

DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL SÍNDROME DEL TAURA EN *Litopenaeus schmitti* SILVESTRES DEL LAGO DE MARACAIBO Y LA LAGUNA DE UNARE, VENEZUELA

Molecular Detection of the Taura Syndrome Virus in Wild *Litopenaeus schmitti* from Maracaibo Lake and Unare Lagoon, Venezuela

Carlos Fajardo¹, Hectorina Rodulfo¹, Marcos De Donato^{1*}, Ramón Manrique², Mélida Boada³ y Nieves Aguado⁴

¹ Lab. Genética Molecular, Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Universidad de Oriente, Cumaná.

² Aquamarina de la Costa, Unare, estado Anzoátegui. ³ Lab. Patología de Organismos Acuáticos, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. ⁴ Lab. de Patobiología Acuática, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. * E-mail: marcosdedonato@yahoo.com.

RESUMEN

En Venezuela se detectó la presencia del Virus del Síndrome del Taura (VST) en camarónicas del Lago de Maracaibo, estado Zulia en 2004. Cerca del 90% de la producción total se vio afectada, y a pesar que la situación parece haber sido estabilizada es necesario conocer si el virus se mantiene en especies silvestres de las áreas de cultivo. Así, se planteó aplicar técnicas moleculares para la detección del VST en camarones silvestres del Lago de Maracaibo y de la Laguna de Unare. Para esto, se extrajo el ARN a 600 muestras de cefalotórax de camarones (300 por localidad), colectados por pesca comercial, utilizándose la reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR) para el diagnóstico. Los ejemplares no presentaron signos clínicos de infección por VST, característicos como ausencia de lesiones necróticas del exoesqueleto, expansión de los cromatóforos rojos y todos tuvieron la dureza normal del exoesqueleto. La detección molecular usando RT-PCR de ronda simple fue negativa para todas las muestras analizadas, sin embargo, a través del procedimiento de ronda doble se detectaron 56 individuos infectados (18,7% de prevalencia) en ejemplares de *L. schmitti* del Lago de Maracaibo, mientras que no se detectó ningún ejemplar infectado de la laguna de Unare. Este estudio representa el primer reporte de infecciones asintomáticas del VST en poblaciones silvestres de *L. schmitti* en Venezuela.

Palabras clave: VST, *L. schmitti*, RT-PCR, PCR anidada.

ABSTRACT

The Taura Syndrome Virus (TSV) was first reported in Venezuela in 2004, in Maracaibo Lake, Zulia State. Nearly 90% of the total production was affected, and although the situation seems to be "under control", it is important to determine the presence of TSV in natural populations of wild shrimp from areas of shrimp culture. Thus, molecular techniques were used to detect TSV in wild shrimp from Maracaibo Lake, and Unare Lagoon. For this, RNA was isolated from cephalothoraxes of 600 shrimp (300 from each locality), collected from commercial fisheries, using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for the diagnosis. The shrimp did not show clinical signs of TSV infection, such as necrotic lesions in the exoskeleton, expansion of red chromatophores, and all had normal hardening of the exoskeleton. The molecular detection using single round RT-PCR was negative for all the analyzed samples, but after a second round of amplification, 56 infected shrimp were detected from Maracaibo Lake (prevalence of 18.7%), while no infected shrimp were detected in Unare Lagoon. This is the first report of asymptomatic TSV infections in wild populations of *L. schmitti* in Venezuela.

Key words: TSV, *L. schmitti*, RT-PCR, nested RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

La camaronicultura en Venezuela inició en 1972 con ensayos de cría de las especies nativas de camarón blanco (*Lito-*

penaeus schmitti) y camarón rosado (*Farfantepenaeus brasiliensis*), pero arrancó con paso definitivo a partir de la década de 1980 con la importación de post-larvas de *L. vannamei* en el año 1986 [17]. El crecimiento de esta actividad en Venezuela ha sido sostenido, pasando de 7 granjas en 1995 que producían 3.088 toneladas al año, a 25 granjas en el 2003, produciendo 23.100 toneladas [27]. Como resultado del creciente desarrollo de la camaricultura en los últimos años, la producción de camarón cultivado representó el 67% de la producción acuícola total de Venezuela en el año 2002 y 1% de la producción mundial de este importante rubro [11].

Se han reportado para el continente americano, los virus del síndrome de Taura (VST), virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (VNHHI), virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB) y virus de la mionecrosis infecciosa (VMNI), como los que han causado las más grandes pérdidas, por lo que, desde el punto de vista epizootiológico, se consideran los más importantes en la región [18, 21, 23, 24]. Venezuela era el único país del continente en el que no se habían introducido estos virus (a excepción del VNHHI), pero en octubre del año 2004 se detectó el VST en las camaroneras del estado Zulia y de allí rápidamente se extendió a otras granjas del resto del país (ubicadas en el Edo. Falcón y en la isla de Coche). Como resultado, cerca del 90% de la producción total se vio afectada [33].

En América se han hallado poblaciones silvestres de camarones peneidos de las especies *L. vannamei* y *L. stylirostris* infectadas por los virus VNHHI y VSMB [21]. Por otro lado, estudios realizados en ejemplares extraídos de las pesquerías de Ecuador, de la costa pacífica de El Salvador y Honduras, sur de México y Estados Unidos de Norteamérica, tanto de aguas costeras como de mar adentro han sido positivos con VST [4, 20].

Entre los vectores y reservorios de partículas virales, especialmente del VST están las aves, insectos acuáticos y especies de camarones silvestres, dado que éstos entran de alguna forma en contacto con los animales infectados volviéndose portadores los primeros y reservorios del virus los últimos [32].

De acuerdo con Lightner y Redman [23], a raíz de las panzootias virales, la industria camaronera ha buscado formas de restaurar sus niveles de producción a aquellos alcanzados durante los años "pre-virus", donde la detección de estos agentes es clave. En el caso de peneidos, los métodos basados en la detección de patógenos usando anticuerpos (mono o policlonales) y, especialmente métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), proveen más exactitud y es más sencilla su estandarización para el diagnóstico de algunas enfermedades, principalmente en el caso de los virus [8, 21, 28, 29, 42].

En Venezuela, la industria camaronera se concentra en el estado Zulia, fundamentalmente a orillas del Lago de Maracaibo. Las granjas de esta zona fueron las primeras afectadas por el brote del síndrome del Taura [1], y aunque la situación parece controlada, es necesario conocer el estado sanitario de

las poblaciones silvestres, por las implicaciones ecológicas que conlleva y por el riesgo latente, dado que son reservorios del virus.

