

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**  
**CENTRO NACIONAL DE ACUICULTURA E INVESTIGACIONES MARINAS**



**Tema de Investigación**

Efecto de la temperatura sobre la susceptibilidad del camarón blanco  
*Penaeus vannamei* a *Vibrio parahaemolyticus*.

**Materia de Graduación:** Diseño Acuícola

**Profesor:** Ph.D. Marco Álvarez Gálvez

**Nombre del estudiante:** Rosa Mariuxi Rivera Altamirano

**Universidad:** Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

**Facultad:** Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas,  
Oceánicas y Recursos Naturales

**Carrera:** Acuicultura

# Efecto de la temperatura sobre la susceptibilidad del camarón blanco *Penaeus vannamei* a *Vibrio parahaemolyticus*

Rivera, R.<sup>1</sup>, Domínguez, C.<sup>2</sup>, Rodríguez, J. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales, FIMCBOR, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P. O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

<sup>2</sup> Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P. O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

## Resumen

La enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND), ha provocado pérdidas significativas en la producción de camarón durante la última década. Estudios anteriores han demostrado que las altas temperaturas reducen la respuesta inmune del camarón, aumentando su sensibilidad a cepas patógenas de Vibrios. En el presente estudio, se investigó si la temperatura empleada en los centros de larvicultura del Ecuador, influye en la supervivencia del camarón *P. vannamei*, tras ser desafiado experimentalmente con *V. parahaemolyticus*. Los camarones fueron cultivados a tres niveles de temperatura 27, 31 y 33°C a condiciones estándar. Para determinar la susceptibilidad de las larvas a la cepa patógena se realizaron dos bioensayos en estadios mysis y postlarva a concentración de  $1.5 \times 10^5$  y  $10^6$  UFC/ml, respectivamente. Los camarones muertos fueron removidos cada 4 horas para evitar reinfección. En el bioensayo con mysis III, se registró supervivencia del 100 % para las larvas cultivada a 27 y 31 °C. En contraste, con las larvas cultivadas a 33°C la mortalidad fue del 100 %, tras 6 horas de ser desafiados. En el bioensayo con postlarvas, las supervivencias fueron 75, 80 y 30 %, luego de 24 horas infectados, para las larvas cultivadas a 27, 31 y 33 °C, respectivamente. Esta investigación sustenta que las altas temperaturas de 33°C empleadas en las larvicultura del Ecuador, disminuye la resistencia a la infección con *V. parahaemolyticus*.

**Palabras claves:** *Penaeus vannamei*, camarón, *Vibrio parahaemolyticus*, Temperatura, Enfermedad aguda de necrosis hepatopancreática, AHPND.

## Abstract

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) has caused the same thing to happen as the production of shrimp during the last decade. Previous studies have shown that higher temperatures reduce the immune response of shrimp, increase the sensitivity to the pathogenic strains of Vibrios. In the present study, the temperature used in the centers of larviculture of Ecuador was investigated, it influenced the survival of shrimp *P. vannamei*, after being experimentally experimented with *V. parahaemolyticus*. The shrimp were cultivated at three temperature levels 27, 31 and 33°C at standard conditions. To determine the susceptibility of the larvae to the pathogenic strain, two bioassays were carried out in mysis and postlarva stages at a concentration of  $1.5 \times 10^5$  and  $10^6$  CFU / ml, respectively. The shrimp were eliminated every 4 hours to avoid reinfection. In the bioassay with mysis III, 100% survival was recorded for the larvae cultured at 27 and 31 ° C. In contrast, with the larvae grown at 33 ° C the mortality was

100%, after 6 hours of being challenged. In the bioassay with postlarvae, the survivals were 75, 80 and 30%, after 24 hours infected, for the larvae grown at 27, 31 and 33 ° C, respectively. This research supports the high temperatures of 33 ° C used in the larviculture of Ecuador, decreases the resistance to infection with *V. parahaemolyticus*.

**Keywords:** *Penaeus vannamei*, shrimp, *Vibrio parahaemolyticus*, Temperature, Enfermedad aguda de necrosis hepatopancreática, AHPND.

