

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

Relación de la carga viral con indicadores de resistencia al Síndrome de Mancha Blanca en dos líneas genéticas de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*) en pruebas de desafío controlado

**PRESENTA:** 

Medrano Mendoza Thania

**MATRICULA:** 

2162800251

#### **DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Gabriel Ricardo Campos Montes

Departamento El Hombre y su Ambiente

UAM-Xochimilco

CO-DIRECTOR:

Dr. Héctor Castillo Juárez

Departamento de Producción Agrícola y Animal

UAM-Xochimilco

ASESORES:

M.C. Leobardo Montoya Rodríguez
M.C. Selene María Abad Rosales
CIAD-Mazatlán

Ciudad de México, 10 de septiembre del 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

A los ingenieros, Juan Carlos Quintana Casares, Cesáreo Cabrera Villela, Alfonso Martínez Ortega y a todo el cuerpo técnico de la empresa Maricultura del Pacífico S.A de C.V. Gracias por su apoyo incondicional, sin ustedes nada de esto se hubiera logrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo - Unidad Mazatlán, por su hospitalidad, y por todas las facilidades que me brindaron en el procesamiento de muestras.

A mis asesores de tesis, el M.C. Leobardo Montoya Rodríguez y la M.C. Selene María Abad Rosales, por el tiempo que me regalaron, por su guía y apoyo en el desarrollo del trabajo técnico, y las observaciones en la escritura de la tesis.

Al I.B.T Víctor Joaquín Álvarez López y al B.P José Antonio Velázquez Garay, por el asesoramiento técnico en el manejo de organismos, por la capacitación para la recolección y el procesamiento de muestras para análisis histopatológico y PCR en tiempo real, y por su apoyo en el desafío al Síndrome de Mancha Blanca.

A la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco, mi segunda casa.

Al proyecto 34411791, "Desarrollo de una línea genética de camarón blanco del Pacífico, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, resistente a la enfermedad de Necrosis Aguda del Hepatopáncreas y al Síndrome de la Mancha Blanca", por el financiamiento otorgado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

# **DEDICATORIAS**

A mamá, por ayudarme a recuperar el aliento cuando sentía que no podía más, por regalarme un hogar y llenarme a diario de amor, mucho amor.

A mis hermanas, Atenea e Ivon, por recargar mis baterías a base de carcajadas, por su apoyo incondicional, por ser, por existir, por lo que me enseñan y por lo que me regalan a diario.

A mi papá, por brindarme todos los recursos posibles para cumplir mis sueños, por obligarme a continuar.

A mi arcoíris diario, el equipo de Laboratorio de Sistemas Acuícolas, porque siempre que había que saltar lo hicimos. Por que escuchamos, cedimos, y creamos...porque me aceptaron.

A mi director de tesis, Gabriel Ricardo Campos Montes, por los oídos que a diario me regalo, por su apoyo, por las lecciones y toda la paciencia, incluso en aquellos días en los que yo sentía que no podía conmigo.

A mi codirector de tesis, el doctor Héctor Castillo, que pasó de vivir entre nosotros, a vivir en nosotros. Por creer en mí, por sus acertadas observaciones, por inyectarme el gusto por el área acuícola, y por recordarme a diario la grandeza de sonreír.

Por el perico que iniciamos juntos, le quiero.

# **CONTENIDO**

INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVOS	6
MARCO TEÓRICO	7
Camarón blanco del Pacífico (Penaeus (Litopenaeus) vannamei)	
Morfología en juveniles	
Cultivo de camarón blanco del Pacífico	
El síndrome de mancha blanca	11
Criterios de selección para la resistencia a enfermedades en camarón	12
Carga viral	13
MATERIAL Y MÉTODOS	15
Material biológico utilizado	
Descripción de la Unidad de Desafíos.	
Manejo dentro de la UDE	
Siembra	
Inoculación	
Generación de información	
Cálculo de supervivencia y tiempo de muerte para la población en general	
Recuperación de organismos para evaluación de carga viral y daño histopatológico.	
Estimación de carga viral	
Estimación de daño histopatológico	
Índice histológico	
Análisis de la información.	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Supervivencia y hora de muerte	
Cuantificación del número de partículas virales	
Evaluación de daño histológico	
Asociación entre la carga viral y el Índice Histopatológico	
CONCLUSIONES	32
ANEXOS	33

# INTRODUCCIÓN

En México, al igual que en la mayoría de los países, la acuicultura ha adquirido gran importancia por los beneficios sociales y económicos que se traducen en una fuente de alimentación con alto valor nutricional. El cultivo de crustáceos, particularmente el del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*), ocupa un lugar preponderante debido a la importancia que en términos económicos este recurso representa, por lo que conseguir una alta tasa de supervivencia es crucial para la sostenibilidad de esta industria (Briggs *et al.*, 2005; Odegard *et al.*, 2011).

Antes de la década de los 80s, los virus que afectaban a la acuicultura eran considerados de poca relevancia, y su impacto era subestimado o desconocido. Históricamente, el 60% de las pérdidas por patógenos en las producciones acuícolas son atribuidas a los virus, lo que ha generado un creciente conocimiento sobre ellos y los efectos adversos que ocasionan (Sánchez, 2010). La camaronicultura se ha visto afectada por diversos agentes virales, entre los que destacan: El virus de la necrosis infecciosa hematopoyética e hipodérmica, el virus del síndrome de Taura, el virus de la cabeza amarilla, y el del Síndrome de Mancha Blanca (SMB). Este último, es considerado el principal causante de pérdidas económicas por enfermedades virales en crustáceos desde 1992, afectando a cerca del 80% de las granjas en las zonas de brote (Lightner *et al.*, 1998; Bachere, 2000; Lotz y Soto, 2002; Briggs *et al.*, 2005; Satoh *et al.*, 2008; Bateman *et al.*, 2012).

Con el fin de contrarrestar al SMB se han implementado distintos procesos para disminuir su incidencia. En algunos casos, son acciones dirigidas a evitar la entrada del patógeno a las granjas, y en otros casos enfocadas a proporcionar las condiciones adecuadas de cultivo que permitan que el camarón se desarrolle de manera óptima, siendo capaz de resistir o minimizar los efectos del patógeno (Flegel *et al.*, 1997). Sin embargo, los métodos antes mencionados no han sido suficientes para controlar los brotes ni los daños producidos por el virus del SMB (Shekhar *et al.*, 2017), por lo que el uso de organismos que presenten resistencia genética ha sido considerado como una alternativa para enfrentar el problema (Roch, 1999; Bachere,2000; Gjedrem, 2004; Cock *et al.*, 2009). Esta resistencia, ha sido entendida como la capacidad de un organismo infectado para inhibir la replicación del virus, y ha dejado de lado la tolerancia del organismo, que refleja la capacidad para limitar el daño causado por la carga dada de un

patógeno. La resistencia al patógeno ha sido evaluada en los programas de mejoramiento genético (PMG), que utilizan infecciones controladas, a partir de criterios, tales como el tiempo de muerte post-infección y la supervivencia al final del desafío, que también pudieran estar relacionados con la tolerancia al patógeno. Estas variables, tienen una gran influencia ambiental, además de que no permiten detectar animales superiores entre los supervivientes debido a que no brindan más información que el saber si el organismo se encontraba vivo o muerto hasta un tiempo determinado. Lo anterior, limita la respuesta de los programas de selección, por lo que es importante explorar criterios alternativos que permitan llevar a cabo una selección más eficiente.

La carga viral (CV) obtenida por PCR en tiempo real, es una variable que permite cuantificar el número de partículas virales por gramo de tejido presentes en un organismo infectado (Tang y Lightner, 2000, 2001). En el caso de SMB, la CV a través del tiempo tiene un comportamiento de tipo cuadrático que se relaciona con la virulencia de la cepa infectante, la vía de infección y la intensidad de la respuesta antiviral generada por el camarón. Aparentemente, una carga viral mayor incrementaría el daño tisular en organismos infectados, y reduciría la probabilidad de supervivencia (Yong-Chun *et al.*, 2011; Jeswin *et al.*, 2013). De ser así, las diferencias en cargas virales entre organismos, bajo las mismas condiciones de infección, reflejarían diferencias en el daño tisular y por lo tanto en la probabilidad de supervivencia. En tal caso, la CV podría ser considerada como un indicador de resistencia al patógeno. Si esta resistencia presentara componentes genéticos aditivos, la carga viral podría utilizarse como un criterio de selección para mejorar la supervivencia en presencia del patógeno.

# **OBJETIVOS**

# Objetivo general

Conocer la relación de la carga viral (CV) de Síndrome de Mancha Blanca (SMB) con el daño histopatológico producido, el tiempo de muerte y la supervivencia en pruebas de desafío controlado, en dos líneas genéticas de *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*.

# **Objetivos particulares**

- Comparar la supervivencia y tiempo de muerte de dos líneas genéticas en un desafío controlado de SMB.
- Compararla relación de la CV con las lesiones histopatológicas de organismos sintomáticos y asintomáticos de dos líneas genéticas a través del tiempo en un desafío controlado de SMB.

# MARCO TEÓRICO

# Camarón blanco del Pacífico (Penaeus (Litopenaeus) vannamei)

El camarón blanco es nativo de la costa oriental del océano Pacífico, desde Sonora, al norte de México, hacia el Centro, y Sudamérica, hasta Tumbes en Perú (Briggs *et al.*, 2005). Pertenece a la familia de los peneidos (Peneidae), y habita en aguas cuya temperatura es normalmente superior a 20 °C, con una concentración de oxígeno disuelto superior a 3 mg/l, y un pH cercano al neutro, o ligeramente alcalino (Davis *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2005). Esta especie, es conocida por habitar en un amplio intervalo de salinidades, desde 1-2 hasta 40 ppm, en fondos arenosos y arcillosos, entre los 5 y 72 m de profundidad. *P. vannamei*, presenta una coloración normalmente blanca translúcida, que puede cambiar dependiendo del sustrato, la alimentación y la turbidez del agua. Los adultos de esta especie viven y se reproducen en mar abierto, mientras que las postlarvas (PL) migran hacia estuarios, lagunas costeras y manglares, para pasar la etapa juvenil, adolescente, y pre adulta (Hendrickx, 1995; Valdez *et al.*, 2008; Morales, 2009).

