I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

En México, una de las áreas de la acuacultura más recientes y de alto desarrollo tecnológico es el cultivo de camarón, el cual, por su demanda y sus altos precios en el mercado internacional, ha sido considerado uno de los recursos marinos de mayor importancia económica (Lucien-Brun, 1997), siendo en los últimos años el cultivo que presenta mejores perspectivas y mayor expansión a nivel mundial (Lem y Shehadeh, 1997). No obstante, esta biotecnología ha tenido que enfrentar varios desafíos para su desarrollo. Entre estos destacan: a) el diseño de dietas con ingredientes de buena calidad y bajo costo, las cuales por un lado mejoren las tasas de crecimiento y los factores de conversión alimenticia y que por otro reduzcan significativamente los costos de producción (Bringas *et al.*, 1999); b) el abastecimiento de poslarvas que cubran de manera estable las demandas del mercado en términos de cantidad y calidad (Hernández-González, 1997); c) el manejo eficiente de los sistemas de cultivo (Fast y Lester, 1992) y d) la prevención, o por lo menos la detección tempestiva y en algunos casos el control de epizootias que pudieran afectar significativamente el desarrollo de esta industria (Unzueta-Bustamante, 2000).

Los problemas patológicos en los cultivos semiintensivos, que son los que mayormente se practican en nuestro país (Martínez-Córdova, 1999), se atribuyen generalmente a los causados por virus, bacterias, hongos y protozoarios (Unzueta-Bustamante, 2000) además de las enfermedades causadas por factores no infecciosos generalmente relacionadas con la alimentación (Xu *et al.*, 1993).

En varias investigaciones se ha determinado que las epizootias virales son las que han causado mayores pérdidas económicas debido a las altas mortalidades que provocan en los cultivos, ya que hasta la fecha no se ha desarrollado ningún tratamiento que permita controlarlos (Pruder *et al.*, 1995). A esto se agrega el problema que los camarones, al igual que otros invertebrados, no poseen mecanismos inmunológicos de respuesta antígeno-anticuerpo (Bonami, 1997).

El primer virus detectado en camarones peneidos fue el virus del síndrome de la nucleosis poliédrica de *Penaeus vannamei* (Pv SNPV) antes conocido como *Baculovirus penaei* (BP), reportado por Couch (1974a y b) en organismos silvestres de *Penaeus duorarum* de las costas de Florida en el Golfo de México. Desde entonces, se han

detectado alrededor de 15 virus, los cuales han sido reportados como agentes infecciosos en diferentes poblaciones de camarón alrededor del mundo. Entre estos, el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoiética (IHHNV), el virus del síndrome de Taura (TSV), y el virus del síndrome de la cabeza amarilla (YHV), se encuentran dentro de los ocho más importantes en virtud de su frecuencia de aparición, su amplia distribución y su capacidad de provocar severas epizootias, las cuales resultan en altas mortalidades y en fuertes pérdidas económicas en los cultivos (Bonami, 1997).

WSSV es un virus de doble banda de ADN, cuya molécula supera los 306 kpb, los virones son fusiformes, con tamaño que varía entre 70 y 150 nm en su eje transversal y de 250 a 380 en el longitudinal. Basándose en sus características morfológicas y en su estructura genómica, Yang et al. (2001) lo clasificaron como un miembro de la familia Nimaviridae.

Los organismos infectados por WSSV muestran como signos clínicos manchas o parches blancos de 0.3 a 0.5 mm de diámetro en la superficie interna del caparazón, apéndices y en menor grado en el abdomen, letargia, anorexia, enrojecimiento por la expansión de los cromatóforos y mortalidades que pueden alcanzar hasta un 100% de 3 a 10 días después de haber aparecido los síntomas de la enfermedad (Inouye *et al.*, 1994; Momoyama *et al.*, 1994; Nakano *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994; Lightner, 1996a).

