UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

# ¨Estudio de la necrosis muscular en el camarón blanco *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* cultivado en Ecuador¨

**Tesis de Grado**

**Previo a la obtención del título de:**

**BIÓLOGO MARINO**

**Presentada por:**

**Vicente Javier Tomalá Bazán**

**La Libertad – Ecuador**

**2010**

UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

# "ESTUDIO DE LA NECROSIS MUSCULAR EN EL CAMARÓN BLANCO *Penaeus* (*Litopenaeus) vannamei* CULTIVADO EN ECUADOR"

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

VICENTE JAVIER TOMALÁ BAZÁN

LA LIBERTAD – ECUADOR

2010

I

I

# DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad de los hechos, ideas y doctrinas expuestas en esta tesis me corresponden exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma le corresponde al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL).

---

Vicente Javier Tomalá Bazán

C.I.: 091971558-1

# DEDICATORIA

Dedico esta Tesis a Dios, a quien le debo todo lo que soy y lo que pueda llegar a ser.

Y en especial a mi querida madre, por darme su amor, paciencia, compañía y por siempre impulsar el sentido del valor y el coraje de enfrentarme a muchos retos en mi vida cotidiana.

A mi familia.

A mis verdaderos amigos, porque con su ánimo me han ayudado a seguir adelante.

*A ella……que es mi estrella que cubre mis sueños …….*

*Dedicada para mi Madre……..*

# AGRADECIMIENTO

A Dios por guiar mi vida.

A mi madre Luisa Bazán, por su amor y apoyo incondicional para motivar cada uno de mis logros.

A mi hermana Jeanine y mis sobrinos Zully y Jean Carlos, gracias por siempre estar conmigo.

A Johana y Mariela, quienes en tiempos diferentes fueron mi razón permanente de inspiración y de lucha. Te amo "*chiquita* "*.*

A la UPSE y sus autoridades, en particular al ex-Rector Ab. Xavier Tomalá M., al Decano de la Facultad Ciencias del Mar Ing. Gonzalo Tamayo y al Director de Escuela de Biología Marina Blgo. Richard Duque.

Al CENAIM-ESPOL por financiar esta investigación, haciendo posible su ejecución. En particular, al Dr. Samuel Stern, ex-Director General; al Coordinador Científico, Dr. Stanislaus Sonnenholzner; a la Dra. María Herminia Cornejo, Coordinador de Asuntos Académicos y al Jefe de Operaciones, Ing. Andrés Pedrazzoli.

A Dr. José Melena, por aceptar ser mi Director de Tesis, gran amigo y por apoyar mi trabajo y siempre estar dispuesto a ayudarme.

A M. Sc. Janeth Galarza, Tutor de tesis, por su invaluable colaboración al supervisar esta investigación.

Al Blgo. Fabrizio Echeverría "*el pibe*" por su acertada, oportuna y necesaria colaboración en este estudio y la Tnlga Fanny Panchana "*Fanny lu"*, por su ayuda y respaldo en los análisis histopatológicos de mi tesis, mil gracias.

A Dra. Jenny Rodríguez y la Ocean. Irma Betancourt, por sus colaboraciones técnicas en los protocolos utilizados durante esta investigación.

A Dr. Yasuji Amano, investigador del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) del Instituto Nacional de Higiene (INH) Leopoldo Izquieta Pérez (Guayaquil), por su gentil colaboración con el análisis de muestras de este estudio.

A Dr. Sahul Hameed, científico e investigador del Departamento de Zoología del C. Abdul Hakeem College, Melvisharam 632-509, Vellore Dist., Tamil Nadu, India, por su colaboración en este estudio con información relevante respecto a la necrosis muscular infecciosa en camarón.

A Ing. Patricio Moncayo y al Blgo. Santiago Moscoso, por su invalorable colaboración durante el desarrollo de esta investigación.

A Dra. Bonny Bayot, M. Sc. Mariuxi Sotomayor y César Gonzabay por siempre estar dispuestos ayudarme durante todo el transcurso de mi tesis.

A todo el personal del CENAIM, porque su ayuda ha sido importante durante el transcurso de mi trabajo de tesis.

Mil gracias a todos y por todo, mi gratitud por siempre.

# TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

| | |
|---|---|
| Ing. Gonzalo Tamayo C. | Blgo. Richard Duque M. |
| Decano de Facultad Ciencias del Mar | Director de Escuela de Biología Marina |
| Dr. José Melena C. | M. Sc. Janeth Galarza |
| Director de Tesis | Tutor de Tesis |
| | Ab. Milton Zambrano C. |
| Profesor de Área | Secretario General-Procurador |

# ÍNDICE GENERAL

**Pag.**

**ÍNDICE GENERAL ……..……. IX**

**ÍNDICE DE GRÁFICOS …….. XIII**

**ÍNDICE DE TABLAS ……... XVIII**

**ÍNDICE DE ANEXOS …….. XIX**

**GLOSARIO ……..……..... XX**

**ABREVIATURAS ……..... XXVII**

**RESUMEN ……..…….…….... XXX**

**1. INTRODUCCIÓN ……..…… 1**

**2. OBJETIVOS ..... 4**

**2.1. OBJETIVO GENERAL ……..……... 4**

**2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS……...…….…….... 4**

**3. HIPÓTESIS ……..……..... 5**

**4. ANTECEDENTES ..... 6**

4.1. **LA PRODUCCIÓN CAMARONERA ECUATORIANA ..……..... 6**

4.2. **Impactos negativos sobre la producción camaronera ecuatoriana .. 6**

4.2.1. **Síndrome de la Gaviota (SG) .....……. 6**

4.2.2. **Síndrome de Taura (TS) ..…….……... 6**

4.2.3. **El Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) …….. 7**

4.2.4. **El Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) …..…… 8**

4.2.4.1. Generalidades del WSSV **……..…….. 9**

4.2.4.2. Mecanismos de Transmisión del WSSV ……..…….. **10**

4.2.4.3. Técnicas de Detección del WSSV ……..…….. **10**

4.3. **Necrosis Muscular en la Industria Acuícola** ..…….……..... **11**

4.3.1. ***Macrobrachium rosenbergii*** **nodavirus (*Mr*NV)** ……..... **13**

4.3.1.1. Hospederos ……..... **14**

4.2.1.2. Mecanismos de transmisión …….. **14**

4.2.1.3. Métodos de Diagnóstico ……..…….…. **14**

4.3.2. **El Virus de Mionecrosis Infecciosa (IMNV)** ……..…. **15**

4.3.2.1. Hospederos ……..…..... **16**

4.3.2.2. Mecanismos de Transmisión ……..... **16**

4.3.2.3. Métodos de Diagnóstico ……..…..…. **16**

4.3.3. **El *Penaeus vannamei* nodavirus (*Pv*NV)** ……..... **16**

4.3.3.1. Hospederos ……..…..... **17**

4.3.3.2. Mecanismos de Transmisión ……..…….. **17**

4.3.3.3. Métodos de Diagnóstico ……..…..... **17**

**5. MATERIALES Y MÉTODOS** ..... **18**

5.1. Material Biológico (población stock) ……..……..... **18**

5.2. Recolección de tejidos de camarones sospechosos (Inóculo Original**)** ……..... **18**

5.3. Confirmación de signos clínicos en IO ……..... **18**

5.4. Protocolo de aislamiento del agente causal de la necrosis muscular por ultracentrifugación ……..……..…. **19**

5.5. Protocolo para la elaboración de papilla (camarones cortados en pedazos) con necrosis muscular para los desafíos *per os* (Inóculo

Experimental) **…… 20**

5.6. **Bioensayos ……. 20**

5.6.1. **Bioensayo 1 (reproducción de la enfermedad) …… 20**

5.6.1.1. Análisis Histopatológico **…… 22**

5.6.2. **Bioensayo 2 (confirmación de la reproducción de la enfermedad) …… 24**

5.6.2.1. Protocolo para la Detección de agente etiológico de necrosis muscular en camarón marino mediante Hibridación *in situ* (HIS) **…… 27**

5.6.2.2. Extracción de ARN **…… 28**

5.6.2.2.1. Protocolo del Kit IQ2000™ para detección de IMNV **…… 29**

5.6.2.3. Protocolo para Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) **…… 30**

5.6.3. **Bioensayo 3 (Aplicación de estrés ambiental e inóculo bacteriano) …… 30**