En condiciones de producción comercial, los organismos pueden alcanzar un peso corporal promedio de 13.6 g a los 130 días. En laboratorios de cría larvaria, las hembras se reproducen entre los diez y doce meses, con un peso corporal promedio de 64.1 g y liberan entre 24 mil y 589 mil huevos de aproximadamente 0.22 mm de diámetro (Caballero-Zamora *et al.*, 2015). La eclosión ocurre entre las 8 y 12 horas posteriores a la ovoposición. El nauplio, primer estadio larvario de los crustáceos, presenta cinco etapas, cada una con una duración de dos días, en las que la alimentación se lleva a cabo a través de la reabsorción del saco vitelino. La zoea es el siguiente estadio larval, y se divide en tres etapas que transitan en un periodo aproximado de 4 a 5 días en las que los organismos alcanzan una mayor complejidad corporal. La última fase del desarrollo larvario recibe el nombre de mysis, y se compone de tres estadios que duran aproximadamente 4 días, en los que la larva es alimentada con organismos fitoplantónicos y zooplanctónicos.

Doce días después de la eclosión, los organismos entran a la etapa de PL, semejando más su aspecto físico al de un camarón, alcanzando una talla entre los 5 y 25 mm. Las PL reciben su nombre de acuerdo al número de días después de la fase de mysis, de tal forma que una post-larva 10 (PL10), es un organismo que eclosionó 20 días antes. Al inicio de esta etapa, la

alimentación del organismo es zooplanctónica y posteriormente pasa a ser omnívora. A partir de los 60 días, el organismo se encuentra en la fase juvenil, es en esta etapa cuando se alcanzan las tallas mínimas comerciales (Campos, 2009).

#### Morfología en juveniles

El cuerpo de *Penaeus* (*Litopenaeus*) vannamei es cilíndrico, y se divide en tres regiones: el cefalotórax, el abdomen y el telson. Los apéndices del cefalotórax son: las anténulas, y las antenas, las cuales tienen una función sensorial; las mandíbulas, las maxilas, y los maxilípedos, que ayudan en la toma de alimento; y los pereiópodos, que funcionan como patas caminadoras. Como derivado de estos apéndices se localiza la cámara branquial, donde corrientes de agua son creadas por movimientos de los apéndices, principalmente por el escafognatito, apéndice de forma laminar y oval del maxilar.

El abdomen está formado por seis segmentos y seis pares de apéndices llamados pleópodos, que son utilizados como propulsores que permiten el nado hacia adelante, y el proceso de inseminación. Los últimos apéndices abdominales forman parte de la cola, junto con el telson, y son llamados urópodos, los cuales permiten al camarón nadar hacia atrás, y lo ayudan a dirigirse cuando debe nadar hacia adelante (Imagen 1).

Los órganos de *P. vannamei* se encuentran distribuidos en la región del cefalotórax. Presentan un cerebro trilobulado, y un ganglio supraesofágico, así como una glándula antenal que desemboca en las anténulas, con funciones excretoras, y un órgano linfoide, anterior al hepatopáncreas, responsable de la filtración de la hemolinfa. El sistema nervioso es ventral en el tórax y el abdomen, con ganglios metamerizados. Cuentan con un sistema circulatorio abierto, compuesto por el corazón, las arterias, las venas y los senos hemales y un sistema digestivo que se compone de la boca, el estómago y el hepatopáncreas situados en el cefalotórax; un intestino, una glándula intestinal en el abdomen, y el ano, situado centralmente donde comienza el telson (Imagen 1) (Martin y Hose, 2010).

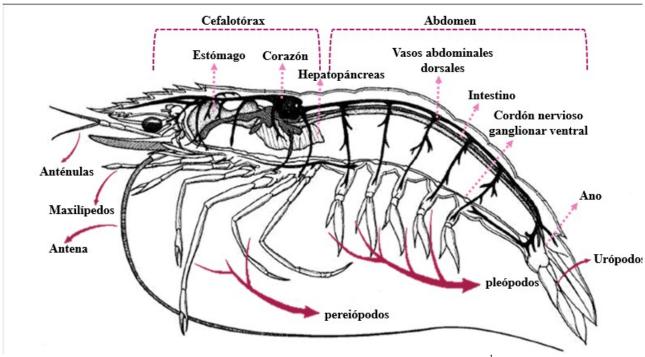


Imagen 1. Anatomía de Penaeus (Litopenaeus) vannamei<sup>1</sup>

#### Cultivo de camarón blanco del Pacífico

El inicio del cultivo de camarón se llevó a cabo en el sureste de Asia, hace más de cinco siglos, utilizando métodos rudimentarios consistentes en capturar y encerrar camarones juveniles en estanques con agua salobre durante algunos meses para esperar su engorda y así poder cosecharlos (Cifuentes, 1990). Fue a inicio de la década de 1970 cuando surgieron en México los primeros intentos de cultivo de camarón, sin embargo, fue hasta 1983 cuando se lograron obtener las primeras cosechas a nivel comercial (Campos, 2009).

El cultivo de camarón a gran escala en México durante años posteriores a 1980 se basó en el cultivo del camarón azul del Pacífico (*Litopenaeus stylirostris*), sin embargo, entre 1998 y 1999, las granjas se vieron gravemente afectadas por el virus del Síndrome de Taura, provocando que la

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Recuperado y modificado a partir de:

http://www.parasitosypatogenos.com.ar/archivos/morfologia/morfologa\_internal.html

industria camaronícola decidiera impulsar la producción de *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, una especie más tolerante a este virus (CAMPRODUCE, 2009).

Desde su introducción hasta el año 2005, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* proporcionó aproximadamente el 52% de la producción total de camarones peneidos a nivel mundial y en el año 2006 colocó a México en el noveno lugar como productor mundial de camarón. Los estados de Sinaloa, Sonora, Nayarit, Tamaulipas y Baja California Sur, ocuparon los primeros cinco lugares en la producción de este crustáceo, aportando el 92.9 % de la producción nacional. En el mismo año, México registró una producción nacional de 129 mil 49 toneladas de camarón, sin considerar a los organismos obtenidos a través de técnicas de captura en sistemas lagunarios y mares (Briggs *et al.*, 2005; CONAPESCA, 2016).

A lo largo de la historia, existen disminuciones significativas en la producción de *Penaeus* (*Litopenaeus*) vannamei resultado de la presencia de enfermedades. El sector camaronícola se ha visto afectado por diversos agentes virales, entre los que destacan; el Virus de la Necrosis Infecciosa Hematopoyética e Hipodérmica detectado en 1981, el virus del Síndrome de Taura en el año de 1992 y el Síndrome de Mancha Blanca (SMB) en 1992 (Briggs *et al.*, 2005). Esta última, es considerada como la principal enfermedad viral a nivel mundial para crustáceos, si bien en México se detectó a partir del año 2000, su mayor impacto económico fue a partir de ciclos de producción posteriores al año 2009. Posteriormente, en el año 2013, el sector camaronícola mexicano se enfrentó nuevamente a grandes pérdidas relacionadas con la aparición de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (NAHP), una enfermedad bacteriana con alta morbilidad y mortalidad en etapas tempranas, que parece coexistir con el SMB, potencializando así las perdidas en el sector (Lightner *et al.*, 2013; Nunan *et al.*, 2014).

Las mortalidades alcanzadas como consecuencia de SMB, obligan a los acuicultores a realizar cosechas de emergencia en las que los organismos salen a la venta sin haber alcanzado las tallas comerciales deseadas, con el agravante de que resultan más costosas que aquellas cosechas programadas con anticipación. El SMB, no solo afecta a las granjas camaroneras, sino a toda la cadena de producción relacionada con las mismas que incluye: Laboratorios productores de larva, empacadoras, transportadores, fábricas de alimento balanceado y otros insumos. Por otro

lado, la infección en estanques de cultivo propicia el vaciado de estos, lo que constituye una contaminación directa de los cuerpos de agua costeros debido a la descarga de toneladas de agua potencialmente infecciosas, además de grandes cantidades de materia orgánica y sólidos en suspensión. Lo anterior empeora si consideramos que muchos de estos efluentes son reutilizados por otras unidades de producción (Martínez-Córdova *et al.*, 2009; Allsopp *et al.*, 2008; Cuellar *et al.*, 2010).

#### El síndrome de mancha blanca

El análisis genético indica que el virus del SMB (VSMB) es un representante de un nuevo género de virus provisionalmente llamado Whispovirus, agrupado dentro de una nueva familia, llamada Nimaviridae (Lo et al., 2012). Su prevalencia, incidencia y diseminación, son favorecidas por: a) su gran velocidad de replicación, lo que produce en condiciones de cultivo, una mortalidad acumulada hasta del 100% entre los dos y los siete días después del inicio de la infección (Briggs et al., 2005), b) el estrés de los organismos, producido por factores meteorológicos y/o parámetros de la calidad del agua, c) las vías de transmisión del virus, de forma vertical, de padres a hijos, u horizontal, consecuencia de la cohabitación y el comportamiento depredativo de los organismos y d) el número de organismos vectores y hospederos del virus, entre los que se encuentran crustáceos, como el camarón, langostas y cangrejos, además de otros organismos acuáticos y bentónicos, tales como, gusanos poliquetos, micro algas, artemia y rotíferos. (Lo et al., 1996; Chang et al., 1998; Supamattaya et al., 1998; Otta et al., 1999; Jeswin et al., 2003).