El VST ha sido clasificado de manera provisional dentro de la familia *Picornaviridae*, aunque en realidad se asemeja más a algunas especies (aún sin clasificar) de virus con ARN bicatenario que atacan a ciertos insectos. Su genoma consta de un ARN monocatenario de cadena positiva de 10.205 pares de bases [25]. Este virus es altamente infeccioso para el camarón blanco del Pacífico, *L. vannamei*, describiéndose infecciones naturales en esta especie y en el camarón azul del Pacífico *L. stylirostris*. Se ha logrado inducir infecciones experimentalmente en *L. setiferus*, *L. schmitti*, *F. aztecus* y *F. duorarum*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Penaeus monodon* y *P. japonicus*, aunque los estudios de resistencia realizados en laboratorio sugieren que estas dos últimas especies son resistentes a la enfermedad del síndrome de Taura. Los síntomas de esta enfermedad se pueden presentar desde el estadio post-larval (a partir de PL12, aproximadamente) así como también en el estadio juvenil y adulto, pero la mayoría de las epizootias que ocurren en las granjas camaronícolas afectan a las crías muy jóvenes [32].

En vista de la importancia que reviste el camarón como recurso generador de divisas y de empleo, este trabajo tuvo la finalidad de evaluar la presencia del VST en áreas adyacentes a granjas camaroneras: una en la que se detectó previamente la presencia del virus en el Lago de Maracaibo, y la otra, considerada libre del VST, en la Laguna de Unare ubicada en la región Nor-Oriental del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron 300 camarones silvestres durante el mes de octubre del 2005 en la localidad de Barranquitas, ubicada en la región central de la costa occidental del Lago de Maracaibo, municipio Rosario de Perijá (9° 58' LN; 72° 01' LO), estado Zulia, Venezuela. Adicionalmente, 300 camarones silvestres fueron colectados en junio del 2007 en la laguna de Unare, municipio Peñalver (10° 07' LN; 65° 20' LO), estado Anzoátegui (FIG. 1). El número de 300 fue el doble de lo sugerido por Lightner [19] para poblaciones grandes, ya que se esperaba que la prevalencia fuera muy baja, si estaba presente el virus.

Los camarones recolectados fueron colocados inmediatamente en hielo y transportados al laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Suzan Tai" de la Universidad de Oriente (IIBCAUDO), donde fueron congelados a -70°C para su posterior análisis. Una vez en el laboratorio, los camarones fueron identificados según Pérez-Farfante [37] y Pérez y Kensley [36], y se les determinó la masa húmeda con una balanza de 0,01 g de apreciación y la longitud total (Lt) con un vernier de 0,01 mm de apreciación. Todos los camarones recolectados en ambas regiones fueron identificados como pertenecien-

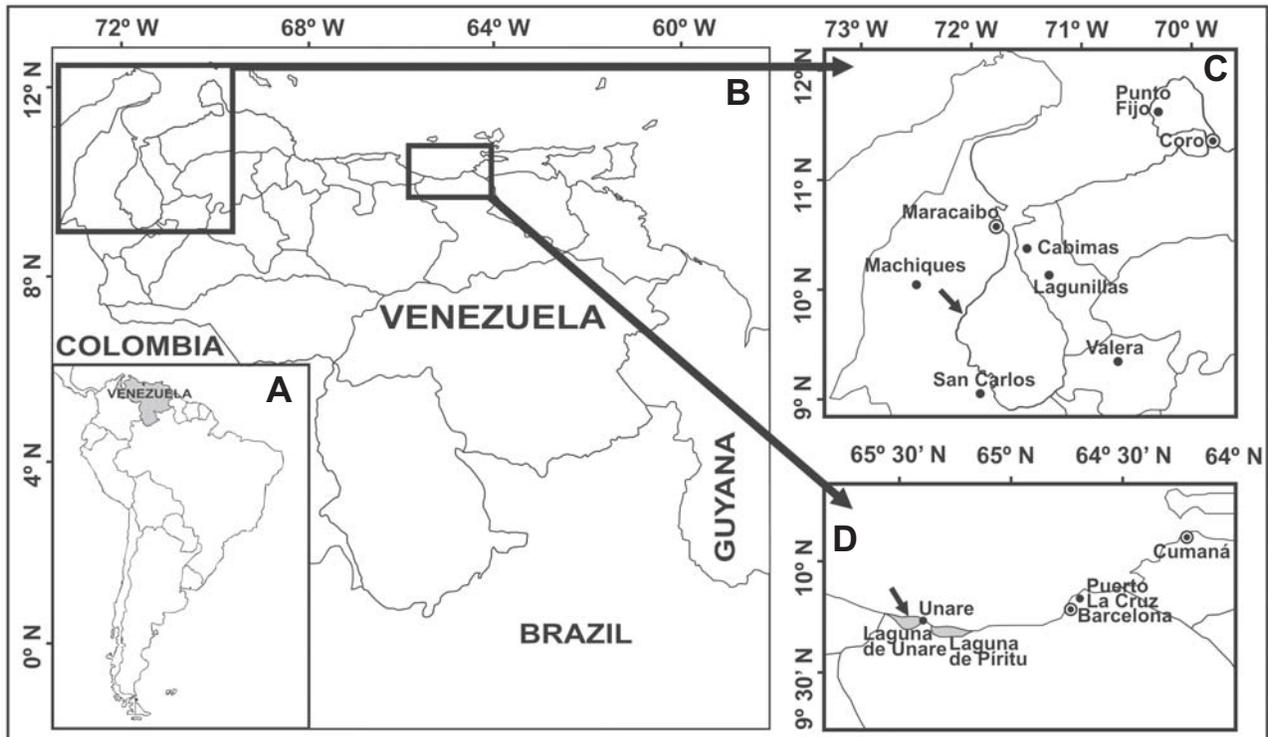


FIGURA 1. UBICACIÓN DE LAS ÁREAS DE ORIGEN DE LAS MUESTRAS. A) LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE VENEZUELA. B) LOCALIZACIÓN DE LAS ÁREAS DE MUESTREO EN VENEZUELA. C) UBICACIÓN DE BARRANQUITAS (FLECHA), REGIÓN CENTRAL DE LA COSTA OCCIDENTAL DEL LAGO DE MARACAIBO, MUNICIPIO ROSARIO DE PERIJÁ, ESTADO ZULIA. D) UBICACIÓN DE LA LAGUNA DE UNARE (FLECHA), MUNICIPIO PEÑALVER, ESTADO ANZOÁTEGUI/ LOCALIZATION OF THE AREAS WHERE THE SAMPLES WERE COLLECTED. A) GEOGRAPHICAL LOCATION OF VENEZUELA. B) LOCATION OF THE SAMPLING AREAS IN VENEZUELA. C) LOCATION OF BARRANQUITAS (ARROW), CENTRAL REGION OF THE WESTERN COAST OF MARACAIBO LAKE, ROSARIO DE PERIJA MUNICIPALITY, ZULIA STATE. D) LOCATION OF THE UNARE LAGOON (ARROW), PEÑALVER MUNICIPALITY, ANZOATEGUI STATE.

