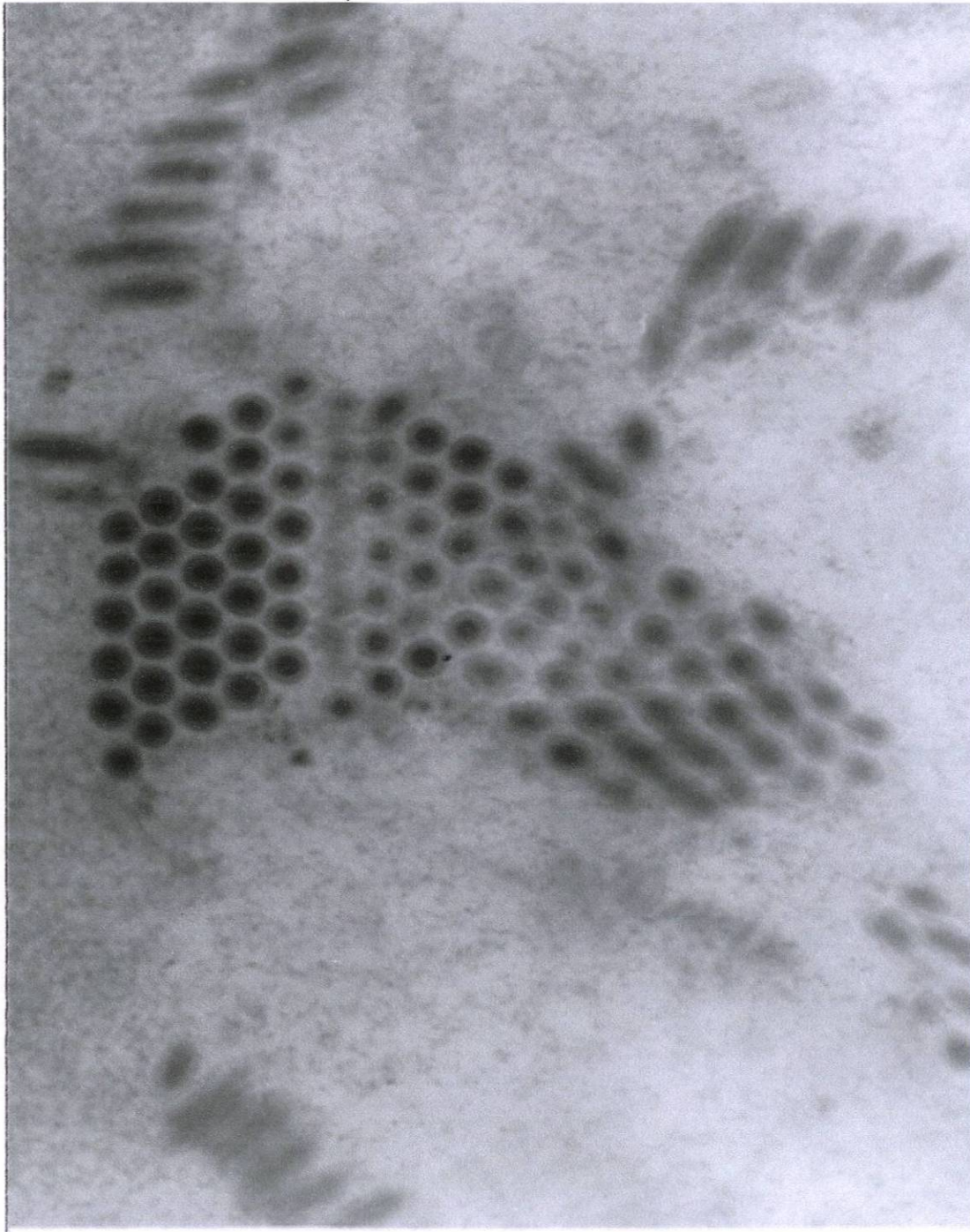


Foto 13.- Arreglo uniforme del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) dentro del núcleo de la célula branquial hipertrofiada. 48,016 X.