5.6.3.1. Aislamiento y caracterización bioquímica de bacterias (Inóculo bacteriano) **…… 30**

5.6.3.2. Preparación de Inóculo bacteriano e inyección **…… 30**

5.6.3.3. Bioensayo **…… 31**

**6. RESULTADOS…… 34**

6.1. Análisis histopatológico del material biológico **…… 34**

6.2. Observación macroscópica de camarones sospechosos **…… 34**

6.3. Análisis histopatológico de tejidos de camarones sospechosos (IO) **…. 35**

6.4. Análisis histopatológico de Inóculo Experimental (IE) **…… 37**

6.5. Bioensayo 1 (reproducción de la enfermedad) **…….....…. 38**

6.5.1. **Histología …… 38**

6.6. Bioensayo 2 (confirmación) **…….. 39**

6.6.1. **Histología .....…….....……...…… 40**

6.6.2. **PCR por Transcripción Reversa (RT-PCR) ……..…… 42**

6.6.3. **Hibridación *In Situ* (HIS) ……. 42**

6.6.4. **Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) ……..… 45**

6.7. Bioensayo 3 (Aplicación de estrés ambiental e inóculo bacteriano) **….. 46**

6.7.1. **Histología .....…….....……...…… 47**

**DISCUSIÓN …… 49**

**CONCLUSIONES …….. 55**

**RECOMENDACIONES ……. 56**

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ……. 57**

**ANEXOS ……...…….. 69**

# ÍNDICE DE GRÁFICOS

**Pag.**


Figura 1. Camarón gigante de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*. Se observan signos clínicos externos de la enfermedad de la cola blanca (WTD) **..... 13**

Figura 2. Camarones juveniles *P. vannamei*. Se observan signos clínicos externos de la enfermedad de la mionecrosis infecciosa (IMNV) reportada al noreste de Brasil. Tomado del Atlas de Histopatología de *P. vannamei*. Volumen I (Panchana, 2009) **..... 15**

Figura 3. Ultracentrífuga "Sorvall modelo Discovery 90SE". Se observa que el material proveniente del IO es colocado en la ultracentrífuga para realizar el aislamiento del eventual agente causal de la necrosis muscular **..... 19**

Figura 4. Sala experimental con bandejas de fibra de vidrio. Contienen acuarios con camarones para la siembra y pruebas tipo desafío de este estudio **..... 21**

Figura 5. Esquema del bioensayo 1 (reproducir la enfermedad) **… 22**

Figura 6. Micrótomo "Shandon". Se observa el corte de un camarón en bloque de parafina **..... 24**

Figura 7. Sala experimental con bandejas de fibra de vidrio. Contienen acuarios con camarones para la siembra y pruebas tipo desafío de este estudio **…….. 25**

Figura 8. Esquema del bioensayo 2 (confirmación de la reproducción de la enfermedad) **…….. 26**

Figura 9. Termociclador “Eppendorf“. Se observan las muestras de camarones sospechosos que fueron amplificadas por RT-PCR para la detección de IMNV (Kit IQ2000™) **……. 29**

Figura 10. Sala experimental con bandejas de fibra de vidrio. Contienen carameleras con camarones para la siembra y prueba tipo desafío (bacteriano) de este estudio **…..…… 32**

Figura 11. Esquema del bioensayo 3 (estrés ambiental e inóculo bacteriano) **…….…... 33**

Figura 12. Secciones longitudinales de tejido muscular de camarones *P. vannamei.* A-B.- Observación de estructuras sarcoméricas normales (ver flechas). Sección de parafina 4 µm de grosor. Tinción de H&E. Objetivo de 10X **…….. 34**

Figura 13. Camarones *P. vannamei* del IO. A-D.- Se observa opacidad muscular en diferentes segmentos intermedios y distales de la cola (flecha), la cual es un signo clínico externo que está asociado con necrosis muscular **…….. 35**

Figura 14. Secciones longitudinales de tejido muscular de *P. vannamei* del IO. A.- Necrosis coagulativa con grado de

lesión medio. Objetivo de 4X. B.- Infiltraciones hemocíticas con grado de lesión leve. Objetivo de 4X. C-D.-Extensas infiltraciones hemocíticas (flecha) y pérdida de la estructura sarcomérica normal. Sección de parafina 4 µm de grosor. Tinción H&E. Objetivo de 10X **..... 36**

Figura 15. Grado de lesión que muestran los camarones *P. vannamei* del IE respecto a los dos signos clínicos asociados a necrosis muscular infecciosa: Escala 1= Muy Leve; 2= Leve; 3= Medio; 4= Severo **..... 38**

