

Susceptibilidad de *Litopenaeus schmitti* y *Cherax quadricarinatus* al virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)

Susceptibility of *Litopenaeus schmitti* and *Cherax quadricarinatus* to white spot syndrome virus (WSSV)

Marco Linné Unzueta-Bustamante^{1*}

Raquel Silveira-Cofficny²

Adela A. Prieto²

Gabriel Aguirre-Guzmán³

Ricardo Vázquez-Juárez⁴

¹ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)/
ITESM Campus Guaymas
Guaymas, Sonora, México

* E-mail: mlinne@cibnor.mx, mlinne@itesm.mx

² Centro de Investigaciones Pesqueras
La Habana, Cuba

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Autónoma de Tamaulipas
Cd. Victoria, Tampico, México

⁴ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)
La Paz, Baja California Sur, México

Recibido en abril de 2003; aceptado en abril de 2004

Resumen

Se realizaron bioensayos en un sistema cerrado con condiciones controladas para determinar la susceptibilidad de *Litopenaeus schmitti* y *Cherax quadricarinatus* al virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) usando *L. vannamei* como especie de referencia positiva para esta infección viral. Los organismos fueron inyectados intramuscularmente (20 µL camarón⁻¹) con una preparación de WSSV obtenida del Laboratorio de Patología Acuicola de la Universidad de Arizona, siendo posteriormente distribuidos al azar en sus respectivos tanques. La susceptibilidad hacia WSSV fue significativamente mayor en *L. vannamei* que en las otras especies ($P < 0.05$). El análisis histológico demostró la presencia de cuerpos característicos de las infecciones con WSSV en las tres especies de crustáceos, con una distribución variable dependiendo del tejido y especie. La hibridación *in situ* permitió también determinar la presencia de estos signos en hemocitos y el hepatopáncreas.

Palabras claves: WSSV, *Litopenaeus vannamei*, *Cherax quadricarinatus*, susceptibilidad, hibridación *in situ*.

Abstract

Bioassays were carried out in a closed system to evaluate the susceptibility of *Litopenaeus schmitti* and *Cherax quadricarinatus* to white spot syndrome virus (WSSV) using *L. vannamei* as the positive control reference species. Animals were injected intramuscularly (20 µL shrimp⁻¹) with a WSSV preparation obtained from the Aquaculture Pathology Laboratory of the University of Arizona. These infected organisms were reared separately in their respective experimental tank. Susceptibility to WSSV was significantly greater in *L. vannamei* than in the other two species ($P < 0.05$). The histological analysis showed characteristic inclusion bodies of WSSV in these three crustacean species, with a different distribution of infection depending on the tissue and species. *In situ* hybridization also showed these signs of infection in hemocytes and hepatopancreas.

Key words: WSSV, *Litopenaeus vannamei*, *Cherax quadricarinatus*, susceptibility, *in situ* hybridization.

Introducción

La camaricultura es una actividad que ha tenido un gran impulso en las últimas décadas y cuyo avance se ha visto afectado debido a que sus sistemas crean un medio ambiente artificial que favorece la selección y proliferación de diversos agentes infecciosos que pueden afectar considerablemente la supervivencia y crecimiento de los organismos bajo cultivo (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994). Diferentes virus han sido reportados a nivel mundial como importantes agentes causantes de serias pérdidas en la producción del camarón, generando mortalidades que pueden llegar hasta de 100%. Estos virus son fácilmente transportados de una región a otra gracias a múltiples actividades antropogénicas, incluyendo todas las relacionadas con la acuicultura (transporte de reproductores, larvas, productos congelados, equipo y material, manejo de aguas de desecho), convirtiéndose en agentes patógenos que representan un problema global de alto impacto (Durand *et al.*, 2000).

El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) fue inicialmente descrito en China y Japón en 1992–1993 (Inouye *et al.*, 1994) y en EUA en 1995 (Jory, 1999), presentando una rápida dispersión en Tailandia, Vietnam, Malasia, India, Nicaragua, Guatemala y Honduras (Durand *et al.*, 1996; Jory, 1999). Este virus es clasificado en la base de datos universal de virus (ICVTdb) como un *Whispovirus* de la familia Nimaviridae, baciliforme, de 70 a 150 nm por 275 a 380 nm, cuyo genoma consiste de una doble cadena de DNA (dsDNA) de 293–305 kb (Lightner, 1996; Vlak *et al.*, 2002). Las infecciones por WSSV han sido reportadas en diversos peneidos como *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris*, *Marsupenaeus japonicus* y *Fenneropenaeus chinensis*, y crustáceos como *Macrobrachium rosenbergii* y *Procambarus clarkii* (Cai *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1998; Lightner and Redman, 1998; Lo *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Los animales afectados por este virus muestran signos de enfermedad como depósitos blancos de calcio en la cutícula, coloración desde rosada a café debido a la expansión de sus cromatóforos, letargia, disminución del consumo de alimento, nado lento y permanencia en las orillas de los estanques, y entre los 3 y 10 días después de presentarse los primeros signos de enfermedad se presentan mortalidades del 100% (Lightner, 1996).

El presente estudio evaluó la susceptibilidad del camarón blanco del Atlántico, *Litopenaeus schmitti*, y de la langosta roja de agua dulce australiana, *Cherax quadricarinatus*, al WSSV empleando al camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* como referencia positiva. El camarón blanco del Atlántico es un camarón comercial con hábitat en el Mar Caribe y las costas del Atlántico de Centro y Sudamérica, con una producción notable en Cuba, y cuya sensibilidad al WSSV no ha sido aún determinada. La langosta roja de agua dulce australiana ha sido introducida en América en la última década, donde ha mostrado un gran potencial para ser cultivada, siendo sin embargo un posible portador del virus.