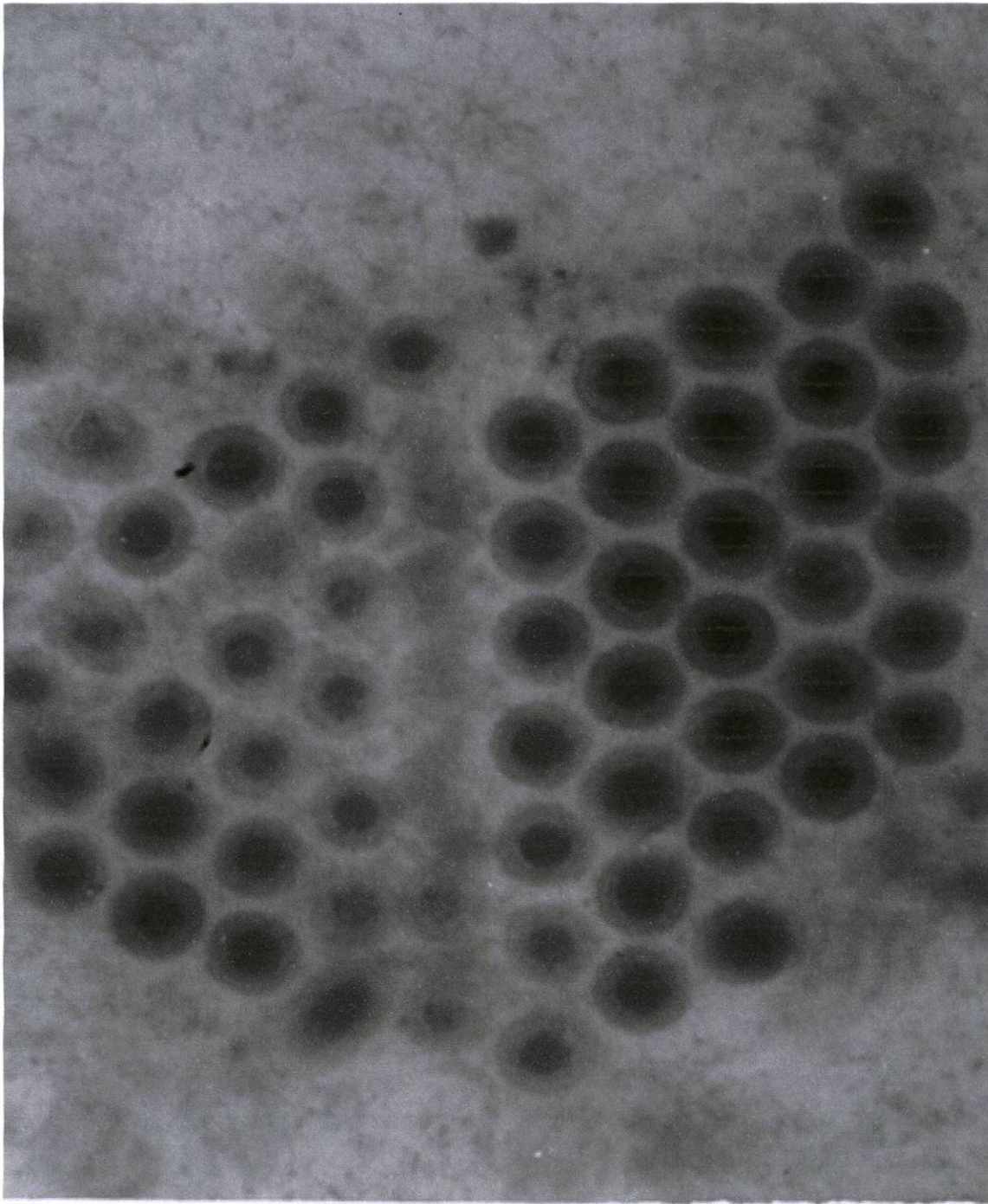


Foto 14.- Amplificación a través de los Virus de la Mancha Blanca (WSSV) dentro se observa su nucleocapside. 113,000 X.

DISCUSIÓN

Se realizó una investigación acerca del análisis ultraestructural del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en el camarón *Litopenaeus vannamei* cultivado en algunas granjas ubicadas en Centroamérica.