## 1. Introducción

Condiciones estresantes en el cultivo de camarón, tales como, contaminación del agua y desequilibrio de la flora bacteriana, influyen en la resistencia inmune de *P. vannamei* a infecciones virales y bacterianas durante el cultivo [1]. Las bacterias que generalmente afectan al cultivo de camarón son las del género *Vibrio*. La propagación de Vibrios en el cultivo de *P. vannamei* tiene un efecto directo sobre el crecimiento y la supervivencia, mermando la producción mundial de camarón [2- 8]. Una de las Vibriosis emergentes en el cultivo de camarón es la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés). AHPND ha ocasionado pérdidas económicas significativas entre los productores de camarón de China (2009), Vietnam (2010), Malasia (2011), Tailandia (2011 y 2012) y México (2014) [4- 7- 8- 18]. El agente causal de AHPND es una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* [3,5]. Las especies de camarones que por ahora se han caracterizado como susceptibles a la infección natural o experimental por la bacteria causante de AHPND, son el camarón tigre gigante *Penaeus monodon* y el camarón blanco *P. vannamei* [18-7].

Cualquier enfermedad incluyendo la AHPND es el resultado final de interacciones complejas entre huésped, patógeno y medio ambiente [17]. En este contexto, la temperatura del agua es uno de los factores más importantes para el cultivo de camarón ya que interviene en el metabolismo, el consumo de oxígeno, la tasa de alimentación, el crecimiento, muda, supervivencia y tolerancia a metabolitos tóxicos [10]. Para el cultivo de *P. vannamei*, la temperatura del agua debe estar entre 20 y 32°C, siendo el óptimo entre 22 y 30°C [15]. El límite de temperatura letal superior para los peneidos juveniles es de 34 a 36 ° C [10]. Los rangos estacionales de la temperatura del agua en las granjas camaroneras pueden ocasionar estrés debilitando la resistencia inmune de *P. vannamei* [13].

Se conoce que la transferencia de camarones a temperaturas superiores a la óptima reduce la capacidad inmune y la resistencia a infecciones por *Vibrios* [15]. Sin embargo, en Ecuador las larviculturas se realizan a temperaturas superiores a 32°C. Actualmente se carece de investigaciones que permitan conocer la influencia térmica antes y después de la exposición de *P. vannamei* a la infección con *V. parahaemolyticus*. Por tal motivo, el presente estudio tiene como objetivo, determinar el efecto de la temperatura usada en la larvicultura sobre la resistencia a un vibrio altamente patógeno.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Animales experimentales y condiciones de cultivo**

Nauplios de *P. vannamei* se obtuvieron de una maduración comercial de la Península de Santa Elena y fueron trasladados al Set experimental 3 del departamento de larvicultura del CENAIM. Los nauplios fueron cultivados a tres temperaturas experimentales (27, 31 y 33 °C), cada rango de Temperatura representaba un tratamiento y constaba de cuatro replicas. Las unidades experimentales estuvieron constituidas por tanques cilindro-cónicos de fibra de vidrio de 50 L. de capacidad. Para el manejo de la salud de las larvas antes de la siembra se desinfectaron los nauplios con un producto, siguiendo las instrucciones del técnico de laboratorio (no publicado). En los tanques se utilizó un fondo de probióticos con Ili y P64 a las concentraciones de  $10^2$  y  $10^3$  UFC/ ml respectivamente. Se usó agua de mar filtrada y esterilizada por UV. Durante el cultivo se estimó el porcentaje de supervivencia diaria y el desarrollo larval en cada tanque.

### **2.2 Viabilización de la cepa bacteriana**

Se utilizó una cepa bacteriana de *V. parahaemolyticus* obtenida del cepario del laboratorio de Microbiología de CENAIM-ESPOL. La activación y crecimiento de la cepa se realizó en medio de cultivo microbiológico Tryptic Soy Agar con 2% de cloruro de sodio (TSA 20), mediante siembra por agotamiento, e incubadas por 18 horas a temperatura de 28 °C, luego se transfirió de forma individual colonias a medio de cultivo fresco Tryptic Soy Broth con 20 g/L de cloruro de sodio (TSB20) previamente esterilizado. Después de cuatro horas de incubación, se monitoreo cada hora la densidad bacteriana (DO 620) empleando un espectrofotómetro (Varioskan Lux multimode microplate reader, thermo Fisher Scientific), hasta obtener una densidad (DO620 ~ 0.44), equivalente a una concentración bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml. Paralelamente, se sembró una alícuota en placas (TSA 20) del inóculo ajustado  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml a fin de corroborar (UFC/ml) para el inóculo empleado.