La infección por el VSMB se manifiesta a través de diferentes signos clínicos, tales como: anorexia, tracto intestinal vacío, alteración motora, nado errático, pérdida del reflejo de la huida, letargia, expansión de cromatóforos, textura blanda del exoesqueleto y del músculo abdominal, y desprendimiento de cutícula. En un desafío controlado, la infección progresiva de los órganos y tejidos, es determinada por la virulencia de la cepa utilizada, la concentración de la dosis infectante y la vía de infección utilizada (Wang *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997 y Lo *et al.*, 1998; Maldonado *et al.*, 2004).

La detección y el diagnóstico del VSMB, a través del análisis histopatológico, permite visualizar los daños celulares y tisulares ocasionados por el virus, así como la progresión de la

enfermedad y el establecimiento en los órganos blanco (Yoganandhan *et al.*, 2003; Pantoja y Lightner, 2003; Rodríguez *et al.*, 2003). Se han observado alteraciones celulares tales como: núcleos hipertrofiados, fragmentación del núcleo, y cromatina marginada, así como cuerpos de inclusión intracelulares basofílicos en el estómago, las branquias, el intestino, la glándula antenal y el órgano linfoide. En cuanto a la infección de tejidos, diversos estudios han identificado que el epitelio cuticular de cada parte del cuerpo del camarón es el principal tejido blanco del SMB, seguido por el tejido conectivo de algunos órganos blanco y el tejido hematopoyético.

El proceso para la evaluación y la asignación de un valor numérico cuantitativo, al grado de severidad de la infección y las lesiones histopatológicas provocadas por el VSMB, en un organismo infectado, es llevado a cabo a través de un índice histopatológico que considera la abundancia de cuerpos de inclusión en cada órganoy el grado de importancia del tejido en el proceso de la infección (Sonnenholzner *et al.*, 2002).

# Criterios de selección para la resistencia a enfermedades en camarón

Anteriormente, en el sector camaronícola, los programas de mejoramiento genético (PMG) tenían como objetivo incrementar la producción total de la biomasa con alto valor comercial, por lo que los criterios de selección involucrados estaban relacionados con el crecimiento y la supervivencia (Ponzoni *et al.*, 2007). Sin embargo, a partir de que el principal problema del cultivo de camarón a nivel mundial lo constituyen las enfermedades infecciosas, de tipo viral o bacteriano, se pusieron en marcha medidas de prevención basadas en la utilización exclusiva de larvas sanas provenientes de reproductores certificados, y en la continuidad de programas de mejoramiento genético basados en la resistencia a enfermedades infecciosas (Moss *et al.*, 2012; Cock *et al.*, 2009).

El proceso de mejora genética dentro de una población se inicia a través de la elección de criterios de selección que pueden estar o no directamente asociados al objetivo del PMG (Cameron, 1997) y que son definidos como aquellas variables sobre las cuales se elegirá un candidato a reproductor. Tales criterios, deben ser medibles (en el candidato y/o en sus parientes), económicos (fáciles de realizar y de bajo costo), y heredables (tener componentes genéticos heredables) (Bodin, 2008).

En términos prácticos, la resistencia a una enfermedad, ha sido evaluada a través de la estimación de la supervivencia y/o el tiempo de muerte de los individuos frente a una infección, siendo esta medida el criterio de selección más utilizada dentro de los PMG. De manera general, se puede evaluar a los candidatos a reproductores a partir de dos esquemas, ya sea a partir de brotes naturales de la enfermedad o de desafíos experimentales diseñados para tal fin. En el primer caso, el uso de la información de campo permite considerar que las condiciones ecológicas de la enfermedad se representan de mejor manera, sin embargo, los factores que influencian la supervivencia bajo estas condiciones son diversos, por lo que conocer la causa exacta de muerte se vuelve más difícil. En el segundo caso, la evaluación de candidatos a reproductores resulta más sencilla y precisa debido a la posibilidad de estandarizar los procesos en el laboratorio, disminuyendo así la variabilidad ocasionada por factores ambientales (Yañez y Martínez, 2010; Caballero-Zamora *et al.*, 2014), sin embargo, los desafíos experimentales suponen que los mecanismos de resistencia e interacciones ambientales son esencialmente iguales a los brotes naturales.

La evaluación genética de la resistencia a enfermedades basada en la supervivencia y/o el tiempo de muerte enfrenta complicaciones tanto en el registro como en el análisis y el uso de la información. Por un lado, el análisis de la supervivencia se ve obstaculizado por la naturaleza binaria de los datos (vivo/muerto) y por el otro, esta variable no contiene ninguna información además del conocimiento de que el animal ha sobrevivido hasta un tiempo dado. Lo anterior, y el uso de organismos no desafiados, en función del desempeño de los parientes, disminuye la intensidad de la selección. Por lo que la diferenciación y selección como candidatos a reproductores de organismos de más alto rango dentro de los organismos sobrevivientes se vuelve prioridad (Falconer y Mackay, 2001; Odegard *et al.*, 2011).

# Carga viral

La carga viral (CV), es una expresión numérica de la cantidad de virus en un volumen dado. Es expresada como el número de partículas virales o partículas infecciosas por mililitro o gramo, según el tipo de ensayo (Buckingham y Flaws *et al.*, 2007).

El monitoreo de esta variable se lleva a cabo a partir de técnicas para su cuantificación, en organismos infectados a través de la detección del genoma y/o las proteínas virales. Para lo anterior, una de las técnicas más utilizadas es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR por sus siglas en inglés). La qPCR detecta los productos amplificados en cada ciclo de la reacción, y es posible cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción (Tang yLightner, 2000; Durand y Lightner, 2002; Bartlett y Stirling, 2003).

En la práctica, este tipo de cuantificación ha sido utilizado como parte del diagnóstico de infecciones producidas por el VSMB, permitiendo evaluar la gravedad de una infección (Tan *et al*, 2001; Dhar *et al*, 2001; Bartlett y Stirling, 2003). Además, la CV ha sido utilizada en investigaciones que involucran la cronología de la infección en diferentes tejidos, y proporciona conocimiento sobre las etapas de infectividad en diferentes horas después del inicio de una infección (Chen *et al.*, 2000; Jeswin *et al.*, 2013).

A menudo, cargas virales altas, son relacionadas con la gravedad de una infección, por lo que conocer la correlación entre la carga viral, el grado de las lesiones ocasionadas y los indicadores de resistencia utilizados dentro de los PMG permitiría evaluar si existe variabilidad en el grado de infección, entre organismos sobrevivientes y por ende conocer los diferentes grados de resistencia y/o susceptibilidad en los organismos de una población. Lo anterior permitiría emplear a la carga viral como un posible criterio de selección dentro de los programas de mejoramiento genético para la resistencia a SMB, incrementando así la precisión y la intensidad de la selección dentro de dichos programas

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

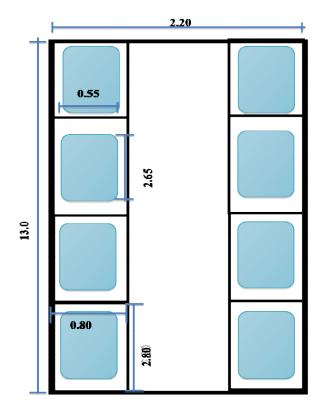
## Material biológico utilizado

El material biológico utilizado provino del Núcleo Genético de la empresa Maricultura del Pacífico. Se empleó una línea seleccionada para crecimiento fundada en el año 2002 (CRE) (Campos–Montes *et al.*, 2013), y otra conformada en el año 2013 por organismos provenientes de poblaciones de origen panameño, ecuatoriano y estadounidense, con antecedentes de resistencia a SMB (RES), así como cruzas entre ellas. Los organismos de ambas líneas, fueron identificados por medio de elastómeros de colores localizados en el último segmento abdominal (Castillo-Juárez *et al.*, 2007), y registraron una edad y un peso promedio (desviación estándar) de 77.3 (1.71) días y 2.36 (1.48) g, respectivamente. Durante el desafío fueron utilizados un total de 8,829 organismos pertenecientes a 225 familias.

# Descripción de la Unidad de Desafíos

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Desafíos a Enfermedades (UDE) del Núcleo Genético de Maricultura del Pacifico SA de CV, ubicada en Mazatlán, Sinaloa, a 30 kilómetros de la unidad de producción de camarón más cercana. La UDE, es un espacio cerrado de 13 m de largo, 2.20 m de ancho y 2.60 m de alto. Dentro de la unidad, la temperatura ambiental se mantuvo entre los 27 y 30 °C y se utilizó un fotoperiodo de 12/12 horas.

A lo largo de la unidad, se distribuyeron 8 tinas de geomembrana de 2.80 m de largo, 0.80 m de ancho y 0.50m de altura, con capacidad de una tonelada de agua y una capacidad de carga de 3.5 kg. Cada una de ellas contó con una jaula elaborada con tubos de PVC de 2.65 m de largo, 0.55 m de ancho y 0.65 m de altura, malla plástica en las paredes y un fondo de malla de nylon. Las tinas se encontraban conectadas por un sistema de recirculación de agua, y cada una de ellas contó con un sistema de aireación constante por medio de piedras difusoras (Imágenes 2 y 3). Una de las tinas fue destinada como control, por lo que fue cubierta con plástico, para evitar contaminación por salpicaduras y aerosoles.