Figura 16. Grado de lesión que presentaron los camarones *P. vannamei* del bioensayo 1 respecto a los dos signos clínicos asociados a necrosis muscular infecciosa (necrosis muscular e infiltración hemocítica) **..... 39**

Figura 17. Secciones longitudinales de tejido muscular de camarones *P. vannamei*. A-D.- Se observan grado de lesión severo de necrosis coagulativa y extensas infiltraciones hemocíticas (flecha). Además, de la pérdida de la estructura sarcomérica normal. Sección de parafina 4 µm de grosor. Tinción H&E. Objetivo de 10X **..... 40**

Figura 18. Gel de electroforesis presenta los productos amplificados por RT-PCR para la detección de IMNV (Kit IQ200™). Pozos 1-6: camarones negativos con un amplicón de 680 pb. (Control interno). Control positivo (+) corresponde a ARN de camarón infectado con IMNV, el cual presenta dos

amplicones de 284 y 476 pb, respectivamente. El marcador de peso molecular (M) es de 1 Kb (Invitrogen ™) **…….. 42**

Figura 19. Hibridación *in situ* (HIS) en secciones longitudinales de tejidos de camarones *P. vannamei*. A.- Señal positiva en músculo del control positivo de IMNV. Objetivo de 10X. B-C.- Tejidos musculares de camarones desafiados localmente muestran señal positiva para IMNV. Objetivo de 10X. D.- Tejido conectivo del cefalotórax muestra señal positiva de IMNV en camarones desafiados localmente. Objetivo de 10X **…….. 43**

Figura 20. Esquema del número total de muestras analizadas por HIS Los códigos marcados con negrillas corresponden a los camarones analizados 2 veces consecutivas por el mismo método **…….. 44**

Figura 21. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Se observa tejido muscular necrosado con presencia de viriones de WSSV (ver flecha), vistos transversalmente con tinción negativa **…….. 45**

Figura 22. Grado de lesión que presentaron los camarones *P. vannamei* del bioensayo 3. En el T2 (bacterias + baja temperatura 17 °C), 2/3 camarones mostraron los dos signos clínicos de necrosis muscular infecciosa. T1= bacterias + alta temperatura (30 °C), T2= bacterias + baja temperatura (17 °C), T3= bacterias + baja concentración de

oxígeno disuelto (1 mg/L), T4= bacterias + alta temperatura (30 °C) + baja concentración de oxígeno disuelto (1 mg/L), T5= bacterias + baja temperatura (17 °C ) + baja concentración de oxígeno disuelto (1 mg/L), T6= bacterias **…… 47**

Figura 23. Secciones longitudinales de tejido muscular de camarones *P. vannamei* del T2 (bacterias + baja temperatura (17 °C). A.- Presencia de nódulos hemocíticos (ver flechas), con pérdida de la estructura sarcomérica normal. Objetivo de 10X. B.- Presencia de nódulos hemocíticos con melanización interior. Objetivo de 10X. C.- Pérdida de la estructura sarcomérica normal con grandes infiltraciones y nodulaciones hemocíticas. Objetivo de 4X. D.- Presencia de melanización, nodulación e infiltraciones hemocíticas. Sección de parafina 4 µm de grosor. Tinción H&E. Objetivo de 4X **…… 48**

# ÍNDICE DE TABLAS

**Pag.**


Tabla 1. Niveles histopatológicos que cuantifican los grados de lesión que muestran los camarones *P. vannamei* en cada una de las pruebas tipo desafío **……..……..... 37**

Tabla 2. Grado de lesión que mostraron los camarones *P. vannamei* del bioensayo 2 expuestos a prueba de desafío "*per os*" **41**

Tabla 3. Tipos de análisis para la detección de IMNV, que se realizaron a los camarones que presentaron signos clínicos de necrosis muscular infecciosa (necrosis e Infiltración hemocítica) **..... 46**

# ÍNDICE DE ANEXOS

**Pag.**


Anexo 1. Protocolo para reducir la concentración de oxígeno disuelto **..... 70**

Anexo 2. Protocolo para mantenimiento de camarones juveniles *P. vannamei* (población stock) para el estudio de la necrosis muscular en Ecuador **..... 71**

Anexo 3. Hibridación *in situ* en camarones juveniles *P. vannamei* desafiados localmente **..... 72**

# GLOSARIO

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico: Ácido nucleico compuesto de dos cadenas nucleotídicas que se disponen alrededor de un eje central formando una doble hélice, capaz de autorreplicarse y codificar la síntesis de ARN. La molécula bicatenaria está formada por dos cadenas antiparalelas y complementarias entre sí. Es el soporte físico de la herencia en casi todas las especies. Los nucleótidos están constituidos por azúcar (desoxirribosa) y las bases nitrogenadas: adenina, timina, citosina y guanina.