tes a la especie *Litopenaeus schmitti*, Bunkenroad 1936, según los caracteres morfológicos [36, 37]. Seguidamente, se homogeneizaron muestras de tejido de la región hepatopancreática del cefalotórax de cada organismo, ya que se ha reportado al órgano linfoide como el tejido donde mayor cantidad de partículas virales se han detectado [41] y este órgano se localiza en la superficie anterodorsal del hepatopáncreas [19]. De aquí se aisló el ARN, utilizando el Sistema de Aislamiento de ARN total RNAagents® de Promega, siguiendo las especificaciones del fabricante. En breve, a la muestra de tejido (aproximadamente 50 µL de volumen de muestra) se le agregó 300 µL de solución desnaturalizante fría y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Se homogeneizó la muestra con ayuda de un pistilo desechable, se mezcló por vortex por 20 s y se agregó 30 µL de acetato de sodio 2 M, mezclando por inversión. Se agregó 400 µL de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se agitó por 20 s en un vortex Maxi Mix. Se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 20.000 g por 5 min en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R. Se recogió la fase acuosa, teniendo cuidado de no remover la interfase ni la fase orgánica. El ARN se precipitó con 400 µL de isopropanol, incu-

bándose a -20°C por 15 min en un congelador. Se centrifugó a 20.000 g por 5 min, para eliminar el isopropanol y agregar 400 µL de etanol al 70%. Se centrifugó a 20.000 g por 5 min, para eliminar el etanol, dejándolo secar a temperatura ambiente para rehidratarlo en agua estéril libre de nucleasas.

La búsqueda del VST se realizó por amplificación de un fragmento específico del genoma viral a través de la reacción de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR) usando el sistema Access RT-PCR (Promega, Corp., Madison, WI, EUA), que permite realizar la reacción de transcripción reversa y la PCR en un solo tubo. Para la amplificación se utilizaron los oligonucleotidos provistos por el sistema ShrimPCaRe® Simplex (Diagxotics, Lawrenceville, NJ, EUA) que amplifican un fragmento no especificado de 231 pares de bases (pb). Además se utilizaron los oligonucleótidos TSV1F (CCAAAA-CACGTGTGAGGAG) y TSV1R (AAAACGTCGCGAGAGAGA-GA), diseñados en el laboratorio de Genética Molecular del IIBCAUDO, a partir de la secuencia del VST en el GenBank (Número de acceso AF277675), que amplifican un fragmento de 294 pb de la región intergénica y la secuencia que codifica para la proteína precursora de la cápside [40]. La especificidad

de la amplificación por estos oligonucleótidos ha sido previamente establecida por secuenciación de los fragmentos de 294 pares de bases.

Para la RT-PCR de ambos pares de oligonucleótidos se preparó un tubo que contenía 5 µL de solución amortiguadora de AMV/*Tfl*, 0,2 mmol/L de cada nucleótido trifosfato (dNTP), 0,5 µmol/L de cada iniciador, 1,5 mmol/L de sulfato de magnesio (MgSO₄), 2,5 U de AMV transcriptasa reversa y 2,5 U de *Tfl* ADN polimerasa (Promega Corp., Madison, WI, EUA), en un volumen final de 25 µL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Alemania), con la siguiente programación: un ciclo a 48°C por 45 min para la síntesis del ADNc (RT), un ciclo a 94°C por 2 min para la desnaturalización inicial y para la PCR 40 ciclos con un paso de 94°C por 30 s, 55°C por 45 s, 68°C por 2 min, un ciclo a 68°C por 7 min.

Para aumentar la sensibilidad de detección se aplicó una PCR anidada, en la que el producto resultante de la RT-PCR amplificada con los oligonucleótidos iniciadores TSV1F/ TSV1R, se emplearon como molde para una segunda amplificación con un tercer par de oligonucleótidos iniciadores diseñados por Nunan y col. [28], generando un amplicon de 231 pb, cuya secuencia estaba contenida en el fragmento amplificado por los mencionados oligonucleótidos. La segunda amplificación por la PCR se realizó en una solución de volumen final de 25 µL que contenía 5 µL de buffer de PCR 5X (Tris-HCl, 10 mmol/L, pH 9,0; 50 mmol/L KCl y 0,1% Triton X-100), 0,2 mmol/L de cada nucleótido trifosfato (dNTP), 0,2 µmol/L de cada iniciador, 1,5 mmol/L de cloruro de magnesio (MgCl₂), y 1,25 U Go-Taq polimerasa (Promega Corp., Madison, WI, EUA). Se utilizó el siguiente programa del termociclador: un ciclo a 94°C por 5 min, 35 ciclos con un paso de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s, y un ciclo a 72°C por 10 min. Se utilizó una muestra de camarón infectado por TSV como control positivo, obtenida del laboratorio de Patología en Acuicultura, Departamento de Ciencias Veterinarias y Microbiología, Universidad de Arizona, EUA, así como agua y muestras de camarones libres de patógenos específicos (SPF), procedentes de la compañía Shrimp Improvement Systems (SIS, Isla Morada, Florida, EUA), que resultaron previamente negativos por RT-PCR, como controles negativos, para garantizar la precisión del diagnóstico. Una vez finalizada la segunda ronda de amplificación, los productos amplificados fueron analizados a través de electroforesis en geles de agarosa al 2% que contenían bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0,5 µg/mL. La corrida electroforética se llevó a cabo en buffer TBE (90 mmol/L de Tris-HCl, pH 8,0; 90 mmol/L de ácido bórico, 2 mmol/L de EDTA) utilizando una cámara de electroforesis marca EC modelo 330 Midicell Primo (New York, EUA) y una fuente de poder marca EC modelo 3000P (New York, EUA). El ADN fue visualizado en un transiluminador ultravioleta marca UVP modelo High Performance (Upland, California, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los camarones *Litopenaeus schmitti*, identificados y colectados presentaron una longitud y masa total promedio de 97,4 ± 1,2 mm y 6,51 ± 0,27 g, respectivamente, para los camarones provenientes del Lago de Maracaibo, y de 101,6 ± 1,5 mm y 8,14 ± 0,35 g, respectivamente, para los camarones provenientes de la Laguna de Unare. Estas dimensiones corresponden a individuos adultos de 3-6 meses de edad [2].