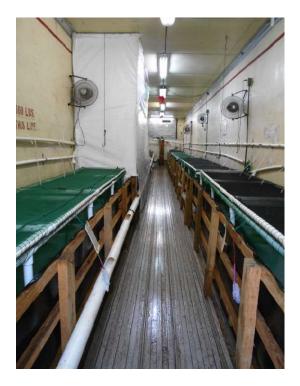


Imagen 2. Dimensiones de la Unidad de Desafíos

Imagen 3. Unidad de Desafíos

## Manejo dentro de la UDE

El agua abastecida a la UDE provino del núcleo genético de Maricultura del Pacífico, en donde fue tratada por medio de procesos físicos, químicos y biológicos, con la finalidad de evitar la presencia de patógenos en el agua. Cada una de las tinas fue llenada con una tonelada de agua, cuya temperatura y cantidad de oxígeno disuelto fueron monitoreadas cada cuatro horas (Imagen 4). Posterior al proceso de siembra, los parámetros de las características de calidad del agua (pH, NH<sub>4</sub>+, NO<sub>2</sub>-, NO<sub>3</sub>-) fueron evaluados cada seis horas, por medio de pruebas de colorimetría, mientras que cada 24 horas, se llevó a cabo la recuperación de los niveles de agua. El sistema de recirculación se mantuvo encendido hasta cuatro horas previas a la inoculación. Dos horas previas a la infección, se retiraron los desechos del fondo de las tinas por medio de sifoneo y se llevó a cabo el recambio de agua del 50 % del contenido de las tinas.



Imagen 4. Control de parámetros físico-químicos

#### Siembra

Se sembraron cinco organismos por familia en cada una de las tinas de la UDE. Los camarones tuvieron un periodo de aclimatación de cinco días, durante los cuales se vigiló su salud, en este proceso, se registro una mortalidad del 1%, de individuos que fueron remplazados por organismos de las mismas familias. Previo al desafío, se llevó a cabo la recolección al azar de diez organismos de la UDE, con el fin de verificar que se encontraran libres del virus de la Necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV, por sus siglas en inglés), la Enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND), el Síndrome del virus de Taura (TSV) y el Síndrome del virus de la Mancha Blanca (WSSV).

#### Inoculación

Los organismos fueron alimentados con tejido de camarón infectado con el virus del SMB producido en el Laboratorio de virología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán, especialmente para el PMG de Maricultura del Pacífico. La carga viral evaluada por qPCR fue de 9.76x10<sup>4</sup>copias de ADN viral por gramo de tejido y fue proporcionado como alimento a los organismos experimentales (10% de la biomasa total), en dos dosis distribuidas de manera homogénea en cada una de las tinas. La primera con 162 g de inóculo (6 % de la biomasa total) y 12 horas después, la segunda con 108 g (4% de la biomasa total) en cada una de las tinas (Imagen 5).



Imagen 5. Inoculación de los organismos

#### Generación de información

Se consideró para la evaluación de los indicadores de resistencia (tiempo de muerte y supervivencia), únicamente a las líneas CRE y RES, pero no a sus cruzas. La información, proviene de 5571 organismos pertenecientes a 49 familias de la línea de CRE y 117 familias de la línea de RES.

# Cálculo de supervivencia y tiempo de muerte para la población en general

A partir de las 24 horas post infección (hpi) se inició la recolección de organismos muertos, para lo cual se utilizaron bolsas de poliuretano previamente identificadas con el número de tina, la fecha y la hora post infección. Se consideró como organismo muerto a aquel que no presentó algún tipo de movilidad ante un estímulo físico. La recolección de organismos se detuvo a las 111hpi, cuando en 5 colectas consecutivas se obtuvieron 4 o menos organismos muertos dentro de la UDE. Los organismos vivos hasta ese tiempo fueron considerados supervivientes.

Posteriormente se obtuvo la familia, el grupo de procedencia (CRE o RES) y el peso corporal de cada uno de los organismos. El tiempo de muerte se consideró como el número de hpi a las que el organismo fue hallado sin ningún tipo de movilidad, y la supervivencia fue considerada como una variable binaria, 1 para organismos sobrevivientes a las 111 horas y 0 para organismos muertos durante el desafío.

## Recuperación de organismos para evaluación de carga viral y daño histopatológico

Para la recolección de organismos utilizados para la cuantificación de partículas virales y evaluación del daño histológico, fue seleccionada al azar una de las tinas de la UDE. Seutilizaron80 organismos pertenecientes a 49 familias de la línea de crecimiento y 81 organismos de 90 familias de la línea de resistencia. Los individuos fueron recolectados en tres diferentes intervalos: 1) previo al pico de las mortalidades (T1, de las 33 a las 47 hpi), 2) en el pico de las mortalidades (T2, de las 65 a las 77 hpi) y 3) al final del desafío (T3, de las 101 a las 111 hpi) (Cuadro 1). A lo largo de cada uno de los intervalos, los organismos recolectados fueron clasificados, de acuerdo a su estado de salud, en organismos moribundos y asintomáticos. Se consideró moribundo a aquel organismo que presentó nula o débil reacción de huida y palpitación del escafognatito, además de expansión de cromatóforos e intestino vacío. Los organismos asintomáticos fueron aquellos individuos que no presentaron los principales signos de enfermedad, dentro de los que se consideraron: expansión de cromatóforos, nado errático y que presentaran reacción de huida al tacto.

Cuadro 1. Número de organismos recolectados para determinación de partículas virales y daño a nivel tisular

Periodo de colecta			
Estatus	Previo al pico de las mortalidades 33-47 hpi	Pico de las mortalidades 65-77 hpi	Final del desafío 101-111 hpi
Moribundo (n)	27	29	27
(RES/CRE)	(13/14)	(13/16)	(14/13)
Asintomático (n)	24	25	29
(RES/CRE)	(13/11)	(13/12)	(15/14)

RES/CRE: Número de individuos de la línea de resistencia/ Número de individuos de la línea de crecimiento hpi: Horas post infección

Moribundo: Individuos con intestino vacío, expansión de cromatóforos, palpitación del escafognatito, nado errático y/o sin reacción de huida

Asintomáticos: Individuos sin expansión de cromatóforos y que presentaron reacción de huida al tacto

#### Estimación de carga viral

De cada organismo recolectado se obtuvieron los primeros dos pleópodos y la branquia izquierda (que corresponde al lado derecho del operario al colocar al organismo con el rostrum hacia

abajo). Estas muestras fueron almacenadas en tubos eppendorf de 5 ml, con alcohol al 96 % a -20 °C hasta su análisis por qPCR (Imagen 6).

La determinación del número de copias de ADN del VSMB presentes en las muestras de los organismos colectados durante el desafío, se realizó mediante un sistema de detección basado en PCR cuantitativo en tiempo real (IQ Real<sup>TM</sup> WSSV Quantitative System, Gene Reach Biotechnology Corp.) en el laboratorio de Diagnóstico Molecular del CIAD, Unidad Mazatlán, acreditado ante la entidad mexicana de acreditación (EMA) No. SA-0672-024/15).Para lo anterior se utilizó un termociclador de Tiempo real CFX96BIO-RAD<sup>TM</sup>, cuyas condiciones de reacción fueron: una incubación inicial de 95°C durante 5 min, seguida de 40 ciclos a 93°C por 15 s y 60°C durante 1 min. Las muestras de interés (0.05g) fueron analizadas por duplicado añadiendo 2 μL del ADN extraído a una mezcla de reactivos (master mix) con 23μL. El procedimiento incluyó controles negativos y positivos (10¹y 10³) y para la interpretación de los resultados se consideró el comportamiento de las curvas, las amplificaciones correspondientes a los controles, y los valores cuantitativos para cada muestra.



Imagen 6. Obtención de muestras para cuantificación de carga viral

## Estimación de daño histopatológico

Los organismos muestreados fueron fijados con solución Davidson<sup>2</sup>, de acuerdo a lo descrito por Bell y Lightner (1988) para su posterior análisis histopatológico. A cada organismo se le inyectó entre el 5 y10% de su peso corporal iniciando en el cefalotórax, y continuando con la zona abdominal. Posteriormente se realizó un corte longitudinal del organismo, desde el sexto

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Formaldehido al 37- 40 %, etanol al 96%, ácido acético glacial, agua destilada

segmento abdominal hasta la base del rostrum y fue sumergido en solución Davidson durante 72 horas para después ser almacenado en etanol al 70 % hasta su procesamiento. Los organismos permanecieron identificados en frascos de 100 ml previamente referidos con el número y la condición del organismo contenido, así como la fecha y la hora de colecta (Imagen 7).



Imagen 7. Fijado de muestras para análisis histopatológico

El procesamiento de las muestras para análisis histológico se llevó a cabo en el laboratorio de Histopatología de la misma institución, de acuerdo con el procedimiento descrito por Lightner (1996). El cefalotórax de cada uno de los organismos muestreados, fue seccionado longitudinalmente para su posterior deshidratación en un histoquinete automático (modelo 4640-b, Sakura®), siguiendo una secuencia de alcoholes de menor a mayor concentración, seguida por la aclaración en xileno y embebido en parafina. Posteriormente, utilizando un centro de inclusión de tejidos (modelo EG1160, Leica<sup>TM</sup>), se proporcionó soporte sólido a los tejidos a través de su inclusión en parafina. Consecutivamente los bloques de parafina fueron expuestos durante hora y media a solución descalsificadora³. Finalmente, en un micrótomo (modelo 820, Leica<sup>TM</sup>), fueron obtenidos cortes de tejido de 5μm, que fueron colocados en portaobjetos para subsecuentemente ser teñidos mediante la técnica Hematoxilina de Harris-Eosina-Floxina (H-E-F) y montados con medio de montaje Cytoseal 60 (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) dejándose secar a temperatura ambiente para después poder ser observados en un microscopio compuesto (Olympus<sup>TM</sup>), adaptado con una cámara digital para la obtención de imágenes.

-

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Cloruro de mercurio, ácido nítrico concentrado, ácido crómico, alcohol etílico al 95% agua destilada.