Introduction

The shrimp culture industry has grown rapidly over the last decades, but production has been hampered because the systems used create an artificial environment that favours the selection and proliferation of diverse infectious agents capable of significantly affecting survival and growth of the cultured organisms (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994). Different viruses have been reported to cause serious losses in shrimp farming worldwide, generating mortalities of up to 100%. These viruses are easily transported to other regions through multiple anthropogenic activities, including those related to aquaculture (transporting of broodstock, larvae, frozen products, equipment and material, and handling of wastewaters), and have become a serious global problem (Durand *et al.*, 2000).

The white spot syndrome virus (WSSV) was first discovered in China and Japan in 1992–1993 (Inouye *et al.*, 1994) and in the United States in 1995 (Jory, 1999), and quickly spread to Thailand, Vietnam, Malaysia, India, Nicaragua, Guatemala and Honduras (Durand *et al.*, 1996; Jory, 1999). WSSV is classified in the universal virus database (ICVTdb) as a member of the *Whispovirus* genus of the family Nimaviridae, bacilliform of 70–150 nm by 275–380 nm, whose genome consists of double-stranded DNA (dsDNA) of 293–305 kb (Lightner, 1996; Vlak *et al.*, 2002). Infections by WSSV have been found in diverse penaeids such as *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris*, *Marsupenaeus japonicus* and *Fenneropenaeus chinensis*, and crustaceans such as *Macrobrachium rosenbergii* and *Procambarus clarkii* (Cai *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1998; Lightner and Redman, 1998; Lo *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Infected animals show the following signs of illness: white spots of calcium on the exoskeleton, pink to brown colouration due to the expansion of chromatophores, lethargy, reduced food intake and slow movement, remaining along the edges of the tanks. Mortalities of 100% occur within 3 to 10 days after the first signs of illness appear (Lightner, 1996).

This study evaluated the susceptibility to WSSV of the Atlantic white shrimp, *Litopenaeus schmitti*, and the Australian red-claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, using the Pacific white shrimp, *L. vannamei*, as positive reference. The Atlantic white shrimp inhabits the Caribbean Sea and the Atlantic coasts of Central and South America. It is a commercial species, successfully harvested in Cuba, whose sensitivity to WSSV has not yet been determined. The Australian freshwater crayfish was introduced to the American continent in the past decade, where it has shown considerable aquaculture potential; however, it is a possible carrier of the virus.

Materials and methods

Viral inoculum

The WSSV inoculum was provided by the Aquaculture Pathology Laboratory at the University of Arizona (Tucson,

Material y método

Inóculo viral

El inóculo de WSSV fue proporcionado por el Laboratorio de Patología Acuicola de la Universidad de Arizona (Tucson, EUA). Éste fue obtenido a partir de camarones libres de patógenos (*L. vannamei*) que fueron infectados con el virus, los cuales desarrollaron signos de enfermedad y en los que se detectó la presencia del virus mediante el análisis por reacción en cadena de la polimerasa (RPC o PCR) e histopatología. El pedúnculo ocular y hepatopáncreas fueron retirados de los camarones infectados y los tejidos remanentes fueron pesados. El exoesqueleto fue retirado y los tejidos infectados se homogeneizaron (4 a 5 v/w) en buffer de TN (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 7.4) (Poulos, 2000, com. pers.) y centrifugaron a 6000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante fue retirado, filtrado (filtro de 0.2 µm de poro), y almacenado a -70°C para su posterior uso.

Organismos experimentales

Los camarones juveniles de *L. vannamei* (1–2 g de peso), *L. schmitti* (0.5–1 g de peso) y *Ch. quadricarinatus* (4–5 g de peso) fueron proporcionados por el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (Guaymas, Sonora, México), el Centro de Investigaciones Pesqueras de La Habana (Cuba), y el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, La Paz, BCS, México), respectivamente. Los organismos experimentales fueron transportados al laboratorio húmedo del CIBNOR en Guaymas (Sonora, México), donde fueron aclimatados en tanques redondos de fibra de vidrio de 1500 L con suministro de aire. Los camarones y las langostas tenían suministro continuo de agua marina filtrada (filtro de 3 µm de poro) a 36‰ de salinidad y 26°C, y agua dulce a 1–2‰ de salinidad y 26°C, respectivamente. Los organismos experimentales fueron alimentados *ad libitum* con alimento comercial para camarón con 30% de proteína cruda (Purina Co., Sonora, México), y confirmados como libres del virus de WSSV por medio de PCR e hibridación *in situ* por el laboratorio de análisis integral acuicola del CIBNOR, el cual pertenece a la red nacional de laboratorios de diagnóstico y prevención de enfermedades de organismos acuáticos del Programa Nacional de Sanidad Acuicola, de México.

Tratamiento infeccioso

Los ensayos de infección fueron realizados en el laboratorio del CIBNOR (Guaymas) en tanques de experimentación de plástico (30 L), con tapa para evitar la contaminación cruzada por aerosoles. De acuerdo con la especie empleada los tanques contenían aireación continua y agua marina filtrada (filtro de 3 µm de poro) a 36‰ de salinidad y 26°C, o agua dulce a 1–2‰ de salinidad y 26°C. Se seleccionaron 30 organismos de cada especie (tratamiento) al azar, se pesaron e

USA). It was obtained from pathogen-free shrimp (*L. vannamei*) that were infected with the virus, which was detected by the polymerase chain reaction analysis (PCR) and histopathology. The ocular peduncle and hepatopancreas were removed from infected shrimp and the remaining tissues were weighed. The exoskeleton was removed, and infected tissues were homogenized (4–5 v/w) in TN buffer (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 7.4) (Poulos, 2000, pers. comm.) and centrifuged at 6000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant was removed, filtered (0.2-µm filter) and stored at -70°C for future analysis.