Se obtuvo ARN de buena calidad a partir de las muestras de tejido utilizando el protocolo de RNAgents® de Promega de forma rápida y consistente, lo cual fue verificado por el rango de tamaño de los fragmentos de ARN y la cantidad relativa con respecto al patrón de ARN, provisto en el kit Access RT-PCR de Promega. Además, todas las muestras de ARN resultaron con una relación de densidad óptica medidas a longitudes de onda de 260/280 nm entre 1,8 y 2,0.

La detección molecular del VST usando la RT-PCR de ronda simple, con los iniciadores desarrollados por DiagXotics, resultó negativa para todas las muestras (FIG. 2A). De igual forma, la primera reacción de la RT-PCR de dos pasos o anidada realizada con los oligonucleótidos iniciadores diseñados en el Lab. de Genética Molecular del IIBCAUDO, también resultó negativa (FIG. 2B). La segunda reacción de la RT-PCR anidada mostró la amplificación de un fragmento de 231 pb en 56 de las 300 muestras del Lago de Maracaibo (FIG. 2C), resultando una prevalencia de 18,7% de infección por el TSV en esta población silvestre de *L. schmitti*. Todas las muestras provenientes de la Laguna de Unare resultaron negativas a la detección de VST ya que la amplificación por la RT-PCR de dos pasos no produjo fragmentos típicos del virus en ninguna de las muestras analizadas.

El camarón de cultivo, es particularmente susceptible a patógenos virales, y el principal signo de infección es la elevada mortalidad que genera en poco tiempo y cuya causa puede ser desconocida y/o difícil de detectar. Esta situación genera un severo impacto socio-económico negativo para el área cuya actividad productiva principal es el cultivo de camarones, una vez que el virus ha sido introducido [18]. Posteriormente, éstos llegan a infectar las poblaciones de camarones silvestres, manteniéndose como reservorios que constituyen focos de infección. Esta condición fue detectada en la población silvestre de *L. schmitti* muestreadas en el Lago de Maracaibo, mientras que la población de la misma especie en la Laguna de Unare resultó negativa, coincidiendo con la ausencia hasta el momento del VST en las camaronerías de esta región.

Un examen macroscópico cuidadoso del exoesqueleto de los camarones infectados, incluido los apéndices, reveló la ausencia de lesiones características causadas por la infección del VST. Tampoco se observó expansión de los cromatóforos rojos en el telson, además el exoesqueleto tuvo una dureza y consistencia normal. Ningún signo clínico causado por el VST fue detectado en esta evaluación. El promedio de talla y peso

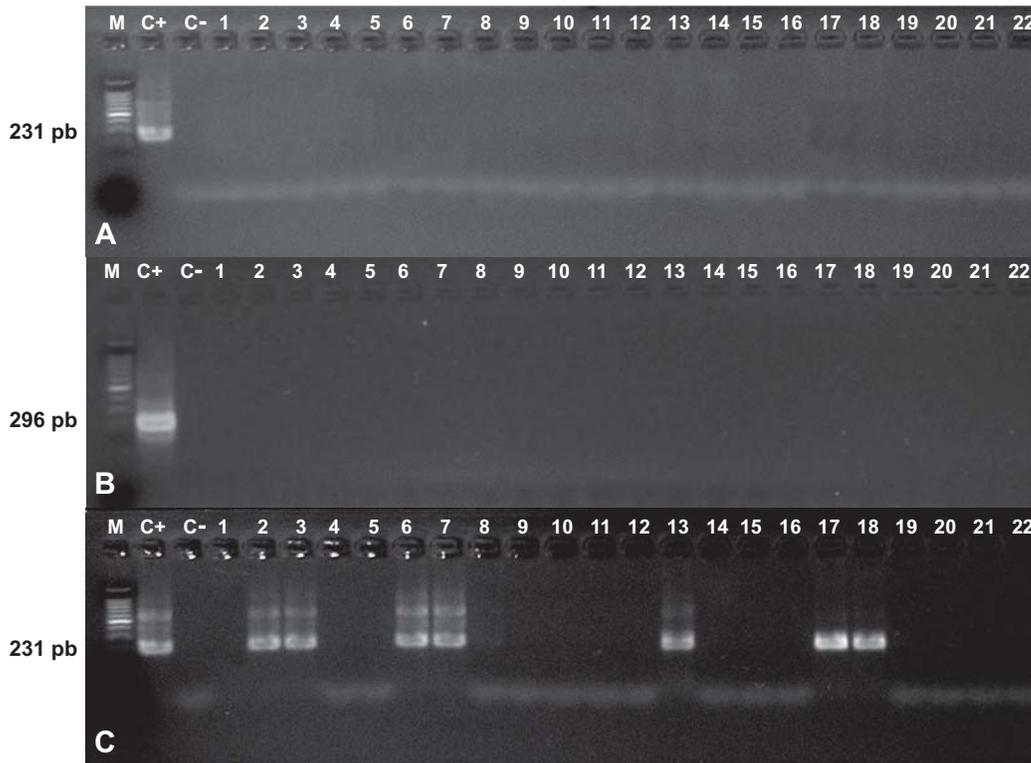


FIGURA 2. DETECCIÓN MOLECULAR DEL VST UTILIZANDO LOS INICIADORES DE DIAGXOTICS (A) Y PRIMERA RONDA (B) POR LA RT-PCR, ASÍ COMO CON LA SEGUNDA RONDA DE AMPLIFICACIÓN DE LA RT-PCR ANIDADA (C).