Al comparar este trabajo con los informados a la fecha se encontró que existen datos similares en relación a su morfología observada de forma cilíndrica o varilla, terminación apical y replicación en núcleos de células de las lamelas branquiales en los hospederos infectados.

En relación al tamaño del WSSV investigados en este estudio, se notó que los viriones ubicados intranuclearmente en células lamelares midieron entre 120.8 nanómetros (nm) x 312.4 nm de longitud. Las nucleocápsides midieron de 64.5 x 235 nm; siendo más pequeño que los mencionados por (Inouye *et al*, 1994) donde ellos informan que el virion tuvo medidas que estuvieron en un rango de 404 nm x 152 nm y las mediciones de las nucleocapsides estuvieron entre 86 nm x 363 nm; además de infectar al camarón en *Marsupenaeus japonicus*.

Otro estudio relacionado siendo diferente es el reportado por Wongteerasupaya *et al*, (1995), quienes encontraron medidas de los viriones entre los rangos de de 270 +/- 121 nm con la nucleocápside de 201 +/- 89 midiendo también nucleocapsides vacías de 302 +/- 85 nm.

Otros viriones WSSV comparados fueron los descritos por Zhan *et al*, (1997), quienes en *Penaeus chinensis*, *P. monodon* y *P. japonicus* describieron el virion con medidas de 150 x 350 nm y nucleocapsides de 120 x 325 nm. Otros rango comparado fue el mencionado por Wang *et al*, (1999) en *Penaeus monodon*, donde los viriones midieron de 305 +/- 30 x 127 +/- 11 nm de longitud; siendo estas mediciones las más similares a las descritas en éste trabajo.

CONCLUSIONES

Se logró la identificación del virus de la mancha blanca (WSSV) alojado intranuclearmente en células de las branquias de camarones peneidos cultivados en Nicaragua, Centroamérica. La detección del WSSV fue confirmado por medio de Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM), en base a la observación de lesiones en tejido branquial, tomando en cuenta el análisis de la forma y tamaño del WSSV en los núcleos de las células afectadas.

LITERATURA CITADA

Alday, V. 1999. Diagnóstico y prevención de la enfermedad del punto blanco. *El Mundo Acuícola*. 5: pp3-6.

Aranguren L.F, Vidal O.M., Aragón, Salazar, M, Granja. C.B. 2003 Does hyperthermia increase apoptosis in White spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*. *Diseases Aquatic Organisms* 17: pp.73-8.

Baldenegro, S. 2005. Cae producción de camarón. Tomado del Periódico EL NORTE: **Nacional**, 27 de Junio del 2005. Pp. 15A.

Bonami, J.R., D.V: Lightner, R. M. Redman, and, B.T. Poulos. 1992. Partial characterization of a togavirus (LOVV) associated with histopatological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 14: pp. 145-152.

Calderon, J., B. Bayot, I. Betancourt, and V. Alday de Graindorge. 1999. Monitoreo del Virus de la Mancha Blanca en Ecuador. *El Mundo Acuícola*. 5: pp. 211-214.

Corbel, V. Z., Zuprizal, C., Sumartono, S., Arciel J.M., & Bonami. J.R., 2001. Experimental infection of European crustaceans with White Syndrome Virus (WSSV). *Journal of Fish Diseases*. 24: pp.377.

Chien Tu, Huang. Hsu-Tien, Chuang. Sheng-Hsiung, Hsu. Jung-Ping, Kuo. Shu-Ting, Li. Nan-Jung, Hsu. Tien-Lai, Li. Ming-Chang, Lin. Shih-Yuh. 1999. Taura syndrome in Pacific White shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Diseases Aquatic Organisms* 38: pp. 159-161.

Dawes, C. J. 1988. Introduction to Biological Electron Microscopy. Theory and Techniques Land Research Industries. Publisher Burlington, Vermont. pp. 311.

Durand S, D.V. Lightner, R.M. Redman, J.R. Bonami.1997. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Diseases Aquatic Organisms* 29: pp. 205-211.