# Índice histológico

La asignación de un valor numérico a los grados de severidad de la infección y las lesiones histopatológicas provocadas por el VSMB, se llevó a cabo utilizando un índice histopatológico (IHP), basado en el procedimiento establecido por Lightner *et al.* (1996), y Sonnenholzner *et al.* (2002). En cada uno de los organismos muestreados fueron analizados el estómago, tejido conectivo, glándula antenal, epitelio cuticular, branquias, órgano linfoide y tejido hematopoyético.

El valor del índice histopatológico fue calculado a través de la siguiente fórmula:

$$IH = \sum_{i=1}^{7} \left( \frac{GS_i}{4} (I_i) \right)$$

En donde:

 $GS_i$  = Grado de severidad de la infección en cada órgano, donde 0 corresponde a la ausencia de cuerpos de inclusión, mientras que el número 4, es el grado máximo de severidad de la infección, representado por la presencia de abundantes cuerpos de inclusión en el 95 a 100% del tejido evaluado.

 $I_i$ =El valor de importancia del órgano (1-3), de tal manera que a la glándula adrenal y epitelio cuticular se le asignó un valor de 1, al estómago y tejido conectivo valor de 2 y al órgano linfoide, branquias y tejido hematopoyético el valor de 3.

4= Constante de estandarización a 1, por ser 4 grado el grado máximo de severidad de la infección.

#### Análisis de la información

Las diferencias de supervivencia y tiempo de muertes entre las líneas se analizaron con el siguiente modelo mixto:

$$y_{ijkl} = \mu + L_i + P_i + TK_K + e_{ijkl}$$

Dónde:  $y_{ijkl}$  es la observación de interés (Tiempo de muerte o supervivenciaal final del desafío), µes la media poblacional de la variable de interés,  $L_i$  es la i-ésima línea genética (crecimiento, resistencia),  $P_j$ es el peso corporal del camarón,  $TK_k$  es el efecto del k-ésimo tanque de la unidad de desafío y  $e_{ijkl}$  es el error aleatorio  $\sim N0, \sigma_e^2$ .

Para el análisis de CV e IHP en cada uno de los tiempos se consideró el siguiente modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + L_i + E_j + LE_{ij} + P_{k(i)} + e_{ijkl}$$

Dónde:  $y_{ijkl}$  es la observación de interés (CV o IHP),  $\mu$  es la media poblacional de la variable de interés,  $L_i$  es la i-ésima línea genética (crecimiento, resistencia),  $E_j$ es el j-ésimo estatus (moribundo, asintomático),  $LE_{ij}$  es la interacción línea con estatus,  $P_{k(i)}$  es el peso corporal del camarón, anidado en i-ésima línea genética y  $e_{ijkl}$  es el error aleatorio  $\sim N0, \sigma^2_e$ .

En tanto que para definir la relación entre CV e IHP se consideró el siguiente modelo:

$$IHP_{ijkl} = \mu + LE_i + CV_{j(i)} + T_{ijk} + e_{ijkl}$$

Dónde: IHP<sub>ijk</sub> es la variable de respuesta,  $\mu$  es la media poblacional de la variable de interés, LE<sub>i</sub>esel i-ésimo grupo que representa la combinación de línea genética (crecimiento, resistencia) con estatus (moribundo, asintomático),  $CV_{j(i)}$  es la carga viral individual del organismo, anidado en i-ésimo grupo Línea/Estatus,  $T_k$  es el k-ésimo tiempo de colecta considerado como bloque y  $e_{ijkl}$  es el error aleatorio  $\sim N0, \sigma^2_{e}$ .

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Supervivencia y hora de muerte

La resistencia a enfermedades ha recibido una importancia creciente en los programas de cría de acuicultura en todo el mundo, incluidas en especies como el salmón, el bacalao, la trucha y el camarón blanco del Pacífico (Dorson *et al.*, 1995; Argue *et al.*, 2002; Thodesen y Gjedrem, 2006; Houston *et al.*, 2008; Cock *et al.*, 2009; Odegard *et al.*, 2010). En esta última especie, la resistencia a enfermedades específicas, como el SMB, es evaluada a partir de criterios de

selección, tales como el tiempo de muerte y el porcentaje de supervivencia en brotes naturales, o desafíos controlados.

En estudios anteriores, se han reportado diferencias en las tasas de supervivencia entre grupos, por ejemplo, mediante una infección vía *per os*, Gitterle *et al.* (2005), obtuvo una supervivencia a los veinticuatro días de desafío del 5.7 y 7.9%, para dos líneas inoculadas durante cinco días con una toma diaria del 10% de la biomasa total, a partir de músculo de camarones moribundos, expuestos previamente a un brote natural del SMB. Por otro lado, Cuellar *et al.* (2012), reportó una supervivencia a los diecisiete días de desafío del 23, 26, y 57% para tres diferentes grupos, que recibieron una toma del 5% de la biomasa total con una concentración inicial del inoculo de  $5.7x10^6$  copias de ADN por gramo de tejido. Además, en el año 2011, a través de una inyección intramuscular con una concentración de  $10^3$  copias de ADN, en organismos con un peso promedio de  $7.73 \pm 0.53$  g, Yong-Chun *et al.* (2011) conformaron tres diferentes grupos a partir de 29 familias una vez llevado a cabo el análisis de supervivencia y la hora de muerte post infección. A los quince días de desafío obtuvieron una supervivencia de  $22.7 \pm 12.30$  % para el grupo denominado alta resistencia,  $9.08 \pm 1.46$  % para el grupo de resistencia moderada y  $0.78 \pm 1.70$ % para el grupo altamente susceptible. Para tales grupos, se registró un tiempo de muerte promedio para el 50% de mortalidad acumulada de 127.28, 98.50 y 75.7 horas, respectivamente.

Estas diferencias entre los indicadores de resistencia utilizados, coinciden con lo encontrado en el presente estudio, que muestra variación para ambos indicadores dentro de cada población. Aunado a lo anterior, se encontraron diferencias significativas entre la línea de crecimiento y la línea de resistencia (P<0.05) (Gráfico 1).

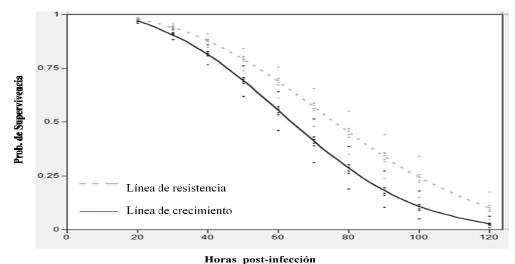


Gráfico 1. Probabilidad de supervivencia a través del tiempo para dos líneas de *Penaeus* (*Litopenaeus*) vannamei

La línea de resistencia, presenta un 300% más de supervivencia y un 17% más de horas de muerte post-infección (Cuadro 2). Estas diferencias entre líneas en los indicadores de resistencia podrían estar asociadas con diferencias en las cargas virales individuales y la severidad de las lesiones provocadas por el SMB en cada una de las líneas.

Cuadro 2. Media (desviación estándar) para la probabilidad de supervivencia al final del desafío y tiempo de muerte post infección en dos líneas genéticas de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*)

	No. de individuos	No. De familias utilizadas	<b>X</b> Supervivencia	X Hora de muerte
General Tina	742	166	0.30 (0.46)	73.97 (24.36)
Crecimiento	215	49	0.12 (0.32)	64.78 (23.44)
Resistencia	527	117	0.38 (0.48)	77.73 (23.74)

La hora mínima de muerte para las líneas de crecimiento y resistencia, fue de 6 y 8 hpi postinfección, respectivamente. La hora máxima de muerte para ambas líneas es de 101 hpi.

# Cuantificación del número de partículas virales

De acuerdo con Yong-Chun *et al.* (2011) y Jeswin *et al.* (2015), el número de partículas virales por gramo de tejido en un organismo se verá afectado por diversos factores como el tiempo de exposición al virus, la carga viral utilizada en el inóculo, o bien, por el grado de infección.

Yong-Chun et al. (2011), estimaron cargas virales menores, en organismos pertenecientes a grupos con aparente resistencia al SMB. Tras llevar a cabo una infección controlada a partir de una inoculación intramuscular con una concentración inicial de 10<sup>3</sup> copias de ADN, en organismos pertenecientes a 29 familias, se registraron diferencias entre ellas respecto al número de partículas virales, por lo que fueron agrupadas en tres categorías, denominadas: 1) altamente resistentes, 2) moderadamente resistentes y 3) altamente susceptibles. A las 84 hpi, el grupo de organismos resistentes registró una carga viral de  $6x10^6 \pm 0.98 x10^6$ , mientras que el grupo altamente susceptible, registró  $34x10^6 \pm 2.02 \ x10^6$  partículas virales por gramo de tejido, lo que permite suponer la existencia de variación genética dentro de la población. Contrario a estas diferencias, donde se supone la presencia de resistencia en al menos uno de los grupos, en el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas para cargas virales entre líneas en ninguno de los tiempos de colecta (P>0.05) (Cuadro 3). Sin embargo, es importante considerar que el coeficiente de variación de la carga viral para la línea de crecimiento (11.8%), es menor que el de la línea de resistencia (16.1%), lo que podría dar indicios de una mayor disparidad en la respuesta de los hospederos dentro de la línea de resistencia. Esta variación genética en la resistencia al patógeno podría tener un efecto en la propagación de la enfermedad en función de la infectividad de los organismos. Dentro de una población, los organismos con cargas virales altas se convierten en un reservorio del virus, incrementando la probabilidad de reinfección (Horns y Hood, 2012).