M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 100 PB (PROMEGA®), C+: CONTROL POSITIVO, C-: CONTROL NEGATIVO, 1-22: MUESTRAS DE CAMARONES. FRAGMENTOS AMPLIFICADOS FUERON CORRIDOS POR 45 MIN A 120 V EN UN GEL DE AGAROSA AL 2% CON BROMURO DE ETIDIO (0,5 µg/mL)/ MOLECULAR DIAGNOSIS OF TSV USING THE DIAGXOTICS PRIMERS (A) AND FIRST ROUND (B) BY RT-PCR, AS WELL AS THE SECOND ROUND OF AMPLIFICATION OF THE NESTED RT-PCR (C). M: MOLECULAR WEIGHT MARKER OF 100 BP (PROMEGA), C+: POSITIVE CONTROL, C-: NEGATIVE CONTROL, 1-22: SHRIMP SAMPLES. AMPLIFIED FRAGMENTS WERE RUN FOR 45 MIN AT 100 V IN A 2% AGAROSE GEL, CONTAINING ETHIDIUM BROMIDE (0,5 g/mL).

de los camarones positivos al virus fue de 96,3 mm y 6,3 g, respectivamente, los cuales no fueron significativamente diferente ($t = 0,89$; $P > 0,05$), mientras que, de los individuos que resultaron negativos, los valores encontrados fueron 97,9 mm y 6,6 g, respectivamente.

El análisis de los resultados obtenidos a través de las dos metodologías implementadas, indican una carga viral a un nivel muy bajo como para ser detectado, tanto por los oligonucleótidos iniciadores desarrollados DiagXotics, como en la primera amplificación de la RT-PCR anidada. Esto, junto con la ausencia de signos clínicos, característicos de la enfermedad ocasionada por el VST, permite deducir que los camarones infectados son portadores asintomáticos del virus [16]. Esto contrasta con lo observado en los camarones de las granjas del Lago de Maracaibo afectadas por el VST en 2005, en las cuales se evidenciaron altas mortalidades y los ejemplares infectados mostraban todos los signos propios de la enfermedad [1].

El VST, que hasta ahora no se había reportado en las poblaciones silvestres de camarones de esta especie, está establecido como una infección enzoótica que puede difundirse hacia otras regiones de Venezuela por migración natural o in-

troducción de material contaminado. Tampoco ha sido reportada la presencia del VST en infecciones asintomáticas en estos camarones. No es de sorprenderse que estas poblaciones hayan adquirido la infección al virus, debido al gran impacto que tuvo esta enfermedad en las poblaciones de camarón cultivado de *L. vannamei* en el Lago de Maracaibo [1].

De acuerdo a la escala para parásitos diseñada por Williams y Bunkey-Williams [43], el valor de la prevalencia (18,7%) indica que la población de *L. schmitti* del Lago de Maracaibo a menudo se encuentra infectada por el VST. Este valor es algo menor que los determinados en otras poblaciones silvestres infectadas con agentes virales, por ejemplo: en Panamá *L. vannamei* mostró 28% de individuos infectados con VNHHI en 2006 [30], mientras que en 1990 se detectó infección por VNHHI en *L. vannamei* con prevalencias de 46% en la región norte y 26% en la región central del Golfo de California [35]. Luego, en 1999 en el norte del Golfo de California se detectó una prevalencia de VNHHI mayor al 50% en la misma especie de camarones [26].

En Asia, el VST ha afectado a las poblaciones locales de *P. monodon* de Taiwán [10]. La enfermedad hasta ahora se

presenta en gran parte, de manera subclínica en las poblaciones de camarón silvestre; sin embargo, este virus ha demostrado ser infeccioso y causar mortalidades en dichas poblaciones, pero sus efectos en las pesquerías comerciales de camarones peneidos siguen manteniéndose desconocidas y sin estudios [10].

Estudios destinados a develar la prevalencia del VST, VSMB y Virus de la cabeza amarilla, tanto en las poblaciones de camarones silvestres del golfo de Tailandia y el estuario de Bangpakong, como en algunas instalaciones de cultivo ubicadas en este estuario (que cultivan *L. vannamei*), arrojaron como resultado que la prevalencia del VST en el golfo de Tailandia en las especies nativas *P. monodon* y *Fenneropenaeus merguensis*, fueron de 100% en los individuos machos de *P. monodon* y de 25% en las hembras, mientras que en *Fenneropenaeus merguensis* alcanzó un 50% en ambos sexos [3]. Además, VCA solo fue encontrado en un nivel muy bajo de prevalencia en las hembras de *P. monodon* (2%).

Por su parte, la prevalencia de VSMB fue de 40% en machos y de 90% en hembras de *P. monodon* aumentando los niveles de prevalencia en temporada de lluvia, por la disminución de la temperatura [3]. Dos años después del primer reporte del brote epizootico del VST en los cultivos de *L. vannamei* de Tailandia se encontró que este patógeno exótico se ha difundido dentro del ecosistema natural, y que la cepa aislada parece estar emparentada con serotipos aislados en China [3].

Los resultados del presente estudio sugieren que pudiera estar estableciéndose una relación de equilibrio virus-hospedador, que conlleva al estado de portador asintomático del camarón, representando este último un importante riesgo epidemiológico para poblaciones cultivadas y otras especies de camarón. Al respecto, investigaciones previas inducen a pensar que cualquier epizootia viral de los camarones podría conducir a una "tolerancia" posterior de los crustáceos a los virus, en un periodo de aproximadamente dos años desde el brote inicial, proceso que retarda el desarrollo de la enfermedad y promueve la existencia de la relación de tolerancia mutua huésped-hospedador [12,14]. Sin embargo, la protección ofrecida por esta "tolerancia" es limitada, por lo que los camarones estarían en riesgo de muerte en caso de que las condiciones del medio fueran adversas.

Ensayos realizados con especies silvestres demostraron que *L. setiferus* fue altamente sensible al VST, mientras que *Farfantepenaeus duorarum* y *F. aztecus* presentaron resistencia a la enfermedad al no mostrar signos clínicos [34]. Estas especies silvestres de las costas de los EUA, pueden establecerse como portadores y reservorios del virus. Sin embargo, un estudio reciente en la Laguna Madre del Golfo de México reportó presencia de camarones sintomáticos al VST en las especies *L. setiferus* y *F. aztecus*, aunque sus cuadros eran leves, según análisis histopatológico [15]. Aquí se reportó una prevalencia general de 8,33% para el VST y para el VNHHI. Considerando el resultado de estos estudios, pudiese ser que las especies de camarones del género *Farfantepenaeus*, tales

como *F. brasiliensis*, *F. notialis* y *F. subtilis*, presentes en las costas venezolanas posean cierta resistencia al VST o ser reservorios potenciales como *F. duorarum* y *F. aztecus* en otras regiones del continente. Al respecto, es necesario mencionar que en las costas de la región occidental del país, la especie predominante en las pesquerías es *L. schmitti* con escasa presencia de especies del género *Farfantepenaeus* [2].