### **2.3 Desafío de inmersión con *V. parahaemolyticus***

Las pruebas de desafío fueron llevadas a cabo en placas de seis pocillos, de capacidad de 10 ml por pocillo. Cada tratamiento tuvo seis réplicas, y en cada unidad experimental se sembraron 10 larvas. Se utilizaron larvas mysis III y postlarvas. El inóculo bacteriano de *V. parahaemolyticus* se ajustó (DO620 ~ 0.44), simulando una concentración bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml. A partir de este inóculo bacteriano se realizaron tres diluciones seriadas en solución salina (2% de ClNa), obteniéndose un inóculo de  $1.5 \times 10^5$  UFC/ml. Los animales experimentales, fueron cuantificados y depositados en las placas con agua de mar filtrada y esterilizada por UV. El inóculo bacteriano fue dispensado con pipetas automáticas en cada unidad experimental, además se incluyó un grupo control negativo no desafiado con *V. parahaemolyticus*. Se realizaron observaciones periódicas para cuantificar el número de animales vivos.

En los análisis microbiológicos se determinaron Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) de bacterias totales (Agar Marino, AM), Bacterias (ILI) (Trypticase™ Soy Agar, TSA), Vibrios totales (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa, TCBS) en diluciones sucesivas realizadas a las muestras analizadas.

### 3. Resultados

#### 3.1 Supervivencia de larvas de *P. vannamei* a distintas temperaturas durante la fase de larvicultura.

Los camarones mostraron una baja supervivencia acumulada durante la larvicultura. La supervivencia acumulada fue inferior a 25 %. El porcentaje de supervivencia registrado a los 31 °C fue 18 %, seguido de 33 y 27 °C, con 15 % en cada tratamiento térmico (Gráfico 1).

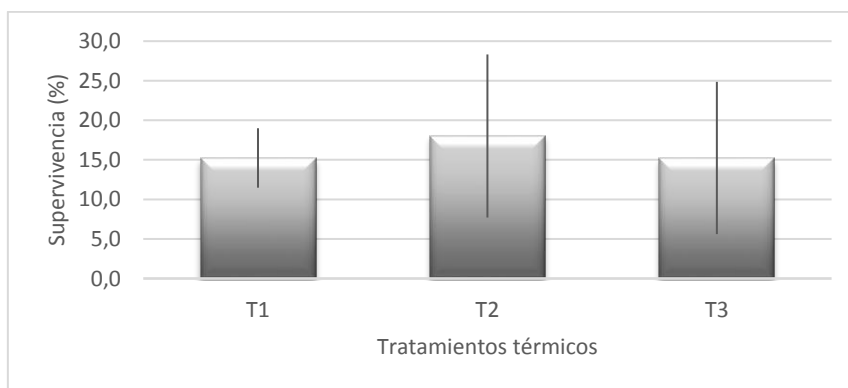


Gráfico 1. Supervivencia de Larvas de *P. vannamei* cultivadas a distintas temperaturas

#### 3.2 Análisis Microbiológico y molecular de larvas

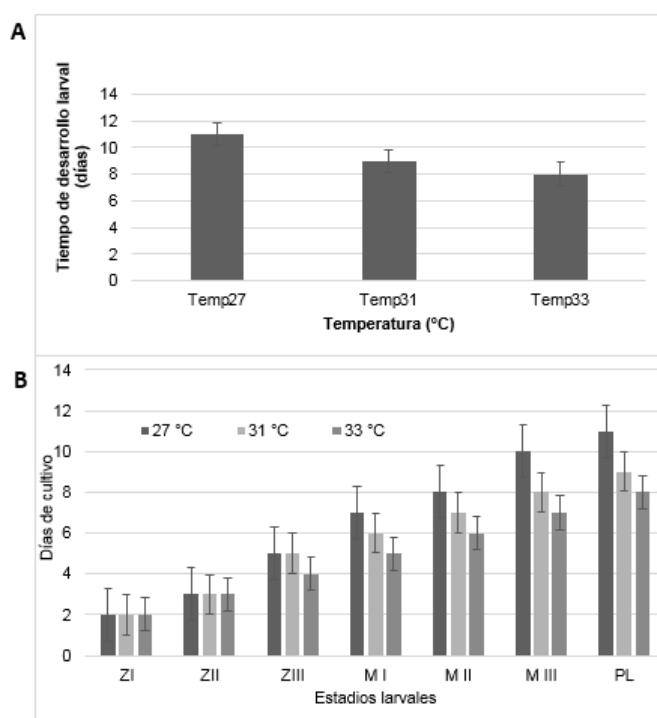
Como se puede observar en la Tabla 1, la presencia de vibriosis afectó la supervivencia de larvaria. La infección fue ocasionada debido a que el manejo de salud en la larvicultura no se realizó de forma convencional, también se atribuye a que los tratamientos térmicos a los que fueron sometidos los animales estaban por encima (33°C) y por debajo (27°C) del rango óptimo. Las colonias Luminiscentes se cuantificaron a partir del estadio larval mysis III.