Este virus fue detectado por primera vez en 1992 en Taiwán, en cultivos de *Penaeus monodon* (Chou *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995). Un año después se reportó en China (Kasornchandra y Boonyaratpalin, 1994; Jie *et al.*, 1995) y desde entonces ha sido identificado en la mayoría de los países asiáticos en los cuales la industria camaronícola está mayormente intensificada, como Japón, Indonesia, Tailandia, Malasia, e India (Inouye *et al.*, 1994; Momoyama *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994; Kasornchandra *et al.*, 1995).

En los países asiáticos el WSSV afecta principalmente los cultivos de *Penaeus monodon*, *P. chinensis*, *P. indicus*, *P. penicillatus* y *P. japonicus* (Inouye *et al.*, 1994; Nakano *et al.*, 1994; Chou *et al.*, 1995 y 1998; Huang *et al.*, 1995a; Wang *et al.*, 1995; Wongteerasupaya *et al.*, 1995a; Chang *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1996a; Mohan *et al.*, 1998; Nunan *et al.*, 1998a; Park *et al.*, 1998). Por otra parte, además de estas especies, afecta también los cultivos de *Metapenaeus ensis*, *P. aztecus*, *P. vannamei*,

P. stylirostris, y *Trachypenaeus curvirostris* (Cai *et al.*, 1995; Lightner *et al.*, 1997 y 1998; Nunan y Lightner, 1997; Tapay *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1998; Nunan *et al.*, 1998a; Wang *et al.*, 1998 y 1999), en los cuales ha causado fuertes pérdidas económicas debido a las altas mortalidades que por lo regular han alcanzado entre el 80 y 100% de las poblaciones infectadas.

La presencia de WSSV en el continente americano se reportó por primera vez en 1995, en cultivos de *Penaeus setiferus* en Texas. Al parecer, la fuente de contaminación fueron algunas plantas procesadoras de camarón aledañas al área afectada, las cuales introdujeron camarón procedente de países asiáticos (Lightner, 1996a). Dos años después fue detectado en Carolina del Sur (Lightner, 1999) y para 1999 ya se conocía de su presencia en Centro y Sudamérica (Jory y Dixon, 1999). Hasta esa fecha, su presencia no se había reportado en los sistemas de cultivo mexicanos y en efecto, en un estudio realizado por Vega-Pérez (2003) con muestras colectadas en 1999 en los estados de Nayarit, Sinaloa y Sonora este virus no fue detectado, aunque ya se le atribuían algunos eventos de alta mortalidad, principalmente en las granjas de las costas del Pacífico mexicano.

IHHNV posee un genoma de cadena sencilla de ADN cuyo tamaño aproximado es de 4.1 kpb, por lo cual es considerado el más pequeño entre los virus que afectan a los camarones peneidos (Adams y Bonami, 1991; Bonami *et al.*, 1992 y Lightner *et al.*, 1994a). Sus virones son de forma icosahédrica, con un tamaño promedio de 22 nm de diámetro, carecen de envoltura y tiene una densidad de 1.4 $g \cdot ml^{-1}$ en CsCl.

Considerando estas características, Bonami *et al.* (1992) lo clasificaron como un miembro de la familia Parvoviridae. Su distribución es amplia, ya que emplea como huéspedes a varios de los camarones peneidos cultivados en diferentes regiones geográficas del mundo y aunque su origen no se conoce a ciencia cierta (Brock *et al.*, 1983; Brock y Lightner, 1990; Lightner, 1983 y 1988; Lightner *et al.*, 1983a y b; Lightner *et al.*, 1985; Lightner y Redman, 1991 y Lightner y Redman, 1992), la ocurrencia de IHHNV en cultivos de *Penaeus monodon* provenientes de reproductores silvestres en el Sureste de Asia (Singapur, Malasia, Indonesia y Filipinas) sugiere que esta región se encuentra dentro del área de origen del virus y que *P. monodon* es su especie hospedera natural (Lightner, 1983; Lightner y Redman, 1992 y Lightner *et al.*, 1992a).