Experimental organisms

Juveniles of *L. vannamei* (1–2 g in weight), *L. schmitti* (0.5–1 g in weight) and *Ch. quadricarinatus* (4–5 g in weight) were obtained from the Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (Guaymas, Sonora, Mexico), Centro de Investigaciones Pesqueras de La Habana (Cuba) and Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, La Paz, Baja California Sur, Mexico), respectively. The experimental organisms were transported to CIBNOR's wet laboratory in Guaymas (Sonora, Mexico), and acclimated in 1500-L, round, aerated fiberglass tanks. Shrimp and crayfish were continuously supplied with filtered (3-µm filter) seawater at 36‰ salinity and 26°C, or fresh water at 1–2‰ salinity and 26°C, respectively. Organisms were fed *ad libitum* with a commercial shrimp diet containing 30% crude protein (Purina Co., Sonora, Mexico). They were confirmed to be free of the virus by PCR and *in situ* hybridization at CIBNOR's aquaculture analysis laboratory, which belongs to a national network of diagnostic laboratories for the prevention of diseases in aquatic organisms of Mexico's aquaculture health program.

Infection challenge

Infection challenges were performed at CIBNOR's laboratory (Guaymas) in 30-L, plastic experimental tanks with lids to avoid cross-contamination by aerosols. According to the species used, the tanks contained continuous aeration and filtered (3-µm filter) sea water at 36‰ salinity and 26°C, or fresh water at 1–2‰ salinity and 26°C. Thirty organisms of each species (treatment) were randomly selected, weighed and injected intramuscularly in the third somite with a saline solution containing WSSV particles (20 µL shrimp⁻¹), and transferred to experimental tanks (10 organisms tank⁻¹). The control group, i.e. animals injected with a saline solution, were distributed in like manner. Each treatment was tested in triplicate and observed every 2 h. When mortality reached 50% in two of the three experimental tanks, the surviving organisms were used for the histological analysis and *in situ* hybridization (Lightner, 1996). On the eighth day post-injection, all the animals were sacrificed and analyzed. One tank containing non-injected organisms of each species was used as control in the histological analysis and *in situ* hybridization. Organisms were fed a

inyectaron intramuscularmente en la tercer somita con una solución salina con partículas de WSSV (20 μ L camarón⁻¹), siendo trasferidos posteriormente a las unidades experimentales (10 organismos tanque⁻¹). El grupo control (animales inyectados únicamente con solución salina) fue distribuido de igual forma que los organismos tratados experimentalmente. Cada tratamiento fue evaluado por triplicado y observado cada 2 h, hasta que la mortalidad llego a ser de 50% en dos de las tres unidades experimentales. Entonces los organismos sobrevivientes fueron sometidos a análisis histológico e hibridación *in situ* (Lightner, 1996). Ocho días después de la inyección, todos los organismos fueron sacrificados y analizados. Un tanque con organismos no inyectados de cada especie fue usado para el análisis histológico e hibridación *in situ* de organismos control. Los organismos fueron alimentados con alimento comercial para camarón con 30% de proteína cruda (Purina Co., Sonora, México). El alimento fue suministrado en tres raciones iguales (08:00, 15:00 y 20:00 h) que totalizaban el 6% de la biomasa total.

Histopatología e hibridación in situ

El cefalotórax de los organismos experimentales fue cortado e inyectado con solución de Davidson AFA a una dilución de 1:10 v/v. Después de 48 h de fijación, las muestras fueron almacenadas en etanol (50%) hasta su análisis histológico o de hibridación *in situ* (Bell y Lightner, 1988). Se realizó una evaluación previa de los efectos del WSSV en los organismos infectados por medio de análisis histológico en fresco, con una tinción rápida con hematoxilina y eosina, en muestras de branquias y de la primera somita abdominal, fuera de camarón o de langosta (Morales-Covarrubias y Chávez, 1999).

La histopatología se realizó por medio del procedimiento descrito por Lightner (1996), en el que el tejido fue seccionando (3–5 μ m), montado en portaobjetos, teñido con hematoxilina de Harris y eosina (H&E) (Luna, 1968), y evaluado en un microscopio de luz. Las muestras fueron consideradas histológicamente positivas para infecciones de WSSV cuando se detectaron cuerpos de inclusión prominentes de eosinófilos hasta basófilo en núcleos hipertrofiados de células epiteliales cuticulares y del tejido conectivo. También se evaluaron la presencia de lesiones en glándulas antenales, órganos linfoides, tejido hematopoiético y corazón (Lightner, 1996). Las lesiones fueron clasificadas desde G1 hasta G4 de acuerdo con lo descrito por Bell y Lightner (1987), tomando en cuenta la hipertrofia nuclear, desintegración de la membrana nuclear y otros cambio histopatológicos en órganos y tejidos.

Los tejidos controles y los provenientes de los organismos infectados fueron analizados por medio de hibridación *in situ*, cuyo procedimiento y visualización fue realizado de acuerdo con lo descrito por Wongteerasupaya *et al.* (1996) y Durand *et al.* (2003). Los cortes de tejidos fueron montados y procesados sobre portaobjetos para hibridación *in situ* (Fisher Scientific). Las pruebas específicas no radioactivas para WSSV (A6, LN4 y C42, etiquetadas con digoxigenina) fueron suministradas por

commercial shrimp diet, containing 30% crude protein (Purina Co., Sonora, Mexico). Food was supplied in three equal rations (08:00, 15:00 and 20:00 h), constituting 6% of the total biomass.