La variabilidad anual del camarón como recurso pesquero es conocida a nivel mundial, sin embargo, no fue sino hasta años recientes que se empezó a considerar que las mortalidades causadas por estos virus podrían tener el potencial de causar dichas variaciones [18]. En este sentido, en los años 2004 y 2005 se presentaron reducciones de las capturas artesanales de camarón blanco en Venezuela, pero de manera más marcada en el estado Zulia, lo cual podría asociarse al surgimiento de la epizootia del VST (FIG. 3) [31]. Este patrón cambió en el 2005, recuperándose la producción, tanto en el estado Zulia como en el resto del país. Esto probablemente se deba al mecanismo de adaptación viral que despliegan estos organismos en presencia de este tipo de patógenos (aproximadamente dos años después de que se produce un primer brote) [12,14]. También se observó disminución en las capturas de otros tipos de especies de camarón de interés comercial en el 2005 y 2006, tanto en el estado Zulia como en el resto del país [13].

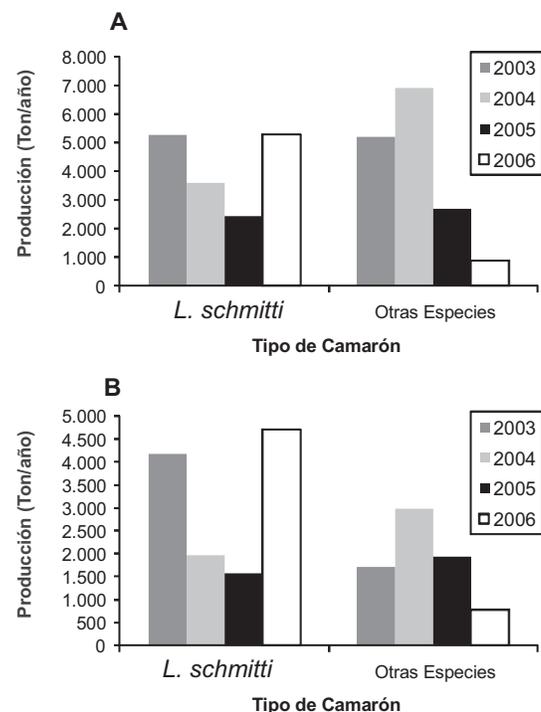


FIGURA 3. CAPTURA DE CAMARÓN MARINO EN VENEZUELA (A) Y EN EL ZULIA (B), DURANTE EL PERÍODO 2003 AL 2006. DATOS DE LA OFICINA DE ORDENAMIENTO PESQUERO DEL INSTITUTO SOCIALISTA DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA [30]/ MARINE SHRIMP CAPTURES IN VENEZUELA (A) IN ZULIA STATE (B), FROM THE PERIOD 2003 TO 2006. DATA FROM THE SOCIALIST INSTITUTE OF FISHING AND AQUACULTURE [30].

Los productores de camarones en el país sostienen que la industria camaronesa no tuvo nada que ver con la introducción del VST en el país [6] y se apoyan en el descubrimiento que el serotipo aislado en Venezuela representa una nueva variante genética [7]. Esto podría explicarse si este patógeno circulaba con anterioridad en las poblaciones silvestres, con la salvedad que no se había expresado en los camarones sometidos a cultivo por no presentarse las condiciones ambientales o de manejo necesarias [6].

Los mecanismos de diseminación del VST aún son inciertos, aunque las teorías iniciales se concentraron en que la diseminación entre granjas fue a través de larvas y reproductores infectados. Recientes investigaciones han demostrado que los mecanismos de transferencia pueden ser a través de insectos y aves [32]. El VST ha sido detectado a través de pruebas biológicas en tejido de *Trichocorixa reticulata*, un insecto estuarino común y de distribución mundial cuyos extractos (conteniendo virus) han demostrado inducir infecciones experimentalmente en *L. vannamei* SPF, por lo que el monitoreo de estos vectores puede servir como una advertencia temprana de la presencia del VST [10, 14]. Al respecto, en pleno desarrollo de los brotes del VST ocurridos en las costas del Lago de Maracaibo en el 2005 se observaron grandes cantidades de carcasas de camarones vertidas a los costados de la carretera (FIG. 4), constituyéndose en fuentes de contaminación del virus a las aguas aledañas. Estos resultados permiten recomendar que, aún siendo las carcasas de origen natural, éstas están infectadas, por lo que es necesario controlar en descarte y evitar así brotes futuros.

El manejo del riesgo de enfermedades por parte de la industria del camarón dependerá en gran medida de los esfuerzos conjuntos entre las instituciones competentes (Insopesca, Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral, Ministerio del Po-



FIGURA 4. EXOSQUELETOS DE CAMARONES DURANTE EL BROTE DEL SINDROME DEL TAURA, FEBRERO 2005, VERTIDOS A ORILLAS DE LA CARRETERA EN ZONAS ALEDAÑAS AL LAGO DE MARACAIBO/ EXOSKELETON OF SHRIMP DURING THE TAURA SYNDROME EPIDEMICS IN FEBRUARY 2005 DUMPED AT THE SIDES OF THE ROAD IN AREAS NEXT TO LAGO DE MARACAIBO.

der Popular para la Agricultura y Tierras) y los productores, para así desarrollar mejores prácticas en el manejo de la granja [22, 39]. Así mismo, resulta sumamente importante establecer planes de contingencia frente a la aparición de nuevos brotes del VST, o de cualquier otra patología viral, manteniendo prácticas de monitoreo constantes con metodologías que permita identificar con precisión el agente causal.

En este sentido, la utilización de los nuevos oligonucleótidos iniciadores desarrollados para utilizarlos en la RT-PCR de doble ronda o anidada, ha demostrado tener un alto poder de detección del VST, mayor al ya sensible método de la RT-PCR de ronda simple, como lo reportado anteriormente, donde se comprobó la ausencia de fragmentos inespecíficos, una sensibilidad y especificidad del 100% y un alto nivel de detección (más de 100 veces mayor a la RT-PCR de ronda simple) [40]. Este puede ser indispensable para mejorar el sistema de vigilancia del VST en las poblaciones de camarones de cultivo y silvestres garantizando así el futuro de la industria de cultivo del camarón marino en el país.