**ARN:** Ácido Ribonucleico: Macromolécula de una sola cadena formada por monómeros, los ribonucleótidos, que contienen un azúcar de cinco átomos de carbono, ribosa, ácido fosfórico y bases nitrogenadas: citosina, guanina, adenina y uracilo.

La estructura primaria se debe a un encadenamiento 3-5 de los ribonucleótidos. Se cree que la estructura secundaria presenta segmentos en parte arrollados en hélice y otros segmentos totalmente lineales. La estructura terciaria obedecería a una cierta orientación de las zonas helicoidales.

**Antígeno** (del griego anti = contra; genos = origen): Moléculas, generalmente extrañas al organismo receptor, que inician la producción de anticuerpos, generalmente son proteínas o combinaciones de proteínas con polisacáridos, presentes en la superficie de un microorganismo (patógeno o parásito).

**Bacterias:** Micro-organismos unicelulares con núcleo desprovisto de membrana, con cromosoma único, generalmente con una pared exterior y capaces de multiplicarse por división celular. Microorganismo unicelular procariota. Ocupan todos los hábitats conocidos, desde los hielos de la Antártica hasta las profundidades de los océanos.

**Especificidad:** Propiedad de los participantes en la respuesta inmune (antígeno, anticuerpo o células sensibilizadas) de combinarse en forma selectiva con el reactante correspondiente. En un sentido más amplio implica un reconocimiento molecular.

**Exoesqueleto:** Estructura que se encuentra por fuera del cuerpo de los organismos, que les sirve como protección y sostén, tal como en el caso de los invertebrados.

**Hibridación:** Característica que permite la unión entre elementos que se pueden complementar. A nivel molecular, la hibridación puede ser utilizado para buscar y encontrar complementos entre secuencias. De utilidad en diagnóstico.

**Hospedero:** Organismo que representa la fuente de alimento, abrigo u otras ventajas para un organismo de otra especie. El término refleja claramente la interacción con patógenos (hospedero – patógeno).

**Infección:** Capacidad de un agente extraño microscópico (microbio, virus, hongo) de proliferar dentro o sobre un hospedero.

**Inmunidad:** Capacidad de un hospedero de resistir, protegerse o inmunizarse frente a agentes infecciosos. La inmunidad se debe a sistemas defensivos propios de los organismos: Barrera de la piel, tubos digestivos asépticos y el específico sistema inmunológico basado en células especializadas y la actividad química de los anticuerpos. Tal resistencia puede ser innata o adquirida.

**Inmunología:** Rama de la Biología que estudia los fenómenos inherentes a la respuesta inmune y, de una forma general, a todos los procesos que tienen relación con la respuesta de defensa del hospedero.

**Inmunológico:** Relativo a los mecanismos que los hospederos poseen para defenderse de las enfermedades infecciosas.

***In situ*:** Término en latín que significa en el lugar. Acciones que se llevan adelante en el lugar de interés.

**Invertebrado:** Organismo sin huesos y sin columna vertebral. Este grupo se extiende desde los protozoos hasta los insectos, crustáceos, gusanos, caracoles y ostras.

***In vitro:*** Locución latina que se aplica a todo fenómeno observado fuera del organismo y en particular, en laboratorio.

**Micra (µm):** Unidad de longitud para seres microscópicos correspondiente a la milésima parte del milímetro.

**Necrosis:** Muerte de tejido. La necrosis muscular es un trastorno caracterizado por: dañar tejido muscular estriado del camarón, presentar opacidad focal del tejido muscular (áreas blanquecinas) y en grado severo puede ocasionar mortalidades.

**Órgano Linfoide (OL):** Filtro con capacidad de retener en la hemolinfa partículas virales circulantes, conduciendo a la formación de esferoides.