Histopathology and in situ hybridization

The cephalothorax of the experimental organisms was removed and injected with Davidson's AFA solution (1:10 v/v). After 48 h of fixation, the samples were stored in ethanol (50%) until histological analysis or *in situ* hybridization (Bell and Lightner, 1988). A previous evaluation of the effect of WSSV on infected organisms was carried out histologically using fresh tissue, by hematoxinin and eosin staining of gill and first abdominal somite samples from shrimp and crayfish (Morales-Covarrubias and Chávez, 1999).

Histopathology was performed according to the procedure described by Lightner (1996). The tissue was sectioned (3–5 μ m), mounted on a slide, stained with Harris hematoxinin and eosin (H&E) (Luna, 1968) and evaluated under a light microscope. Samples were considered histologically positive for WSSV infections when prominent eosinophilic to basophilic inclusion bodies were detected in hypertrophied nuclei of cuticular epithelial cells and connective tissue. We also evaluated the presence of lesions on antennal glands, lymphoid organs, hematopoietic tissue and heart (Lightner, 1996). Lesions were classified from G1 to G4 according to Bell and Lightner (1987), considering the nuclear hypotrophy, disintegration of the nuclear membrane and other histopathological changes in organs and tissues.

The control tissues and those from infected organisms were analyzed by *in situ* hybridization. The procedure and visualization were done according to Wongteerasupaya *et al.* (1996) and Durand *et al.* (2003). Tissue sections were mounted and processed on slides for *in situ* hybridization (Fisher Scientific). The non-radioactive specific probes for WSSV (A6, LN4 and C42 labeled with digoxigenine) were provided by D.V. Lightner (Aquaculture Pathology Laboratory, University of Arizona, Tucson, USA). WSSV infected and non-infected tissues of *L. vannamei* were used as control.

Statistical analysis

Mean survival values for shrimp and crayfish were compared by a one-way analysis of variance and Duncan's multiple range test using the Statistica software (1995).

Results

Infection challenges

Some *L. schmitti* and *C. quadricarinatus* organisms infected with the virus presented anorexia, lethargy, muscular opacity and discolouration of the cuticle at 4 days post-injection. Mortalities of 10% and 15%, respectively, were

D.V. Lightner del Laboratorio de Patología Acuícola de la Universidad de Arizona en Tucson. Se emplearon tejidos infectados y no infectados con WSSV de *L. vannamei* como controles.

Análisis estadístico

Los valores medios de supervivencia de camarones y langosta fueron comparados por medio de análisis de varianza de una vía y la prueba de rangos múltiples de Duncan usando el programa computacional Statistica (1995).

Resultados

Tratamientos infecciosos

Algunos organismos de *L. schmitti* y *C. quadricarinatus* infectados con el virus, presentaron anorexia, letargia, opacidad muscular y decoloración de la cutícula 4 días después de su inyección. Se observaron mortalidades de 10% y 15%, respectivamente, a lo largo del bioensayo (fig. 1), siendo éstas significativamente inferiores a las observadas en *L. vannamei* ($P < 0.05$). Esta última especie de camarón mostró cromatóforos rojos sobre todo el cuerpo, además de signos desde moderados a severos de anorexia y letargia desde el segundo día después de la inyección, observándose flacidez en la cutícula de los organismos de *L. vannamei* infectados, cuatro días después de la inyección. Estos organismos mostraron una mortalidad de 20% al segundo día y de 50% al cuarto día, siendo esta mortalidad significativa ($P < 0.05$) con respecto a su control y las otras especies experimentales (fig. 1).

Histopatología

La histología en fresco de las muestras provenientes de camarones *L. vannamei* infectados mostró inclusiones

recordadas durante el bioensayo (fig. 1), which were significantly lower than that found for *L. vannamei* ($P < 0.05$). Infected *L. vannamei* organisms showed red chromatophores over all the body, and moderate to severe signs of anorexia and lethargy after 2 days post-injection, and limpness of the cuticle at 4 days post-injection. Mortality of these organisms was 20% after 2 days and 50% after 4 days, which was significant ($P < 0.05$) relative to the control and other experimental species (fig. 1).

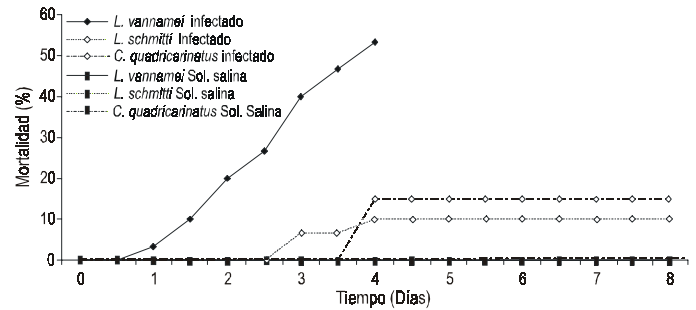


Figura 1. Mortalidad de *Litopenaeus vannamei*, *L. schmitti* y *Cherax quadricarinatus*, al ser infectados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV).

Figure 1. Mortality of *Litopenaeus vannamei*, *L. schmitti* and *Cherax quadricarinatus*, on being infected with the white spot syndrome virus (WSSV).

Histopathology

The histological analysis of the samples from infected *L. vannamei* shrimp revealed characteristic inclusion bodies of WSSV only in the gills (fig. 2).