La mayoría de los países latinoamericanos han instaurado programas de domesticación y selección genética utilizando, en los sistemas de maduración, reproductores criados en estanques, con el objetivo de mejorar la resistencia a las enfermedades y la tasa de crecimiento de sus poblaciones [9]. El uso de camarones libres de patógenos específicos o SPF, puede ser una buena opción. El éxito de la aplicación de este concepto dependerá de la ausencia o no de los patógenos específicos en los reproductores, al igual que de la sensibilidad y precisión de la metodología para su detección [5, 22, 38, 44, 45]. Sin embargo, el futuro más cierto se presenta al generar selección y cría de camarones resistentes a los patógenos conocidos en la región, de lo contrario éstos producirán graves pérdidas y riesgos para la industria.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que las poblaciones de camarón blanco del Lago de Maracaibo han sido afectadas por el VST, lo cual puede afectar a la producción de camarones, tanto silvestres como cultivados en esa cuenca.

El sistema de diagnóstico utilizado ha demostrado tener un alto poder de detección, que es indispensable para un mejor control, seguimiento sanitario y desarrollo de estrategias de prevención y contingencia para asegurar el futuro de la industria de cultivo del camarón en Venezuela.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue financiada parcialmente por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente a través del proyecto número CI-2-0404-1369/07. Los autores desean expresar su agradecimiento a los pescadores artesanales que contribuyeron en la obtención de las muestras de camarones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGUADO, N.; BOADA, M.; DE DONATO, M. El síndrome del virus del Taura (TSV) en *Litopenaeus vannamei* del occidente de Venezuela. **Rev. Cient. FCV-LUZ XVIII** (2):134-141. 2008.
- [2] ANDRADE, G.; STOTZ, W. Crecimiento y mortalidad del camarón blanco (*Penaeus schmitti*) en el Lago de Maracaibo, Venezuela. **Zoot. Trop.** 17: 63-89. 1999.
- [3] BARNETTE, P.; KHURURAT, O.; SANANAN, W.; TANGKRAD-OLAN, N.; UPATHAM, S.; PANTUWATANA, S.; WONGWIWATANAWUTE, C. The prevalence of Taura syndrome virus, white spot syndrome virus and yellow head virus in wild shrimps species in Thailand. 2006. Burapha University, Tailandia. On Line: http://www.icaiss.org/pdf/2006ppt/Barnette_Praparsiri.pdf. 16-12-2006.
- [4] BONDAD, M.; LOVELL, E.; ARTHUR, J.; HURWOOD, D.; MATHER, P. **Pathogen Risk Analysis** Pathogen and ecological risk analysis for the introduction of blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris*, from Brunei Darussalam to Fiji. Aquaculture Section. Secretariat of the Pacific Community. Nueva Caledonia, Francia. 82 pp. 2005.
- [5] CARR, W.; SWEENEY, M.; SWINGLE, J. The oceanic institute's specific pathogen free (SPF) shrimp breeding program: preparation and infrastructure. U.S. Marine Shrimp Farming Program 10th Anniversary Review. Gulf Coast Research Laboratory Special Publication. **Gulf Res. Rep.** 1: 47-54. 1994.
- [6] CONROY, G. El virus del Taura se hizo presente en Venezuela. **Panoram Acuic Mag.** 11(1):42-45. 2005.
- [7] CÔTÉ, I.; NAVARROA, S.; TANGA, K.F.J.; NOBLEA, B.; LIGHTNER, D.V. Taura syndrome virus from Venezuela is a new genetic variant. **Aquacult.** 284:62-67. 2008.
- [8] DURAND, S.; LIGHTNER, D. Desarrollo de un método de PCR de una sola sonda anidada para la detección del síndrome de la mancha blanca. **Bol. Nicovita Camar de Mar.** 5: 1-2. 2000.
- [9] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Proceso de Predesove. **Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina.** Documento Técnico de Pesca. No. 450. Roma, Italia. 66 pp. 2004.
- [10] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Amenazas y riesgos de la introducción de especies de camarones exóticas. **Introducciones y movimiento de dos especies de camarones peneidos en Asia y el Pacífico.** Documento Técnico de Pesca. No. 476. Roma, Italia. 86 pp. 2005.
- [11] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service (FIES). **FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura.** Rome/Roma. 72 pp. 2009.
- [12] FLEGEL, T.; PASHARAWIPAS, T. Active viral accommodation: A new concept for crustacean response to viral pathogen. En: Flegel, T. (Ed). **Advances in shrimp biotechnology.** National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Bangkok, Tailandia. 245-250 pp. 1998.
- [13] INSTITUTO SOCIALISTA DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA (INSOPESCA). Gerencia de Ordenamiento Pesquero, Datos de informes internos. Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras, Caracas. Años 2004-2007.
- [14] GRANJA, C.; ARANGUREN, F.; VIDAL, O.; ARAGÓN, L.; SALAZAR, M. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Litopenaeus vannamei*? **Dis. Aquat. Org.** 54: 73-78. 2003.
- [15] GUZMÁN-SÁENZ, F.M.; MOLINA-GARZA, Z.J.; PÉREZ-CASTAÑEDA, R.; IBARRA-GÁMEZ, J.C.; GALAVÍZ-SILVA, L. Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) y virus del síndrome del Taura (TSV) en camarón silvestre (*Farfantepenaeus aztecus* Ives, 1891 y *Litopenaeus setiferus* Linnaeus, 1767) de La Laguna Madre, Golfo de México. **Rev. Biol. Mar. Oceanog.** 44(3): 663-672. 2009.
- [16] HASSON, K.; LIGHTNER, D.; MOHNEY, L.; REDMAN, R.; POULOS, B.; WHITE, B. Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.** 36: 81-93. 1999.
- [17] JORY, D.; CABRERA, L.; BOTAZZI, E.; CASTRES, C.; SILVA, M. The successful shrimp farming industry in Venezuela. **Aquacult. Mag.** 28: 61-64. 2002.
- [18] JOINT SUBCOMMITTEE ON AQUACULTURE (JSA). An Evaluation of Potential Virus Impacts on Cultured Shrimp and Wild Shrimp Populations in the Gulf of Mexico and Southeastern U.S. Atlantic Coastal Waters. A Report to the Joint Subcommittee on Aquaculture. National Marine Fisheries Service, U.S. Department of Commerce Animal and Plant Health Inspection Service. 65 pp. 1997.
- [19] LIGHTNER, D. Introduction. **A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp.** World Aquaculture Society. Baton Rouge, EUA. 304 pp. 1996.
- [20] LIGHTNER, D. The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. **Rev. Scient. et Techni. Office Internat. des Epizoo.** 15(2): 579-601. 1996.