**Patógeno:** Agente que genera una enfermedad.

**Patológico:** Término utilizado para los residuos provenientes de servicios de salud, veterinarias o laboratorios de análisis clínicos, compuestos de guantes, gasas, algodones, agujas hipodérmicas, restos de intervenciones quirúrgicas.

**Patogenicidad:** Capacidad de un agente patógeno de multiplicarse en el organismo y desarrollar la enfermedad.

**pH:** Valor numérico que describe la intensidad de ácido o base (alcalina) de una solución. Técnicamente, pH es un logaritmo reciproco (negativo) de la concentración de iones en el hidrógeno (actividad hidrógeno ión) en moles por litro.

**PCR:** (PCR, de las iniciales en inglés Polymerase Chain Reaction): Método de amplificación de una secuencia de bases del ADN, ideado por Kary Mullis a mediados de la década de 1980, usando una polimerasa termoestable y dos iniciadores (*primers*) de 10 - 25 bases de largo de la secuencia a ser amplificada, uno complementario a la secuencia 5´ - 3´ y otro a la secuencia 3´ - 5´. En razón que las nuevas cadenas de ADN sintetizadas pueden subsecuentemente servir de moldes adicionales para la misma secuencia de cebadores, sucesivos “ciclos” de anillado de cebadores, alargamiento de la cadena y disociación del ADN bicatenario formado, producen rápidamente grandes cantidades de la secuencia original (amplificación). La PCR puede utilizarse para detectar una secuencia definida en una muestra de ADN.

**Picnosis:** Condensación de la cromatina que acaba por formar una masa homogénea e intensamente coloreable. A menudo constituye un signo de alteración del núcleo celular.

**Población:** Número de individuos (plantas y animales) con características similares, que viven en un área dada y por un tiempo determinado.

**Prueba de Desafío:** Bioensayo en el que bajo dosis y períodos determinados, un hospedero es expuesto a un agente infeccioso, el cual puede ser bacteriano, viral, fúngico, etc.

**Salinidad:** Es una medida de la cantidad de sales minerales en el agua o en el suelo. Se representa en partes por mil (parts per thousand).

**Sarcómero:** Fragmento de una miofibrilla limitada por dos estrías.

**Transmisión Horizontal:** A través del agua, es la que se produce entre dos segmentos de una población (ejemplos, canibalismo, cohabitación y las secreciones).

**Transmisión Vertical:** Es la transmisión producida por los individuos de una generación a su descendencia.

**Virión:** Unidad estructural de los virus. Consta fundamentalmente de dos estructuras imprescindibles: un ácido nucleico (ADN ó ARN) y una envoltura proteica (cápside). A estas estructuras básicas se añade en algunos casos una envoltura lipídica y/o espículas de glucoproteína. Representa su estado extracelular, donde se muestra inerte.

**Virus (del latín virus = veneno):** Agente infeccioso de naturaleza obligatoriamente intracelular para sintetizar su material genético, ultramicroscópico y ultrafiltrable. Consta de un ácido nucleico (ADN ó ARN) y un recubrimiento proteico. Entidad no celular de muy pequeño tamaño (medido en nanómetros).

**Virulencia:** Potencial de un agente para producir cuadros graves que derivan en muerte.

# ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| APT | Ácido fosfotungstico |
| °C | Grados celsius |
| Ca ++ | ión calcio |
| CENAIM | Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas |
| CNA | Cámara Nacional de Acuicultura |
| d | días |
| FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| g | gramo |
| h | Horas |
| HIS | Hibridación *in situ* |
| IHHNV | Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (por sus siglas en inglés) |
| IMNV | Virus de Mionecrosis Infecciosa (por sus siglas en inglés) |
| INH | Instituto Nacional de Higiene |
| IE | Inóculo Experimental |
| IO | Inóculo Original |
| Kb | Kilo base |
| KDa | Kilo Daltones |
| Km | Kilómetros |
| Kpb | Kilo par de base |