En el análisis del número de partículas virales de acuerdo con el estatus de los organismos, en el presente estudio se encontraron diferencias significativas en cada uno de los tiempos de colecta (P<0.02). Los organismos moribundos, presentaron cargas virales mayores que los organismos asintomáticos. Lo anterior, concuerda con la tendencia que muestran los resultados de Yong-

Chun et al. (2011)<sup>4</sup>, quien a las 84 hpi, en organismos pertenecientes al grupo de resistencia, registro 6.77 ± 5.99, partículas virales para organismos supervivientes y 8.80 ± 7.69para organismos muertos. Aunado a lo anterior, en el presente estudio, el coeficiente de variación para camarones asintomáticos es mayor que el coeficiente de variación para individuos moribundos, 16.3 y 8.6 %, respectivamente. Lo anterior, podría estar relacionado con una mayor diversidad en los grados de infección en los organismos asintomáticos, debido a diferencias genotípicas que diversifican la respuesta de los organismos, o bien, a que la cantidad de tejido infectado que consumió cada uno de los organismos de la población fue diferente. Esto último, atribuible a la vía de infección utilizada, en conjunto con el canibalismo que es común en esta especie.

En cuanto a la interacción línea con estatus, esta no fue significativa en ninguno de los tres tiempos de colecta (P>0.05).

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Originalmente, Yong-Chun et al., 2011 reportan en sus resultados la concentración de la carga viral. Para facilitar la comparación con los resultados del presente estudio, estas concentraciones se convirtieron a logaritmo base 10.

Cuadro 3. Medias mínimas cuadráticas ± error estándar para carga viral por gramo de tejido, en dos líneas genéticas de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus* (*Litopenaeus*) vannamei) en organismos asintomáticos y moribundos recolectados en tres diferentes tiempos

	Inicio de las mortalidades (33-47 hpi)	Pico de las mortalidades (65-77 hpi)	Al final del desafío (101-111 hpi)
	Línea		
Resistencia	$6.87 \pm 0.22^{A}$	$7.14 \pm 0.12^{A}$	$7.15 \pm 0.16^{\mathrm{A}}$
Crecimiento	$7.19 \pm 0.22^{A}$	$7.37 \pm 0.12^{A}$	$7.44 \pm 0.16^{\mathrm{A}}$
Estatus			
Asintomático	$6.65 \pm 0.22^{A}$	$6.64 \pm 0.13^{A}$	$6.86 \pm 0.16^{\mathrm{A}}$
Moribundo	$7.41 \pm 0.21^{B}$	$7.88 \pm 0.11^{B}$	$7.73 \pm 0.17^{\mathrm{B}}$
Línea*estatus			
Asintomático.CRE	$6.97 \pm 0.33^{A}$	$6.91 \pm 0.19^{B}$	$7.12\pm0.20^{AB}$
Asintomático.RES	$6.33 \pm 0.31^{A}$	$6.36 \pm 0.18^{\mathrm{B}}$	$6.60 \pm 0.24^{B}$
Moribundo. CRE	$7.42 \pm 0.30^{A}$	$7.84 \pm 0.15^{A}$	$7.77 \pm 0.24^{A}$
Moribundo.RES	$7.41 \pm 0.30^{A}$	$7.91 \pm 0.17^{A}$	$7.69 \pm 0.24^{A}$

La carga viral por gramo de tejido se presenta en logaritmo natural. Literales diferentes dentro de columna para cada efecto e interacción indican diferencias significativas.

## Evaluación de daño histológico

La técnica de análisis histopatológico ha sido utilizada frecuentemente en el diagnóstico del SMB y ha permitido visualizar los daños celulares ocasionados por el virus, la progresión de la enfermedad y su establecimiento en los principales órganos blanco (Yoganandhan *et al.*, 2003; Pantoja y Lightner, 2003; Rodríguez *et al.*, 2003). El proceso de la evaluación y la asignación de un valor numérico, al grado de severidad de la infección en un organismo infectado, arrojó valores de IHP consistentes con el resto de las variables consideradas en el estudio.

En el análisis de los resultados del IHP, para el primer y segundo tiempo de colecta, no se detectaron diferencias de acuerdo a la línea de origen. Sin embargo, en el tercer tiempo, existen diferencias significativas en el daño histopatológico provocado por la infección. Los organismos pertenecientes al grupo de resistencia presentan menor daño histopatológico que los organismos pertenecientes a la línea de crecimiento (P=0.037). Lo anterior, permite considerar la existencia

de una respuesta diferenciada ante el patógeno, siendo mejor en el grupo de resistencia. Si bien, la replicación del virus es igual entre líneas, los organismos pertenecientes al grupo de resistencia, es posible que posean mecanismos de defensa que regulen la respuesta del huésped ante la invasión y multiplicación del agente patógeno, limitando así el daño histopatológico e incrementando la probabilidad de supervivencia al final del desafío, tal como ocurrió en el presente estudio (Cuadro 4). Lo anterior, podría ser considerado consecuencia de la tolerancia de los organismos frente a la infección.

En cuanto al daño histológico registrado en individuos asintomáticos y moribundos, las diferencias de acuerdo con el estatus, son consistentes en cada uno de los tiempos de colecta. Los organismos asintomáticos presentan un menor daño tisular que los organismos moribundos (P<0.03), lo que indica que la clasificación de los organismos de acuerdo con la signología considerada, fue adecuada.

Cuadro 4. Medias mínimas cuadráticas ± error estándar para un índice de daño histopatológico en dos líneas genéticas de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus* (*Litopenaeus*) vannamei) en organismos asintomáticos y moribundos recolectados en tres diferentes tiempos

	Inicio de las	Pico de las	Al final	
	mortalidades	mortalidades	del desafío	
	(33-47 hpi)	(65-77 hpi)	(101-111 hpi)	
Línea				
Resistencia	$1.38 \pm 0.17^{A}$	$1.48 \pm 0.15^{A}$	$1.95 \pm 0.15^{A}$	
Crecimiento	$1.67 \pm 0.17^{A}$	$1.87 \pm 0.15^{A}$	$2.41 \pm 0.15^{B}$	
Estatus				
Asintomático	$1.25 \pm 0.17^{A}$	$0.96 \pm 0.16^{A}$	$1.8 \pm 0.15^{A}$	
Moribundo	$1.79 \pm 0.16^{\mathrm{B}}$	$2.39 \pm 0.14^{B}$	$2.54 \pm 0.16^{B}$	
Línea*estatus				
Asintomático.CRE	$1.64 \pm 0.25^{AB}$	$1.27 \pm 0.24^{B}$	$2.26 \pm 0.22^{A}$	
Asintomático.RES	$0.86 \pm 0.24^{B}$	$0.64 \pm 0.21^{B}$	$1.35 \pm 0.22^{\mathrm{B}}$	
Moribundo. CRE	$1.69 \pm 0.22^{AB}$	$2.47 \pm 0.19^{A}$	$2.55 \pm 0.22^{A}$	
Moribundo.RES	$1.90 \pm 0.23^{A}$	$2.31 \pm 0.20^{A}$	$2.53 \pm 0.23^{A}$	
Literales diferentes dentro de columna para cada efecto e interacción indican diferencias.				

En cuanto a la interacción línea con estatus, en el primer tiempo de colecta, las diferencias (P=0.04) entre los grupos no están claramente definidas, lo que puede estar relacionado con la variabilidad en la respuesta de los organismos al desarrollo de la infección. Para el segundo tiempo de colecta, no se detectó interacción entre estatus y línea (P=0.29) y lo individuos asintomáticos de ambas líneas tienen menor IHP que los organismos moribundos. Por último, en el tercer tiempo de colecta, los organismos moribundos no fueron diferentes entre líneas y presentan el mismo daño tisular que los organismos asintomáticos de la línea de crecimiento. Además, el daño histopatológico en los organismos asintomáticos pertenecientes a la línea de resistencia, es significativamente menor al resto de los grupos (P=0.06).

# Asociación entre la carga viral y el Índice Histopatológico

Los coeficientes de correlación entre la carga viral y el índice histopatológico, se ubican entre  $0.62 \pm 0.09 \pm 0.01$ . La carga viral podría entonces ser un indicador confiable del daño histopatológico provocado por el virus del SMB, y por ende, de la probabilidad de supervivencia del organismo ante su infección (Cuadro 5).

Cuadro 5. Correlaciones ± error estándar para dos líneas genéticas de de camarón blanco del Pacífico ( <i>Penaeus (Litopenaeus) vannamei</i> ) recolectados en tres diferentes tiempos			
	Crecimiento	Resistencia	
	CV-IHP	CV-IHP	
Inicio de las mortalidades (33- 47 hpi)	$0.79 \pm 0.05$	$0.83 \pm 0.04$	
Pico de las mortalidades (65-77 hpi )	$0.89 \pm 0.02$	$0.93 \pm 0.01$	
Al final del desafío (101-111 hpi)	$0.62 \pm 0.09$	$0.89 \pm 0.03$	
CV: Carga viral, IHP: Índice Histopatológico			

En el análisis donde se consideró al tiempo de colecta como bloque y a la carga viral como una covariable anidada en línea, se detectaron diferencias entre los intervalos de colecta, donde los organismos pertenecientes al tercer intervalo, muestran un daño histopatológico mayor (P<.0001), resultado de un incremento en el tiempo de exposición al virus (Jeswin *et al.*, 2013). Por otro lado, las diferencias entre los grupos línea/estatus, son consistentes con los resultados presentados con anterioridad, siendo los organismos asintomáticos pertenecientes a la línea de

resistencia, los que muestran menor daño histopatológico, comparado con el resto de los grupos (P<.0001) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Coeficientes de regresión IHP-CV y medias mínimas cuadráticas (± error		
estándar) para índice histopatológico en dos líneas genéticas de de camarón blanco del		
Pacífico (Penaeus (Litopenaeus) vannamei) en organismos asintomáticos y moribundos		
recolectados en tres diferentes tiempos		
Coeficientes de regresión*		
Asintomático.CRE	$0.86 \pm 0.09$	
Asintomático.RES	$0.78 \pm 0.06$	
Moribundo. CRE	$0.63 \pm 0.12$	
Moribundo.RES	$0.44 \pm 0.12$	
Línea genética/estatus ( medias mínimas cuadráticas)		
Asintomático.CRE	$1.97 \pm 0.08^{A}$	
Asintomático.RES	$1.56 \pm 0.09^{B}$	
<b>Ioribundo. CRE</b> $1.98 \pm 0.09^{A}$		
<b>Moribundo.RES</b> $2.08 \pm 0.09^{A}$		
Periodo de colecta( medias mínimas cuadrática	is)	
Inicio de las mortalidades (33- 47 hpi)	$1.71 \pm 0.07^{A}$	
Pico de las mortalidades (65-77 hpi ) $1.78 \pm 0.07^{A}$		
Al final del desafío (101-111 hpi) $2.20 \pm 0.07^{B}$		
*Coeficientes de regresión obtenidos a partir de la CV anidada dentro de línea/estatus. Literales		
diferentes dentro de columna para cada efecto e interacción indican diferencias significativas. IHP:		
índice histopatológico, CV: carga viral		