Flegel, T.W. 1997. Special Topic review, major viral diseases of the black tiger prawn *Penaeus monodon* in Thailand. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13: pp 433-442.

Galaviz L. 1999, Virus del Síndrome de Taura (STV) y virus del Síndrome de la Mancha blanca (WSSV) agentes causantes de Epizootias en la camaronicultura Mexicana (1996 - 1999) Tesis de Doctorado F.C.B., UANL.

Hasson K., K. Cleveland, K Brovont, A. Mazari, L. Tron & S. Páez. 2000. Diagnóstico rápido del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) en tejidos recién fijados. *Boletín Técnico. Laboratorio de Manejo de Enfermedades. Súper Shrimp S.A. de C.V. Mazatlán. Pp.3*

Jiménez G.F., Galaviz, L., Segovia, S.F., Salinas N., Ramos, M., Molina, De la Cerda G. 1999. Presencia del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) en México. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. Volumen 2, Numero 7. pp.1-2.*

Jiménez R, R. Barnitol, L. de Barnitol, M.Machuca.2000. Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Diseases Aquatic Organisms* 42: pp. 91-99.

Lightner D.V., 1996. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured of Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, U.S.A. Pp. 305.

Linne U. B., 2000. Importancia del Monitoreo Patológico, Métodos de Muestreo y envío de Muestras de Camarones Peneidos. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnostico. Año 3, Volumen 2, Numero 10. CIBNOR S.C. - B.C.S.*

Linne U. B., Morales, C. C., Mejia. R. Asensio. C. 2000. Presencia del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en cultivos de camarones peneidos de Sonora y Sinaloa México. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnostico. Año 3, Volumen 1, Numero 9.

Lux A. 1989. Manual de Microscopia Electrónica, Ultraestructura y Citología Vegetal. Universidad de Bratislava. Vol. 1: pp. 12-52.

Martínez L. 2002. Purificación y Caracterización de las Partículas virales del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) Aislado de camarones *Litopenaeus vannamei* Infectados en Granjas Camaronícolas de las costas del Pacifico Mexicano. Tesis de Licenciatura F.C.B., UANL.

Mohan CV, Shankar K.M., Kulkarni S., Sudha P.M. 1998 Histopathology of cultured shrimp showing gross sing of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. Diseases Aquatic Organisms. 34: pp.9-12.

Reyes D. 1997, Ultraestructura del agente causal de una enfermedad similar al Síndrome Taura en el camarón blanco *Penaeus vannamei*, procedentes de granjas de Nayarit, México. Tesis de Licenciatura F.C.B., UANL. pp.25-26.

Rodríguez J, B. Bayot, Y. Amano, F. Panchana, I. de Blas, V. Alday, J. Calderón. 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. J. Fish Diseases. 26: pp.439-50.

Soto MA, V.R. Shervette, J.M. Lotz. 2001. Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) to *Litopenaeus vannamei* from infected cephalothorax, abdomen or whole shrimp cadaver. Diseases Aquatic Organisms 20: pp. 81-7.

Soto MA, Lotz. J.M., 2001. Epidemiological parameters of White Spot Syndrome virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. J. Inv. Pathology 48: pp.9-15.

Wang, CS; KFJ Tang; GH Kou, S Chen. (1997): Light and electron microscopic evidence of white spot disease in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), and the Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate), cultured in Taiwan. Journal of Fish.

Wang Y.G, MD. Hassan, M. Shariff, S.M. Zamri, X. Chen. 1999. Histopathology and citopathology 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 Aquatic Organisms. 22: pp. 1-11.

Wongprasert K., Khanobdee, S., Glunukarn, S., Meeratana, P., Withyachumnarnkul B., 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus. Diseases Aquatic Organisms 20: pp.3-10.

Xie X, H. Li, L. Xu, F. Yang. 2005. A simple and efficient method for purification of intact White spot syndrome virus (WSSV) viral particles. Virus Research.108: pp.63-67.

Zhan W.B, Wang Y.H, Fryer J. L, Yu K.K, Meng Q.X., 1997. White Spot Syndrome Virus Infection of Cultured Shrimp in China. Journal of Aquatic Animal Health. 10: pp.405-410.