| | |
|---|---|
| L | litros |
| MET | Microscopía Electrónica de Transmisión |
| mg | miligramo |
| min | minutos |
| mL | mililitro |
| *Mr*NV | *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus |
| NBT | Nitro blue tetrazolium |
| nm | nanómetro |
| $O_2^-$ | Anión superóxido |
| OIE | Oficina Internacional de Epizooties |
| OL | Órgano Linfoide |
| PBS | Tampón fosfato salino sin $Ca^{++}$ y $Mg^{++}$ |
| PBS 1X | Tampón fosfato salino con $Ca^{++}$ y $Mg^{++}$, dilución 1/10 |
| PCR | Reacción de Polimerización en Cadena (por sus siglas en inglés) |
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| p.i. | Post-infección |
| ppt | partes por mil (part per thousand) |
| *Pv*NV | *Penaeus vannamei* nodavirus (por sus siglas en inglés) |
| RDS | Síndrome de la Deformidad y Enanismo (por sus siglas en inglés) |
| Real-time PCR | PCR en Tiempo Real (por sus siglas en inglés) |
| rpm | revoluciones por minuto |
| RT-PCR | Reacción de Polimerización en Cadena por Transcripción Reversa (por sus siglas en inglés) |
| s | segundos |

| | |
|---|---|
| SG | Síndrome de la Gaviota |
| TS | Síndrome de Taura (por sus siglas en inglés) |
| TSV | Virus del Síndrome de Taura (por sus siglas en inglés) |
| UAZ | Universidad de Arizona |
| µg | microgramo |
| µL | microlitro |
| µm | micras |
| U. V. | ultravioleta |
| µW | microwatts |
| WSSV | Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (por sus siglas en inglés) |
| WTD | Enfermedad de la Cola Blanca (por sus siglas en inglés) |
| v/v | volumen/volumen |

# RESUMEN

El objetivo de esta investigación ha sido estudiar la necrosis muscular en el camarón blanco *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* cultivado en Ecuador, mediante técnicas de diagnóstico en laboratorio y bioensayos, para determinar su etiología y el desarrollo de la enfermedad.

La hipótesis de trabajo propuso que la necrosis muscular observada en el cultivo de camarón blanco *P. vannamei* en Ecuador, ha sido causada por un agente infeccioso.

Esta investigación constó de 3 bioensayos tipo prueba de desafío. En el primero se observó, que los camarones desafiados con Inóculo Experimental (IE) vía '*per os*' mostraron los dos signos clínicos típicos de una necrosis muscular infecciosa. Esto indica que el estudio ha permitido obtener la reproducción de la enfermedad (necrosis muscular), bajo condiciones experimentales en camarones cultivados localmente. Tales resultados confirman, en base a la reproducibilidad de la enfermedad, que la necrosis muscular observada en el cultivo de camarón *P. vannamei* en Ecuador es de origen infeccioso.

Complementariamente, en el segundo bioensayo se realizó el estudio de determinación del agente causal de la necrosis muscular descrita en Ecuador, mediante la aplicación de 4 técnicas de laboratorio: Histología, Reacción de Polimerización en Cadena por Transcripción Reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés), Hibridación *in situ* (HIS) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Los resultados del análisis histopatológico post-desafío mostraron que

las lesiones observadas a nivel de tejido muscular en los camarones desafiados han sido muy similares a las causadas por el Virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV, por sus siglas en inglés).

Por su parte, los resultados obtenidos por HIS en las muestras locales de camarones con necrosis muscular evidenciaron precipitados de color azul sobre el tejido examinado, sugiriendo que estas señales corresponden a casos positivos para IMNV.

Finalmente, se realizó un tercer bioensayo tipo prueba de desafío con un inóculo conformado por 6 aislados bacterianos (*Vibrio pelagicus*, *V. splendidus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. fischeri*), al que se incorporaron dos fuentes de estrés: variación de temperatura del agua de cultivo ($\Delta$T: ± 6 ºC) y reducción de la concentración de oxígeno disuelto (1 mg/L). Los resultados obtenidos indicaron que los camarones desafiados con inóculo bacteriano (1 x $10^4$ UFC/camarón) vía 'inyección' y sometidos a baja temperatura (T = 17ºC), evidenciaron signos clínicos característicos de necrosis muscular infecciosa. Análisis comprobatorios por HIS para IMNV resultaron negativos. Estos resultados señalan preliminarmente que bacterias del género *Vibrio* junto al estrés por baja temperatura también estarían involucradas en la expresión de la necrosis muscular en *P. vannamei* bajo condiciones experimentales. La ausencia de señal positiva por HIS para IMNV en estas muestras confirmó que existen otros agentes patógenos (de naturaleza bacteriana) involucrados en el desarrollo de esta enfermedad.