Los coeficientes de regresión obtenidos en cada uno de los grupos línea/estatus fueron de  $0.86 \pm 0.09 \text{ y } 0.78 \pm 0.06$  para organismos asintomáticos de la línea de crecimiento y resistencia respectivamente, y de  $0.63 \pm 0.12$  y  $0.44 \pm 0.12$  para los organismos moribundos, sin que no representa diferencias significativas (Cuadro 6). Lo anterior implica que sin importar el grupo al que pertenezcan, los organismos infectados requerirán de la misma cantidad de virus para incrementar el daño histopatológico que pudieran desarrollar. El daño, dependerá de la capacidad diferenciada de los organismos para reducir los daños tisulares provocados por la infección y no

de su capacidad de limitar la replicación del agente patógeno. Esto sugeriría la existencia de organismos tolerantes, que a su vez, podrían estar favoreciendo la propagación del patógeno, imponiendo cargas virales elevadas al resto de la población. Esta tolerancia, no resulta excluyente con la variación en la resistencia observada dentro de las poblaciones. Aunque la presencia de al menos uno de estos componentes incrementa la probabilidad de supervivencia; la resistencia, en conjunto con la tolerancia, proporcionarán la defensa anti patógena que reducirá la gravedad de la infección e incrementará la aptitud física de las poblaciones infectadas.

## **CONCLUSIONES**

De acuerdo con los resultados obtenidos, la resistencia al SMB podría ser medida utilizando la cuantificación del número de partículas virales en individuos *de P. vanamei* sobrevivientes a un desafío controlado, además podría ser un indicador del daño histopatológico provocado por el virus, y por ende, también ser un indicador de la probabilidad de supervivencia del organismo ante su infección.

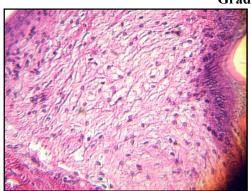
Aunque los porcentajes de supervivencia y el tiempo de muerte entre las líneas favorecen a la línea de resistencia, no existe diferencia en cuanto a sus cargas virales, lo que implica que la replicación del virus entre líneas es la misma. La superioridad en el porcentaje de supervivencia en la línea de resistencia, sería el resultado de la capacidad de respuesta de algunos individuos de la línea a la presencia del virus.

Es posible entonces considerar a la carga viral como un criterio de selección que mejore la respuesta de los PMG en la resistencia al Síndrome de Mancha Blanca, reduciendo así el riesgo y la gravedad de una infección en futuras generaciones, siempre y cuando esta variable presente componentes genéticos aditivos.

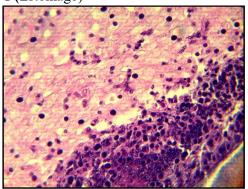
# **ANEXOS**

Órganos de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*) con grados de infección mínima y máxima. Clasificados en función de un índice histopatológico, basado en Sonnenholzner*et al.*, 2002 y Lightner 1996, recolectados durante el desafío

Grado de importancia 1 (Estómago)

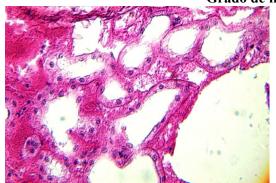


Grado de infección 0. Organismo asintomático de la línea de resistencia, recolectado a las 102 hpi, con una carga viral 26.84 x 10<sup>3</sup> (4.43 log)

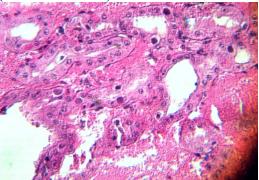


Grado de infección 4. Organismo moribundo de la línea de crecimiento, recolectado a las 73 hpi, con una carga viral 65.95 x 10 6 (7.82 log)

# Grado de importancia 2 (Glándula antenal)

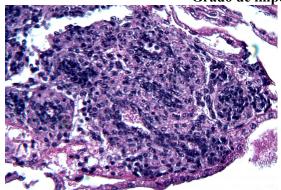


Grado de infeccion 0. Organismo asintomático de la línea de resistencia, recolectado a las 102 hpi, con una carga viral 26.84 x 10<sup>3</sup> (4.43 log)

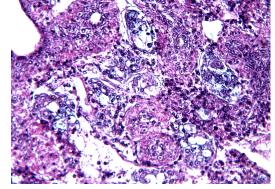


Grado de infección 2. Organismo asintomático de la línea de resistencia, recolectado a las 106 hpi, con una carga viral 21.70 x 10<sup>6</sup> (7.34 log)

# Grado de importancia 3 (Órgano linfoide)



Grado de infección 0. Organismo asintomático de la línea de resistencia, recolectado a las 68 hpi, con una carga viral 33.09 x 10<sup>5</sup> (6.52 log)



Grado de infección 3. Organismo moribundo de la línea de crecimiento, recolectado a las 68 hpi, con una carga viral  $11.97 \times 10^{7} (8.08 \log)$ 

# REFERENCIAS

- Allsopp., Johnston P., y Santillo D. (2008). La industria acuícola y de engorde: Un reto de sostenibilidad. Greenpeace Intenacional. Amsterdam, The Netherlands. p.24
- Argue B.J., Arce S.M., Lotz J.M. & Moss S.M. (2002). Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture* 204, pp. 447-460.
- Bachere E. (2000). Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191, No.1-3, pp. 3-11.
- Bartlett J.M.S. & Stirling D. (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction.
   PCR Protocols. 226: 3–6.
- Bateman K. S., Tew I.., French C., Hicks R.J., Martin P., Munro J. & Stentiford G.D. (2012). Susceptibility to infection and pathogenicity of White Spot Disease (WSD) in non-model crustacean host taxa from temperate regions. *Journal of Invertebrate Pathology*110, pp. 340–351.
- Bell T.A & Lightner D.V. (1988). A handbook of normal Penaeid shrimp histology. Special Publication of the World Aquaculture Society, Baton Rouge. Louisiana, USA.
- Briggs M., Funge S.S., Subasinghe P.R. & Phillips M.(2005). Introductions and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the Pacific. FAO. Fisheries Technical Paper, 476, pp. 1-57, 59-63, 65-71, 73-78.
- Bodin L. (2008). Criterios de selección. Lecciones que se han de sacar del pasado para nuevas perspectivas. Revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario. Vol. 2, pp. 116-126.
- Buckingham L. & Flaws M. L. (2007). Molecular Diagnostics Fundamentals, Methods, & Clinical Applications. F. A Davis Company. Philadelphia
- Caballero-Zamora A., Montaldo H.H., Campos-Montes G.R. y Castillo-Juárez H.
   Programas de mejoramiento genético para resistencia a enfermedades en camarón blanco del Pacífico. Primeras jornadas acuícolas FMVZ-UNAM. México DF.2014.
- Caballero-Zamora A., Cienfuegos-Rivas E.G., Montaldo H.H., Campos-Montes G.R, Martínez-Ortega A. & Castillo-Juárez H. (2015). Genetic parameters for spawning and

- growth traits in the Pacific white shrimp (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*). *Aquaculture Research* 46, pp. 833-839. Doi:10.1111/are.12235
- Cameron N. (1997). Selection indices and prediction of genetic merit in animal breeding.
   CAB International. London UK
- Campos M.G. (2009). Componentes de (co) varianza para características de crecimiento temprano y a los 130 días de edad en camarón blanco del Pacífico *Penaeus (Litopanaeus) vannamei* (Tesis de doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal). México DF. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Campos-Montes G.R., Montaldo H.H., Martínez O.A., Martínez J.A. & Castillo-Juárez H. (2013). Genetic parameters for growth and survival traits in Pacific white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) vannamei from a nucleus population undergoing a two-stage selection program. Aquaculture International 21,299–310
- CAMPRODUCE. Estudio de la infraestructura logistica para la exportacion del camaron blanco a algunas ciudades de Estados Unidos y Canadá. (2009). En: http://innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/1517/CAMARONICULTORES.pdf
- Castillo-Juárez H., Quintana C.J.C., Campos-Montes G., Cabrera V.C., Martínez O.A. & Montaldo H.H. (2007). Heritability for body weight at harvest size in the Pacific white shrimp, *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*, from a multi-environment experiment using univariate and multivariate animal models. *Aquaculture* 273, pp. 42-49
- Chang P.S., Chen H.C. & 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, pp. 233-242
- Chen L.L., Lo C.F, Chiu Y.L., Chang C.F., & Kou G.H., (2000). Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. *Diseases of aquatic organisms* 40 pp. 157-161.
- Cifuentes L.L., Frías M.M. y Torres G.M. (1990). El océano y sus recursos XI: Acuicultura. Secretaría de Educación Pública.
- Cock J., Gitterle T., Salazar M. & Morten R. (2009). Breeding for disease resistance of Penaeid shrimps. *Aquaculture* 286, pp. 1-11.