Por otro lado, la introducción y el establecimiento de IHHNV a nuevas regiones geográficas son temas muy bien documentados. Tal fue el caso de México, donde se introdujo en 1987 un lote de poslarvas infectadas de *P. vannamei* (Lightner *et al.*, 1992c y d), lo cual tuvo un impacto negativo muy serio en la industria camaronícola (Brock y Lightner, 1990; Lightner 1992 y 1993; Lightner *et al.*, 1992b, c y d; Moore, 1991; Moore y Brand, 1993; Pantoja-Morales, 1993; Pantoja-Morales y Lightner, 1991), que se reflejó en 1989 y 1990, en una serie de epizootias severas en cultivos de *P. stylirostris* en granjas de Sonora y Sinaloa (Lightner *et al.*, 1992c y d), las cuales ocasionaron grandes pérdidas económicas.

La solución práctica a este problema fue el cultivo de *P. vannamei*, el cual muestra una resistencia natural a este virus (Bell y Lightner, 1984). Los organismos infectados de esta especie solamente presentan en su sintomatología una reducción en las tasas de crecimiento y, en algunos casos, deformidades en la exocutícula que afectan las áreas del rostro y del cefalotórax (Castille *et al.*, 1993; Browdy *et al.*, 1993; Brock y Main, 1994) y aunque no se presentan mortalidades estas pueden reducir su valor comercial en el orden del 10 al 50% (Kalagayan *et al.*, 1991; Wyban *et al.*, 1992).

Mientras que algunos investigadores argumentaron que la dispersión de IHHNV fue de manera horizontal a nivel de granjas (Lightner *et al.*, 1992d), otros lo detectaron presente en poblaciones silvestres de *P. vannamei*, *P. stylirostris* y *P. californiensis* de las regiones del centro y norte del Golfo de California, siendo *P. stylirostris* la especie que presentó los mayores niveles de infección, con prevalencias de hasta un 46% (Pantoja-Morales y Lightner, 1991; Pantoja-Morales, 1993), considerándola como el porcentaje de hospederos infectados con respecto al total de los hospederos examinados (Bush *et al.*, 1997). Las altas prevalencia registradas en granjas, probablemente se debió a que en esos años la mayoría de las poslarvas que se introdujeron a los estanques de engorda fueron de origen silvestre y en algunos casos, cuando se trató de poslarvas cultivadas en laboratorios, estas provenían de reproductores silvestres (Voltolina, *com pers.*).

El TSV es un picornavirus, cuya estructura icosahédrica es de aproximadamente 30 nm de diámetro, carece de envoltura, presenta replicación citoplásmica y posee un genoma lineal de cadena sencilla de ARN de aproximadamente 9 kb (Lightner, 1996a y b;

Voltolina, Domenico. Laboratorio Interinstitucional de Microalgas UAS-CIBNOR, Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa.

Bonami *et al.*, 1997; Mari *et al.*, 1998).

Los signos patológicos muestran que el síndrome de Taura es una enfermedad que en su fase critica causa altas mortalidades, las cuales generalmente ocurren entre los 15 y 40 días posteriores a la siembra. Sin embargo, la enfermedad puede volverse crónica en aquellos organismos que sobreviven, con presencia de melanizaciones en la cutícula durante ciclos de muda sucesivos, pero que desarrollan de manera normal sus actividades motoras y alimenticias (Stern, 1995).

Otras de las características de esta enfermedad son la necrosis y picnosis nuclear del epitelio de la superficie general del cuerpo, apéndices, branquias, boca, esófago, estómago e intestino (Brock *et al.*, 1995; Lightner *et al.*, 1995; Lightner, 1996a). El TSV fue detectado por primera vez en juveniles de *P. vannamei* en junio de 1992 en granjas aledañas al margen de la boca del río Taura en el Golfo de Guayaquil, Ecuador (Jiménez, 1992; Rosemberry, 1993a; Wigglesworth, 1994; Lightner *et al.*, 1997). Desde entonces este virus se ha dispersado progresivamente en varias direcciones y ha causado problemas en cultivos de camarón en Belice, Colombia, Honduras, Guatemala, Perú (Wigglesworth, 1994; Lightner *et al.*, 1994b; Brock *et al.*, 1995) y poco tiempo después en algunas regiones de Estados Unidos y en los estados de Chiapas, Guerrero, Sinaloa y Sonora, en México (Lightner, 1996a) en donde, a mediados de la década pasada, causó graves pérdidas económicas (Hasson, 1998).