#### 3.3 Efecto de la Temperatura sobre el desarrollo larval

El tiempo de desarrollo larval disminuyó con las mayores temperaturas del agua, mostrando diferencias entre los tres tratamientos de cultivo. El tiempo de desarrollo completo a 27 °C fue un promedio de 22.6% mayor que a 31 y 33 °C. Analizando el tiempo de desarrollo de cada estadio larval, a 27°C la etapa de menor duración fueron el estadio zoea I y mysis III, mientras que la etapa más larga correspondió al estadio zoea III. Para las larvas cultivadas a 31°C, el estadio más largo fue la etapa zoea II. Mientras que en el cultivo a 33°C el desarrollo se dio sin diferencias entre estadios (Gráfico 2).

**TABLA 1.** Colonias bacterianas presentes en muestras analizadas.

Muestreo	Descripción de la muestra	Cuantificación de Microorganismos						
		Agar Marino		Agar TSA	Agar TCBS			
		Bacterias totales	Bacterias totales (colonias luminiscentes)	Bacterias (ILI)	Vibrios totales	Vibrios (Colonias verdes)	Vibrios (Colonias amarillas)	Vibrios (Colonias luminiscentes)
1	Z <sub>3</sub> T # 1	1,65E+08	-	N / A	1,50E+04	-	1,50E+04	-
	Z <sub>3</sub> T # 2	1,98E+08	-	N / A	3,35E+04	-	3,35E+04	-
	Z <sub>3</sub> T # 3	1,03E+08	-	N / A	2,65E+04	-	2,65E+04	-
2	M <sub>3</sub> T # 1	4,30E+08	1,00E+04	4,00E+04	5,20E+03	2,00E+03	3,20E+03	1,00E+03
	M <sub>3</sub> T # 2	2,07E+08	3,60E+07	1,80E+05	3,63E+04	3,45E+04	1,75E+03	3,00E+04
	M <sub>3</sub> T # 3	1,62E+08	-	2,60E+05	2,30E+04	5,50E+03	1,75E+04	3,00E+03
3	PL <sub>2</sub> T # 1	5,91E+08	1,50E+05	2,10E+06	6,85E+04	2,46E+04	4,39E+04	3,10E+04
	PL <sub>2</sub> T # 2	7,36E+08	5,00E+05	2,07E+06	8,17E+04	3,82E+04	4,35E+04	3,50E+04
	PL <sub>2</sub> T # 3	2,17E+08	3,50E+04	3,10E+06	6,45E+04	3,10E+04	3,35E+04	1,75E+03
4	PL <sub>5</sub> T # 1	2,46E+08	1,60E+05	4,80E+05	2,60E+05	3,55E+04	2,24E+05	4,58E+04
	PL <sub>5</sub> T # 2	2,20E+08	5,45E+05	1,60E+06	9,75E+04	3,60E+04	6,15E+04	4,50E+04
	PL <sub>5</sub> T # 3	1,69E+08	1,00E+04	2,40E+05	2,23E+05	4,18E+04	1,81E+05	1,00E+04
5	PL <sub>12</sub> T # 1	1,97E+08	2,00E+04	1,20E+06	1,48E+05	1,05E+04	1,37E+05	4,00E+03
	PL <sub>12</sub> T # 2	1,72E+08	2,15E+05	1,40E+05	5,78E+04	3,66E+04	2,11E+04	2,80E+04
	PL <sub>12</sub> T # 3	4,04E+07	-	1,10E+07	5,30E+04	2,48E+03	2,11E+04	-