Figure 3(a–c) shows microphotographs of histological H&E preparations with characteristic inclusions of WSSV in tissues of *L. vannamei*, *L. schmitti* and *C. quadricarinatus*. Juvenile *L. vannamei* shrimp were extremely susceptible to WSSV infection, with evidence of typical inclusions of G3–G4 severity in all the organisms analyzed. WSSV inclusion bodies

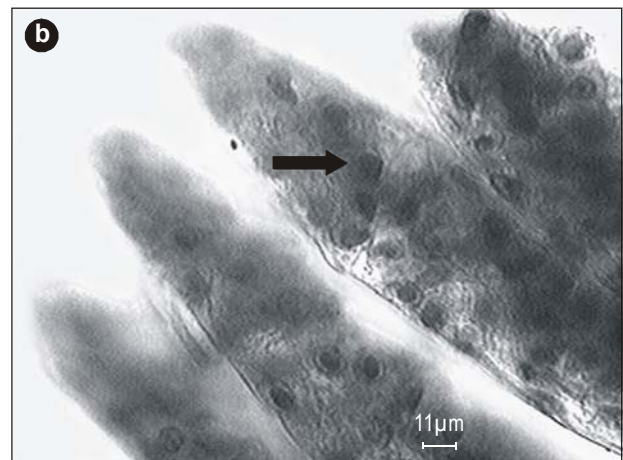
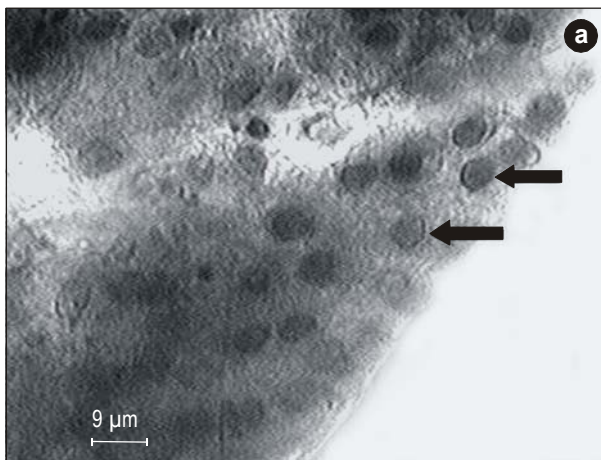


Figura 2. Preparación histológica en húmedo donde se pueden apreciar los cuerpos de inclusión característicos de WSSV (flechas) en branquias de *Litopenaeus vannamei*.

Figure 2. Wet histological preparation, showing the characteristic inclusion bodies of WSSV (arrows) in gills of *Litopenaeus vannamei*.