- [21] LIGHTNER, D. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. **J. App. Aquacult.** 9: 27-52. 1999.
- [22] LIGHTNER, D.; REDMAN, R. Strategies for the control most viral diseases of shrimp in the Americas. **Fish Pathol.** 33: 165-180. 1998.
- [23] LIGHTNER, D.V.; PANTOJA, C.R. Bioseguridad en el cultivo de camarones. 2002. Universidad de Arizona, Tucson, EUA. En Línea: http://pacrc.uhh.hawaii.edu/mexico/files/manual/es_07_shrimp_farming_methods.pdf. 18-03-2008.
- [24] LIGHTNER, D.V.; PANTOJA, C.R.; POULOS, B.T.; TANG, K.F.J.; REDMAN, R.M.; PASOS de A., T.; BONAMI, J.R. Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. **Glob. Aquac. Advocate** 7: 85. 2004.
- [25] MARI, J.; POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V.; BONAMI, J.R. Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses **J. Gen. Virol.** 83 (4):915-926. 2002.
- [26] MORALES-COVARRUBIAS, M.S.; NUNAN, L.M.; LIGHTNER, D.V.; MOTA-URBINA, J.C.; GARZA-AGUIRRE, M.C.; CHÁVEZ-SÁNCHEZ, M.C. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in wild adult blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the Northern Gulf of California, Mexico. **J. Aquat. Anim. Health.** 11: 296-301. 1999.
- [27] NOVOA, D.; BORTONE, F.; HERNÁNDEZ, G.; VELAZCO, J.; PADRÓN, M. **Diagnóstico actual de la camaronicultura en Venezuela.** Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Caracas, Venezuela. 29 pp. 2003.
- [28] NUNAN, L.; POULOS, B.; LIGHTNER, D. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura syndrome virus (TSV) in experimentally infected shrimp. **Dis. Aquat. Org.** 34: 87-91. 1998.
- [29] NUNAN, L.; POULOS, B.; LIGHTNER, D. Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoyetic necrosis virus in penaeid shrimp. **Mar. Biotech.** 2: 319-328. 2000.
- [30] NUNAN, L.M.; ARCE, S.M.; STAHA, R.J.; LIGHTNER, D.V. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific ocean off the coast of Panama. **J. World Aquacult. Soc.** 32(3): 330-334. 2007.
- [31] INSTITUTO SOCIALISTA DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA (INSOPESCA). Gerencia de Ordenamiento Pesquero, Datos de informes internos. Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras, Caracas. Años 2004-2007.
- [32] ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE), Aquatic Animal Health Standards Commission (Ed.). **Manual of diagnostic tests for aquatic animals.** Office International des Epizooties, Paris, France. 469 pp. 2006.
- [33] ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE). Síndrome de Taura en Venezuela. **Disease Information** 18(10): 79. En Línea: ftp://ftp.oie.int/infos_san_archives/eng/2005/en_050311v18n10.pdf. 14-09-2006.
- [34] OVERSTREET, R.M.; LIGHTNER, D.V.; HASSON, K.W.; MCILWAIN, S.; LOTZ, J.M. Susceptibility to Taura syndrome virus of some penaeid shrimp species native to the Gulf of Mexico and the Southeastern United States. **J. Invertebr. Pathol.** 69 (2):165-176. 1997.
- [35] PANTOJA, C.R.; LIGHTNER, D.V.; HOLTSCMIT, K.H. Prevalence and geographic distribution of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in wild blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the Gulf of California, Mexico. **J. Aquat. Anim. Health** 11:23-34. 1999.
- [36] PÉREZ, I.; KENSLEY, B. The penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnosis for the families and genera. **Mém. Mus. Hist. Nat.** 175: 1-233. 1997.
- [37] PÉREZ-FARFANTE, I. Illustrated key to penaeoid shrimps of commerce in the Americas. NOAA Technical Reports NMFS No. 64, 32 pp. 1988.
- [38] PRUDER, G.; BROWN, L.; SWEENEY, J.; CARR, W. High health shrimp systems: seed supply, theory and practice. Citado en: Browdy, C., & Hopkins, J. (Eds). **Swimming through troubled water.** Special session on shrimp farming aquaculture. World Aquaculture Society. Baton Rouge, EUA. Pp. 40-52. 1995.
- [39] QUINTERO, E.; FLEGEL, T.; FEGAN, D.; GRAINDORGE, V.; FRELIER, P.; JIMÉNEZ, F. Resúmenes del seminario sobre técnicas de prevención del virus de la mancha blanca (WSSV) y virus de la cabeza amarilla (YHV). **Bol. Nicovita Camar. de Mar** 4 (4): 1-11. 1999.
- [40] RODULFO, H.; DE DONATO, M.; RODRÍGUEZ, M.E.; BOADA, M. Alta sensibilidad de RT-PCR anidada para la detección de TSV en camarones peneidos. **Saber** 22(2): 98-100. 2010.
- [41] TANG, K.F.J.; WANG, J; LIGHTNER, D.V. Quantitation of Taura syndrome virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. **J. Virol. Meth.** 115(1):109-114. 2004.
- [42] WANG, Y.; HONG, C.; LOTZ, J. Development of a PCR procedure for the detection of *Baculovirus penaei* in shrimps. **Dis. Aquat. Org.** 25: 123-131. 1996.
- [43] WILLIAMS, E.H.; BUNKLEY-WILLIAMS, L. Introduction. **Parasites off shore, big game sport fishes of Puerto Rico and the Western North Atlantic.** Chapter 1:

- Puerto Rico Department of Natural and Environmental Resources, San Juan, Puerto Rico, and University of Puerto Rico, Mayaguez, Puerto Rico, 384 Pp. 1996.
- [44] WYBAN, J. Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. In: Fulks, W. & Main, K. (Eds). **Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States**. Oceanic Institute. Honolulu, EUA. Pp. 257-268. 1992.
- [45] WYBAN, J.; SWINGLE, J.; SWEENEY, J.; PRUDER, G. Development and commercial performance of high health shrimp from SPF broodstock *Penaeus vannamei*. En: Wyban, J. (Ed). **Special session on shrimp farming**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, EUA. Pp. 254-260. 1992.