**Gráfico 2.** Tiempo de desarrollo larval (A) Total y (B) por estadios, en cultivos a 27, 31 y 33 °C.

### 3.4 Efecto de la temperatura en larvicultura sobre la resistencia de larvas de *P. vannamei* a una cepa patógena de *V. parahaemolyticus*

En todas las pruebas, las larvas del control negativo tuvieron altas supervivencias. En la prueba de susceptibilidad con mysis III, los tratamientos mantenidos a Temperaturas de 27°C y 31°C, sobrevivieron todos los camarones desafiados. Por el contrario, las larvas de *P. vannamei* cultivadas a 33°, fueron altamente susceptibles a *V. parahaemolyticus*, a las 6 horas post desafío (hpd) se observó 100 % de mortalidad acumulada. (Gráfico 3). La postlarvas cultivadas a 31°C registraron el mayor porcentaje de supervivencia, con un 80 % a las 24 hpd, seguido de 75% observado a 27°C y 30 % en el tratamiento aclimatado a 33°C (Gráfico 4).

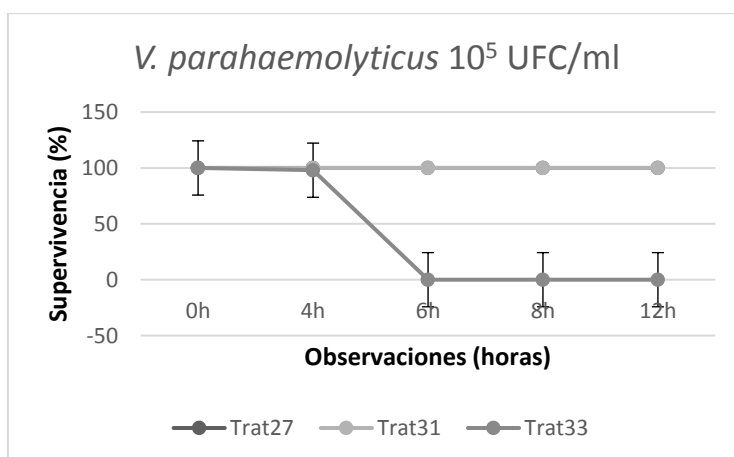


Gráfico 3. Supervivencia de larvas (mysis III) de *P. vannamei* infectadas con *V. parahaemolyticus*

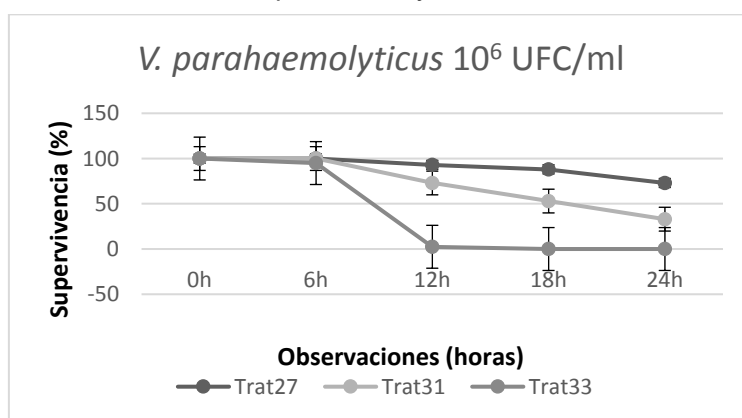


Gráfico 4. Supervivencia de postlarvas de *P. vannamei* infectadas con *V. parahaemolyticus*

### Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la temperatura del agua es un parámetro clave para la supervivencia de las larvas de camarón blanco en fases iniciales de cultivo. Otros estudios han reportado que la temperatura presenta un efecto positivo en las supervivencias de postlarvas de *L. vannamei* y *L. stylirostris* [21]. Algunos autores destacan la importancia del efecto de la temperatura en la actividad metabólica de las postlarvas de *P. vannamei* y su relación con la supervivencia [21]. En el presente estudio se cultivaron postlarvas a distintas Temperaturas (27, 31 y 33 °C). La supervivencia fue baja en todos los tratamientos. Sin embargo, es probable que el porcentaje de Supervivencia esté relacionado con la presencia de Vibriosis en los tanques, ya que la salud de las larvas no fue manejada de la misma manera que la realizada por los productores de larvas de *P. vannamei*, es decir, sin tratamientos