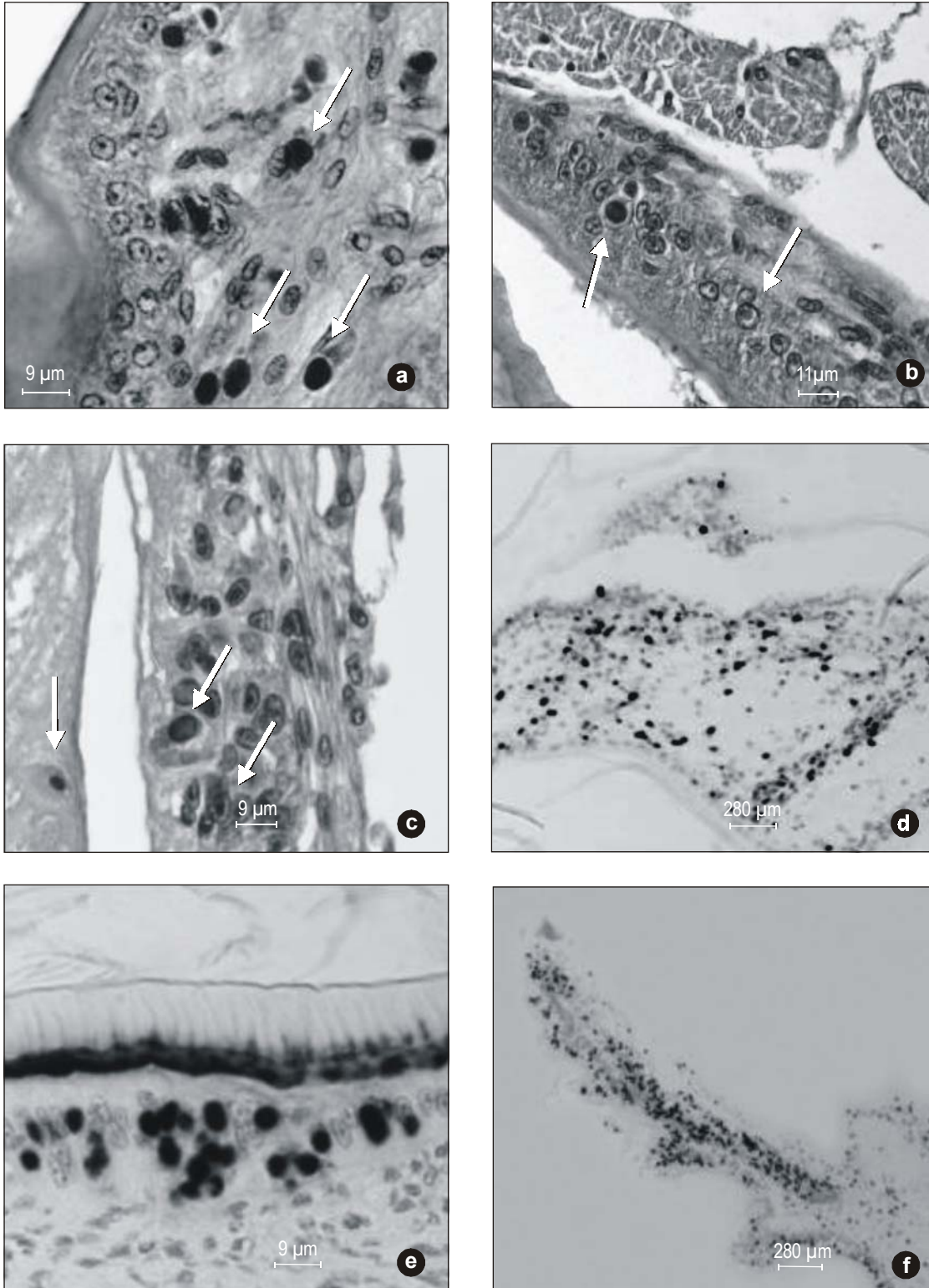


Figura 3. Microfotografía de preparaciones histológicas con inclusiones de WSSV (flechas) en el epitelio cuticular del molino gástrico y tejido conectivo de *Litopenaeus vannamei* (a), *L. schmitti* (b) y *Cherax quadricarinatus* (c), y preparaciones de hibridación *in situ* con núcleos infectados en los tejidos subcuticular y conectivo de *L. vannamei* (d), en la cámara gástrica de *L. schmitti* (e) y en el epitelio subcuticular y subcuticular profundo de *Ch. quadricarinatus* (f).

Figure 3. Microphotograph of histological preparations with inclusions of WSSV (arrows) in the cuticular epithelium of the gastric mill and connective tissue of *Litopenaeus vannamei* (a), *L. schmitti* (b) and *Cherax quadricarinatus* (c), and preparations of *in situ* hybridization with infected nuclei in the subcuticular and connective tissues of *L. vannamei* (d), in the gastric chamber of *L. schmitti* (e) and in the subcuticular and deep subcuticular epithelium of *Ch. quadricarinatus* (f).

características de WSSV solamente en las branquias de estos organismos (fig. 2).

La figura 3(a–c) muestra microfotografías de preparaciones histológicas H&E con inclusiones características de WSSV en tejidos de *L. vannamei*, *L. schmitti* y *Ch. quadricarinatus*. Los juveniles de *L. vannamei* fueron extremadamente susceptibles a la infección con WSSV, presentando evidencia de inclusiones típicas con grado de severidad G3–G4 en todos los organismos analizados. Las inclusiones de WSSV fueron observadas en el tejido subcuticular de la cámara gástrica y en diversos apéndices, tejido conectivo, branquias, pericardio órgano linfoide, ojo, glándula antenal y tejido hematopoiético. Ninguno de los organismos inyectados con solución salina o no inyectados, presentaron estas inclusiones.

Los juveniles de *L. schmitti* fueron menos susceptibles a la infección, mostrando lesiones típicas con un grado de severidad G2–G3 en el tejido subcuticular de la cámara gástrica, en las branquias y el tejido conectivo.

En los juveniles de *Ch. quadricarinatus* se observaron lesiones producidas por WSSV con un grado de severidad G3, en las que los cuerpos de inclusión viral fueron evidentes en el tejido subcuticular, branquias, tejido conectivo y glándula antenal.

Hibridación in situ

Se observó una reacción negativa de hibridación *in situ* en el grupo control, mientras que en las tres especies se observó una gran reacción positiva en órganos y tejidos de organismos infectados con WSSV, siendo esta reacción observada principalmente en los núcleos de las células infectadas. La figura 3(d–f) muestra microfotografías de preparaciones de hibridación *in situ* con núcleos infectados por WSSV en tejidos de *L. vannamei*, *L. schmitti* y *Ch. quadricarinatus*. Se observó una alta incidencia de núcleos infectados en el tejido subcuticular y algunos tejidos conectivos de *L. vannamei*, mientras que *L. schmitti* mostró gran incidencia en el tejido cuticular de la cámara gástrica y en los apéndices. En el tejido subcuticular de *Ch. quadricarinatus* se presentaron también signos de infección. Adicionalmente, se observaron claramente signos de infección entre las células del tejido conectivo de los túbulos hepatopancreáticos de *L. schmitti*, pero no en el de los de *L. vannamei* y *Ch. quadricarinatus*.

Se detectó una reacción positiva a la hibridación *in situ* en muchos de los hemocitos y hepatopáncreas, siendo observados además diferentes niveles de intensidad de color en otros tejidos de las tres especies, producto de la reacción de hibridación. En algunos tejidos el núcleo intacto se tiñó desde azul claro a púrpura, mientras que en otros la membrana nuclear aparentemente se desintegró y la coloración azul se extendió al citoplasma siendo además claramente evidentes cambios citoplasmáticos en los diversos tejidos de *L. vannamei* y *Ch. quadricarinatus*.

were observed in the subcuticular tissue of the gastric chamber and in diverse appendages, connective tissue, gills, pericardium, lymphoid organ, eye, antennal gland and hematopoietic tissue. None of the organisms injected or not injected with saline solution presented these inclusions.

Juvenile *L. schmitti* shrimp were less susceptible to infection. Typical lesions of G2–G3 severity were observed in the subcuticular tissue of the gastric chamber, gills and connective tissue.

Lesions of G3 severity produced by WSSV were observed in juvenile *Ch. quadricarinatus* crayfish. Viral inclusion bodies were evident in subcuticular tissue, gills, connective tissue and antennal gland.

In situ hybridization

A negative reaction to *in situ* hybridization was observed in the control group, whereas a very positive reaction was observed in organs and tissues of WSSV infected organisms, in the three species. This reaction was mainly observed in the nuclei of infected cells. Figure 3(d–f) shows microphotographs of preparations of *in situ* hybridization of WSSV infected nuclei in tissue of *L. vannamei*, *L. schmitti* and *Ch. quadricarinatus*. There was high incidence of infected nuclei in subcuticular tissue and some connective tissues of *L. vannamei*, and in cuticular tissue of the gastric chamber and appendages of *L. schmitti*. Signs of infection were present in subcuticular tissue of *Ch. quadricarinatus*. Signs were also evident among the cells of the connective tissue of the hepatopancreatic tubules of *L. schmitti*, but they were not observed in *L. vannamei* and *Ch. quadricarinatus*.