- Collins A., Russell B., Walls A., y Hoang T. (2005). Inland prawn farming studies in to the potential for inland marine prawn farming in Queensland. Queensland Department of Primary Industries and Fisheries (DPI&F). Australia. 79 pp.
- CONAPESCA. Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca 2016 de la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (2016). 299 pp. En: https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2016/ANUARIO\_ESTADISTICO 2016.pdf
- Cuéllar-Anjel J., Lara C., Morales V., De Gracia A. y García S.O. (2010). Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*.
- Cuéllar A.J., White N.B., Schofield P., Chamorro R. & Lightner D.V. (2012). Report of significant WSSV- resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program. *Aquaculture* 368-369, pp. 36-39.
- Dhar A.K., Roux M.M. & Klimpel K.R. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using realtime quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J ClinMicrobiol* 39, pp. 2835–2845
- Davis A., Samocha T.M. & Boyd C.E. (2004). Acclimating Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to Inland, low-salinity waters. SRAC Publication No. 2601. pp 8.
- Dorson M., Quillet E., Hollebecq M.G., Torhy C. & Chevassus B. (1995). Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Veterinary Research* 26,361-368.
- Durand S.V. & Lightner D.V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J Fish Dis* 25, pp. 381–389
- Falconer D.S., y Mackay T.F.C. (2001). Introducción a la genética cuantitativa. Acribia. p. 490.
- Flegel T.W., Boonyaratpalin S. & Withyachumnarnkul B. (1997). Progress in researchonyellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In: Flegel TW, MacRae I (eds) Diseases in Asian aquaculture 111. Asian Fisheries Soc, Manila, pp. 285-296.
- Gitterle T., Salte R., Gjerde B., Cock J., Johansen H., Salazar M., Lozano C. & Rye M. (2005). Genetic (co) variation in resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) and harvest weight in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei. Aquaculture* 246, 139-149.

- Gjedrem T. (2004). Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquaculture Research* 31, pp. 25-33.
- Hendrickx M.E. (1995). Camarones. en: Guía para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Volumen I. Plantas e invertebrados Fischer WF., Krupp W., Schneider C., Sommer KE., Carpenter y Niem VH (eds). Roma, FAO. Vol. I: 1-646 p.
- Horns F. & Hood M.E. (2012). The evolution of disease resistance and tolerance in spatially structured populations. *Ecology and Evolution*2(7):1705–1711.doi: 10.1002/ece3.290
- Houston R.D., Haley C.S., Hamilton A., Guy D.R., Tinch A.E., Taggart J.B., Mc Andrew B.J & Bishop S.C. (2008). Major quantitative trait loci afect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic Salmon (Salmosalar). Genetics 178, 1109-1115.
- Jeswin J., Anju A., Thomas P.C., Paulton M.P. & Vijayan K.K. (2013). Analysis of viral load betweendifferenttissues and rate of progression of white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research* 46, 2003-2012. DOI:10.111/are.12357
- Lightner D.V. (1996). A Handbook of Shrimp Pathologyand Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. Baton Rouge: World Aquaculture Society.
- Lightner D.V., Hasson K.W., White B.L. & Redman R.M. (1998). Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian White Spot Syndrome Virus and Asian yellow head virus. *Journal of Aquatic Animal Health* 10, pp. 271-281.
- Lightner D.V. & Redman R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164. 201-220.
- Lo C.F., Aoki T., Bonami J.R., Flegel T.W., Leu J.H., Lightner D.V., Stentiford G., Söderhäll K., Walker P.W., Wang H.C., Xun X., Yang F. & Vlak J.M. (2012).
   Nimaviridae. Pp. 229-234. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, King A. M. Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, & E. J. Lefkowitz (eds.) El sevier Academic Press, San Diego, CA. USA.
- Lo C.F., Ho C.H., Chen C.H., Liu Y.L., Yeh P.Y., Peng S.F, Hus H.C., Chang C.F., Su M.S., Wang C.H & Kou G.H. (1997). Detection and tissue tropism of white spot

- syndrome baculovirus (WSBV) captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 30: 53-72.
- Lo C.F., Ho C.H., Peng S.E., Chen C.H., Hus H.C., Chiu Y.L., Chang C.F., Liu K.F., Su M.S., Wang C.H. & Kou G.H. (1996). White spot Syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27: 215-225.
- Lo C.F., Peng S.E. & Kou C.H. (1998). PCR Screening for White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus monodon* Brooders: a General Effort to combat shrimp WSS. syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 35: 63-69.
- Lotz J. M. & Soto A. (2002). Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in Litopenaeus vannamei. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50:199–209.
- Martin G.G. & Hose J.E. (2010). Functional anatomy of Penaeid Shrimp. En Alday- Sanz
   V. The shrimp book. pp. 47-67. Nottingham University Press.
- Martínez-Córdova L.R., Martínez M y Cortés-Jacinto E. (2009). Camaronicultura Mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante? *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. Vol. 25, pp. 181-196.
- Maldonado M., Rodríguez J. y Blas I. (2004). El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *Aquatic*. 21: pp.78-91 En: http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/21 10.pdf
- Morales U.K. Evaluación de un extensor para el esperma del camarón blanco del Pacífico
   *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* para su almacenamiento a corto plazo (Tesis para
   obtener el grado de maestra en Ciencias). México DF. Universidad Nacional Autónoma
   de México, 2009.
- Moss S.M., Moss D.R., Arce S.M., Lightner D.V., & Lotz J.M. (2012). The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in Penaeid shrimp aquaculture. *Journal of Invertebrate Pathology*; 110(2):247-50. DOI: 10.1016/j.jip.2012.01.013.
- Nunan L., Lightner D., Pantoja C. & Gómez J.S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in México. *Diseases of Aquatic Organisms*. Vol. 111(1), pp. 81-86.

- Odegard J., Kettunen Praebel A. & Sommer A.I. (2010) Heritability of resistance to viral nervous necrosis in Atlantic cod (*Gadusmorhua L.*). Aquaculture 300, 59–64.
- Odegard J., Baranski M., Gjerde B. & Gjedrem T. (2011). Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture especies: challenges and future prospects.
   AquacultureResearch42, pp. 103-114. DOI: 10.1111/j.1365-2109. 2010.02669.x
- Otta S.K., Shubha G., Joseph B., Chakraborty A., Karunasagar I. & Karunasagar I. (1999). Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus in cultured and wild crustaceans in India. *Diseases of Aquatic Organisms* 38, 67-70.
- Pantoja C.R., & Lighner D.V. (2003). Similarity between the histopathology of White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Syndrome Virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. *Aquaculture*, 218: 47-54.
- Ponzoni R.W., Nguyen N.H., Khaw H.L. (2007): Investmentappraisal of genetic improvement programs in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*269, 187–199
- Roch P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, pp. 125-145
- Rodríguez J., Bayot B., Amano Y., Panchana F., I. de Blas, Alday V. & Calderón J. (2003). White spot syndrome virus infection in cultured Penaeus vannamei (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultra structure. *Journal of Fish Diseases* 26, 439-450
- Sánchez A. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern Review Article Vet. Res. Vol. 41:43. DOI: 10.1051/vetres/2010015V
- Satoh J., Nishizawa T. & Yoshimizu M. (2008). Protection against white spot syndrome virus (WSSV) infection in kuruma shrimp orally vaccinated with WSSV rVP26 and rVP28. *Diseases of Aquatic Organisms*82:pp. 89–96.
- Shekhar M.S., Gomathi A., Dubey N.K., Vinaya Kumar K. & Vijayan K.K. (2017). Effect of immune gene silencing in WSSV infected tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish and SellfishImmunology*70, 252-259.
- Sonnenholzner S., Rodríguez J., Pérez F., Betancourt I., Echeverría F., y Calderón J. (2002) Supervivencia y respuesta inmune de camarones juveniles *L. vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. Boletín el mundo acuícola 8(1), 50-56.

- Supamattaya K., Hoffmann R.W., Boonyaratpalin S., & Kanchanaphum P. (1998). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mudcrab *Seylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Diseases of Aquatic Organisms* 32, 79-85.
- Tan L.T., Soon S., Lee K.L., Shariff M., Hassan M.D. & Omar AR. (2001). Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* (Fabricius) using competitive polymerase chain reaction. J Fish Dis 24:315–323
- Tang K.F.J. & Lightner D.V. (2000). Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture* 189, 11-21
- Tang K.F.J. & Lightner D.V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR.
   Diseases of AquaticOrganisms44, 79-85.
- Thodesen J. & Gjedrem T. (2006). Breeding programs on Atlantic salmon in Norway: lessons learned. In: Development of Aquatic Animal Genetic Improvement and Dissemination Programs: Current Status and Action Plans (ed. By RW Ponzoni, BO Acosta y AG Ponniah), pp.22-26. World Fish Center, Penang, Malaysia.
- Valdez G., Díaz F., Re A. D. y Sierra E. (2008). Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Hidrobiológica* 18 (2), pp. 105-115.
- Wang C.S., Tang K.F.J., Kou G.H., Chen S.N. (1997). Light and electron microscopic evidence of white spot disease in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), and the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate), cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases* 20, 323-331.
- Yáñez J.M. y Martínez V. (2010). Factores genéticos que inciden en la resistencia a enfermedades infecciosas en salmónidos y su aplicación en programas de mejoramiento. Arch. Med. Vet. 42. pp.1-13.
- Yoganandhan K., Sathish S., Murugan V., Narayanan R.B. & Saúl Hameed A.S. (2003).
   Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by hostopathology and PCR techniques. *Aquaculture*, 215: 21-29. Yong-Chung H., Zhi-Yin Y., Hua-Shu A., Xian-De H., Se-Doing L., Shao-Ping W. & Jian-Guo H. (2011).

Characterization of WSSV resistance in selected families of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 311, pp. 54-60