El TSV ha sido considerado el agente epizoótico más importante para *P. vannamei*, ya que para 1993 esta especie representaba cerca del 90% del camarón cultivado en América y entre el 15 y 20% en el mundo (Rosemberry, 1993a y b). Por otra parte, al contrario de las infecciones de IHHNV, *P. stylirostris* muestra una alta resistencia a este virus.

De manera simultánea a los brotes del WSSV en los cultivos taiwaneses de *Penaeus monodon*, YHV fue detectado en Tailandia en camarones de esta misma especie (Boonyaratpalin *et al.*, 1993; Chantanachokin *et al.*, 1993). Desde entonces ha sido objeto de muchos estudios y algunos años después fue propuesto como miembro de la familia Rhabdoviridae por Nadala *et al.* (1997) ya que, al igual que TSV, se trata de un virus de cadena sencilla de ARN (Wongteerasupaya *et al.*, 1995b), bacilariforme de aproximadamente 38 a 50 nm de ancho y de 160 a 186 nm de largo, con reproducción citoplasmática (Chantanachokin *et al.*, 1993). Actualmente, se ha propuesto una nueva

familia (Pranidoviridae) para ubicar este virus y algunos otros (GAV, LOV, étc.) debido a sus muy particulares características tales como su genoma de ARN (+) (Bonami, *com pers.*).

La coloración amarilla de la región cefalotoráxica de *P. monodon*, que dio origen al nombre de esta enfermedad, no se observa en organismos infectados de *P. vannamei* y *P. stylirostris*, los cuales sólo muestran una coloración pálida antes de morir (Tang y Lightner, 1999).

Estudios histopatológicos de organismos infectados muestran necrosis en diferentes grados, con picnosis, cariorrexis nuclear, cuerpos de inclusión citoplasmáticos en el tejido afectado, especialmente en hemocitos, órgano linfoide, epitelio cuticular, branquias y tejido conectivo de algunos órganos, incluyendo músculo, glándula antenal, gónadas, órganos hematopoiéticos, nervios, tracto digestivo, etc. (Lightner, 1996a).

Hasta la fecha el YHV ha sido considerado como la enfermedad más virulenta que ha padecido *P. monodon*, ya que en 1992, causó pérdidas del orden de los 30 millones de dólares en sistemas de cultivo intensivo en Tailandia (Anónimo, 1993). Posteriormente este virus fue detectado en cultivos de la misma especie en la Republica Popular de China, Malasia, Indonesia y la India (Flegel *et al.*, 1995a y b; Flegel *et al.*, 1996; Lightner, 1996a) y en noviembre de 1995 en América en cultivos de *P. setiferus* en granjas de Texas, EUA (Lightner *et al.*, 1997; Nunan *et al.*, 1998a). Posteriormente, en 1999, fue detectado por primera vez en México, en cultivos de *L. vannamei* en granjas de Nayarit, Sinaloa y Sonora (Vega-Pérez, 2003).

En el estudio de las enfermedades virales que afectan a los cultivos de camarón, se han utilizado tradicionalmente métodos de diagnóstico basados en la sintomatología externa y de comportamientos, observaciones de tejidos frescos con el microscopio compuesto, histología e histoquímica, y más recientemente microscopía electrónica de transmisión (Overstreet, 1973; Johnson, 1975; Bell y Lightner, 1988; Ligthner, 1996a; Lightner y Redman, 1998).