A positive reaction to *in situ* hybridization was detected in many of the hemocytes and hepatopancreas. We also observed different levels of colour intensity, as a result of the reaction to hybridization, in other tissues of the three species. In some tissues, the whole nucleus stained from light blue to purple, while in others the nuclear membrane apparently disintegrated and the blue colouration extended to the cytoplasm. Moreover, evidence of cytoplasmic changes were clearly observed in diverse tissues of *L. vannamei* and *Ch. quadricarinatus*.

Discussion

Several methods have been developed to detect WSSV infected organisms and tissues. In the present work, histopathology and *in situ* hybridization revealed signs of WSSV infection in diverse tissues of *L. vannamei* (4 days post-injection), *L. schmitti* and *Ch. quadricarinatus* (8 days post-injection). Similar results were obtained by Chang *et al.* (1996), who found that the cuticular epithelium of *L. monodon* was one of the main tissues affected by WSSV infections. The virus also targets connective tissue, nervous tissue, muscular

Discusión

Se han desarrollado varios métodos para detectar organismos y tejidos infectados por WSSV. En el presente estudio se observaron signos de infección por WSSV en diversos tejidos de *L. vannamei* (4 días después de inyectados), *L. schmitti* y *C. quadricarinatus* (8 días después de inyectados) por medio de histopatología e hibridación *in situ*. Chang *et al.* (1996) obtuvieron resultados similares, encontrando que el epitelio cuticular de *L. monodon* fue uno de los principales tejidos afectados por las infecciones de WSSV. También otros tejidos como el conectivo, nervioso, muscular, linfoide, hematopoiético, gástrico, branquias, apéndices y glándula antenal han sido reportados como blancos del virus WSSV (Chang *et al.*, 1996; Lightner 1996; Yoganandhan *et al.*, 2003). En la presente investigación sólo se detectaron signos de infección por WSSV en hemocitos y hepatopáncreas por medio de hibridación *in situ*, lo que sugiere fuertemente que el método de evaluación de los signos de infección debe ser tomado en cuenta dependiendo del tejido analizado. Esto concuerda con lo observado por Chang *et al.* (1996), Durand *et al.* (1996), Nadela *et al.* (1997) y Yoganandhan *et al.* (2003), quienes encontraron diferentes evidencias de infecciones con WSSV dependiendo del método usado. Ellos observaron que la histopatología permite detectar los signos de infección en los tejidos antes mencionados, pero que la hemolinfa, hepatopáncreas y hemocitos solamente evidenciaron estos signos por medio de hibridación *in situ*, RPC o *Western blot*.

El uso de la técnica de tinción rápida con hematoxilina y eosina (Morales-Covarrubias y Chávez-Sánchez, 1999) 2 días después de la inyección con WSSV, reveló la presencia de inclusiones típicas de WSSV solamente en las branquias de *L. vannamei* (fig. 2). Estos resultados sugieren que esta técnica puede ser usada como una herramienta presuntiva en el campo, para infecciones con WSSV en granjas y laboratorios, con la ventaja de no tener que sacrificar a los organismos.

La mortalidad de 50% observada en *L. vannamei* en la presente investigación es similar a la reportada por Wang *et al.* (1999) para esta misma especie cuando fue infectada con diferentes aislados geográficos de WSSV. En contraste, los organismos juveniles de *L. schmitti* y *C. quadricarinatus* mostraron una tolerancia significativa ($P < 0.05$) a las infecciones de WSSV, con un 90% y 85% de supervivencia respectivamente. Sin embargo observaron claros síntomas de letargia, anorexia y cambios en la coloración del músculo abdominal en ambas especies. Éste es el primer reporte que evidencia el grado de susceptibilidad que posee *L. schmitti* hacia WSSV. Sin embargo, la resistencia de *L. schmitti* y *Ch. quadricarinatus* puede cambiar dependiendo de varios factores (estrés, estado nutricional, etc.). Por ejemplo, Wang *et al.* (1999) reportaron que la mortalidad en *Farfantepenaeus duorarum* llegó a ser de 100% al usar un inóculo proveniente de *Fenneropenaeus chinensis*, pero sólo de 50% al usar un inóculo proveniente de *Orconectes punctimanus*, 18 días después de la infección.

tissue, lymphoid tissue, hematopoietic tissue, gastric tissue, gills, appendages and antennal gland (Chang *et al.*, 1996; Lightner, 1996; Yoganandhan *et al.*, 2003). In this study, signs of WSSV infection in hemocytes and hepatopancreas were only detected by *in situ* hybridization. This strongly suggests that the method used to evaluate signs of infection must be taken into account, depending on the tissue analyzed. This concurs with Chang *et al.* (1996), Durand *et al.* (1996), Nadela *et al.* (1997) and Yoganandhan *et al.* (2003), who found different evidences of WSSV infection depending on the method used. They found that signs of infection in the previously mentioned tissues can be detected by histopathology, but that in the hemolymph, hepatopancreas and hemocytes, these signs are only detected by *in situ* hybridization, PCR or western blot.

The rapid staining technique with hematoxylin and eosin (Morales-Covarrubias and Chávez-Sánchez, 1999) revealed, at 2 days post-injection, the presence of typical inclusion bodies of WSSV only in the gills of *L. vannamei* (fig. 2). These results indicate that this technique can be used as a presumptive tool for WSSV infections in farms and laboratories, especially as the organisms do not have to be sacrificed.

The 50% mortality recorded for *L. vannamei* in this study is similar to that reported by Wang *et al.* (1999) for the same shrimp species infected with different geographic isolates of WSSV. In contrast, *L. schmitti* and *Ch. quadricarinatus* juveniles showed a significant ($P < 0.05$) tolerance to WSSV infections, with 80% and 85% survival, respectively; however, clear symptoms of lethargy, anorexia and changes in colouration of the abdominal muscle were observed in these two species. This is the first report that shows the degree of susceptibility of *L. schmitti* to WSSV, but the resistance of *L. schmitti* and *C. quadricarinatus* may change depending on several factors (stress, nutrition). For example, Wang *et al.* (1999) reported that mortality of *Farfantepenaeus duorarum* reached 100% when an inoculum from *Fenneropenaeus chinensis* was used, but only 50% when an inoculum from *Orconectes punctimanus* was used, at 18 days post-infection.

Acknowledgements

This work was possible thanks to CIBNOR. We thank the staff at CIBNOR, P. Hinojosa-Baltazar and G. Gallegos-Simental (Molecular Biology Laboratory) and Marco A. Porchas-Cornejo for their help in the analysis. The original WSSV isolate was provided by D.V. Lightner and B. Poulos (Aquaculture Pathology Laboratory, University of Arizona). We thank Luis R. Martínez-Córdova (University of Sonora) for his help in supplying *L. vannamei* shrimp, and Marcial L. Lizárraga (CICESE) for his support throughout this study. We also acknowledge the assistance provided by SEMARNAP (Mexico).

English translation by Christine Harris.

Agradecimientos

Este trabajo fue llevado a cabo gracias al apoyo del CIB-NOR. Los autores expresan su agradecimiento al personal del CIBNOR, P. Hinojosa-Baltazar y G. Gallegos-Simental del Laboratorio de Biología Molecular y Marco A. Porchas-Cornejo, por su ayuda en los análisis. El aislado original de WSSV fue proporcionado por el D.V. Lightner y B. Poulos del Laboratorio de Patología Acuicola de la Universidad de Arizona. Agradecemos a Luis R. Martínez-Córdova de la Universidad de Sonora (Hermosillo, México) por su ayuda en el suministro de los camarones *L. vannamei*, y a Marcial L. Lizárraga del CICESE por su apoyo a lo largo del presente trabajo. Apreciamos la ayuda de la Dirección General de Acuicultura de SEMARNAP, México.

Referencias

- Bell, T.A. and Lightner, D.V. (1987). IHNV disease of *Penaeus stylirostris*: Effects of shrimp size on disease expression. *J. Fish Dis.*, 10: 165–170.
- Bell, T.A. and Lightner D.V. (1988). *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Soc., Baton Rouge, USA.
- Cai, S., Huang, J., Wang, C., Song, X., Yu, J., Zhang Y. and Yang, C. (1995). Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993–1994. *J. Fish. China*, 19: 112–117.
- Chang, P.S., Lo, C.F., Wang, Y.C. and Kou, G.H. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, 27: 131–139.
- Chang, P.S., Chen H.C. and Wang Y.C. (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture*, 164: 233–242.
- Durand, S., Lightner, D.V., Nunan, L.M., Redman, R.M., Mari, J. and Bonami, J.R. (1996). Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, 27: 59–66.
- Durand, S.V., Tang, K.F.J. and Lightner, D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: Potential avenue for introduction of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV). *J. Aquat. Anim. Health*, 12: 128–135.
- Durand, S.V., Redman, R.M., Mohny, L.L., Tang-Nelson, K., Bonami, J.R. and Lightner, D.V., (2003). Qualitative and quantitative studies of the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSV. *Aquaculture*, 216: 9–18.
- Inouye, K., Miwa, S., Oseko, N., Nakano, H., Kimura, T., Momoyama, K. and Hiraoka, M. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathol.*, 29: 149–158.
- Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T. and Limswan, C. (1994). Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Aquat. Anim. Health*, 61: 27–35.
- Jory, D.E. (1999). Shrimp white spot virus in the western hemisphere. *Aquacult. Mag.*, 25: 83–91.
- Lightner, D.V. (1996). *A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Soc., Baton Rouge, USA.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164: 201–220.
- Lo, C.F., Hsu, H.C., Tsai, M.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Kou, G.H. and Lightner, D.V. (1999). Specific genomic fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org.*, 35: 175–185.
- Luna, L.G. (1968). *Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. McGraw-Hill, New York.
- Morales-Covarrubias, M.S. and Chávez-Sánchez, M.C. (1999). *Manual para la Detección de Enfermedades en Camarones Peneidos utilizando Análisis en Fresco*. Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México, 68 pp.
- Nadela, Jr., Tapay, E.C.B., Cao, S. and Loh, P.C. (1997). Detection of yellow head virus and *Chinese baculovirus* in penaeid shrimp by the Western blot technique. *J. Virol. Methods*, 69: 39–44.
- Vlak, J.M., Bonami, J.R., Flegel, T.W., Kou, G.H., Lightner, D.V., Lo, C.F., Loh, P.C. and Walker, P.J. (2002). Nimaviridae, a new virus family infecting aquatic invertebrates. XII International Congress of Virology, 27 July to 1 August. Paris, France.
- Wang, Q., White, B.L., Redman, R.M. and Lightner, D.V. (1999). *Per os* challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographical isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 170: 179–194.
- Wongteerasupaya, C., Wongwisansri, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Pratanpipat, P., Nash, G.L., Withyachumarnkul, B. and Flegel, T.W. (1996). DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive *in situ* hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. *Aquaculture*, 143: 23–32.
- Yoganandhan, K., Sathish, S., Murugan, V., Narayanan, R.V. and Hameed, A.S.S. (2003). Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques. *Aquaculture*, 215: 21–29.