El problema de las técnicas que involucran el análisis de tejido en fresco, la histología y la histoquímica, es que se requiere de un patólogo con mucha habilidad y experiencia que pueda identificar fácilmente las células dañadas, mientras que la microscopia electrónica de transmisión, a pesar de que es una técnica mucho más

Bonami, J.-R. . Unité Mixte de Recherche 5098 – CNRS – IFREMER – Université Montpellier 2, Montpellier, France.

eficiente, tiene la desventaja de que el costo de equipamiento es alto, lo cual limita su uso en el diagnóstico rutinario (De la Rosa-Vélez y Bonami, 2002).

Debido a estas limitaciones, a principio de la década pasada, se empezaron a construir sondas moleculares capaces de detectar bajos niveles de infección (Bonami, 1997). Estas sondas han sido desarrolladas a partir de la clonación de fragmentos del genoma viral presente en camarones infectados (Lightner *et al.*, 1992a; Mari *et al.*, 1993a y b; Bonami *et al.*, 1995; Durand *et al.*,1996), que posteriormente han sido marcadas no radiactivamente con digoxigenina (DIG), para utilizarse en el diagnóstico de enfermedades de una manera rápida y eficiente en pruebas de hibridación de la "gota inmovilizada sobre soporte sólido" (*dot-blot*) e hibridación *in situ*.

La hibridación *dot-blot* es una técnica molecular basada en una detección inmunológica de fragmentos genómicos (en este caso, el de los virus) utilizando sondas específicas marcadas con DIG, a la cual se adhieren los anticuerpos (AntiDIG-AP) que dentro de su estructura contienen a la enzima fosfatasa alcalina (AP) la cual, al momento de adicionar BCIP´s (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) y NBT (nitro azul de tetrazolio), cataliza una reacción redox oxidando el BCIP, el cual libera dos electrones. Estos son captados por el NBT que se reduce y precipita como azul de formazán.

Algunos de estos fragmentos han sido secuenciados para diseñar *primers* o cebadores específicos, que se utilizan para la síntesis de cadenas complementarias en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la transcripción reversa en PCR (RT-PCR).

La PCR es básicamente una reacción en donde se emplea un termociclador para amplificar *in vitro* regiones específicas de ADN a partir de un molde (en este caso es el genoma viral), utilizando los cebadores específicos y la enzima Taq ADN polimerasa entre otros (Vázquez-Juárez, 2000). Esta técnica permite amplificar de manera exponencial el ADN mediante un determinado número de ciclos, en los que se incluyen los procesos de: (1) desnaturalización del ADN; (2) alineación de los *primers* y (3) extensión o síntesis de bandas complementarias por acción de la enzima Taq ADN polimerasa. Esta técnica se emplea para la detección de virus cuyo genoma es de ADN, mientras que en el caso de los virus de ARN es necesario utilizar la técnica de la RT-PCR, la cual emplea la enzima trascriptasa reversa (RT) para sintetizar el ADN complementario (ADNc) a partir del ARN viral, para luego poderlo utilizar como templete en la PCR.

Las técnicas moleculares como la PRC, la RT-PCR y la hibridación *dot-blot*, son hasta la fecha las más comunes en el diagnóstico de enfermedades virales en camaronicultura (Lightner y Redman, 1998), debido a su gran sensibilidad y especificidad. Características que se sustentan en la elaboración de los cebadores, en su caso, de las sondas que se estén utilizando (Chang *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1996; Durand, 1997).

Con base en la información existente y la importancia que representan la presencia y frecuencia de aparición de los virus que afectan a los cultivos de camarón en diferentes zonas geográficas del mundo, el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia y la prevalencia de los virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoiética (IHHNV), del síndrome de Taura (TSV), y del síndrome de la cabeza amarilla (YHV) en granjas camaronícolas de la región norte de Nayarit y del sur y centro de Sinaloa, por medio de las técnicas moleculares de la PCR, la RT-PC, el juego comercial de reactivos *WSSV Dual Aqua Vir IHHNV* (DAV) y la hibridación *dot-blot*.