preventivos convencionales. En cuanto a las ventajas de la hipertermia, se observó que las larvas mantenidas a 27 °C tuvieron un crecimiento lento, llegando a postlarva a los 11 días, no así a 31 y 33 °C que terminaron la etapa metamórfica en 8 días, aunque la supervivencia fue de 18 y 15% respectivamente. Otro estudio ha señalado que las postlarvas por debajo de 20°C son prácticamente inactivas, con un nado débil y errático, no así a 35°C, donde las postlarvas se observaron muy activas sobre la columna de agua [21].

Los presentes resultados coinciden con trabajos previos, donde la temperatura influye sobre la resistencia a Vibrios. En el bioensayo con mysis III, se registraron supervivencias del 100 % para las larvas cultivada a 27 y 31 °C. En contraste, con las larvas cultivadas a 33°C la mortalidad fue del 100 %, tras 6 horas de ser desafiados. En el bioensayo con postlarvas, las supervivencias fueron 75, 80 y 30 %, luego de 24 horas infectados, para las larvas cultivadas a 27, 31 y 33 °C, respectivamente. Varios informes mencionan que la exposición de animales acuáticos a Choque térmico no letal (NLHS) puede inducir una protección contra infecciones bacterianas y virales, mediante la inducción de proteínas de choque térmico (HSPs) y posteriormente activar el sistema inmune [11, 12]. *P. vannamei* fue más susceptible a *V. alginolyticus* cuando los camarones se transfirieron a 34°C o 32°C a partir de 27°C o 28°C [15]. El camarón *P. monodon* expuesto a un estrés hipertérmico corto ha demostrado la acumulación de HSP70 y tolerancia contra el virus asociado a las branquias (GAV) [11]. Sin embargo, la NLHS de *P. vannamei* no mejoró la tolerancia frente a *V. harveyi* a pesar de la regulación significativa de HSP70. En contraste, en el caso de WSSV la influencia térmica causa una drástica reducción de las células infectadas en camarones desafiados por White spot Syndrome Virus (WSSV) cuando se mantuvieron a alta temperatura de agua reduciendo significativamente la mortalidad (0-30%) de *P. vannamei*, mientras que a temperatura óptima (27 -30 °C) desarrollaron signos característicos del WSSV y mortalidad del 100 % de la población expuesta [10]. Se debe recalcar que el estrés térmico afecta la síntesis de proteína afectando de esta manera la replicación del WSSV que depende de la maquinaria metabólica celular del hospedero. Los vibrios tienen su propio metabolismo y nuestros resultados indican que sacan provecho del estrés de las larvas de camarón para incrementar su virulencia. Es evidente además que otros factores influyan en la acción de la bacteria, como el estadio larval en el que se haga la infección ya que en este trabajo se utilizó una carga bacteriana distinta para cada estadio larval y los más jóvenes tuvieron mayor mortalidad. En el caso de mysis III cultivados a 33 °C las larvas no resistieron más de 6 horas de exposición.

## Conclusión

Se determinó que el aumento de la temperatura del agua puede desencadenar mortalidades de hasta 100% de larvas de *P. vannamei* cultivadas a 33°C e infectadas con *V. parahaemolyticus*. A temperaturas de 27 y 31 °C, las supervivencias de postlarvas fueron mayores luego de ser desafiadas. Además, la supervivencia en fase de aclimatación resultó superior (18%) en el tratamiento mantenido a 31 °C. A pesar de que la temperatura de 27°C no favorece el desarrollo larval, nuestros resultados indican un menor estrés y mayor resistencia de estas larvas con respecto a las cultivadas a 33°C. Este estudio corrobora que el estrés hipertérmico es una limitante al momento de controlar la presencia de Vibrios patógenos en la larvicultura de camarón.



## Reconocimientos

Esta investigación está contemplada en el marco del Proyecto de Investigación PIC-14-CENAIM-003 “Desarrollo e implementación de métodos de control y prevención de enfermedades en especies acuáticas de uso comercial y uso potencial en maricultura o repoblación”.

## Referencias

1. Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, J. G., Pérez-Castañeda, R., Palacios-Monzón, A., Trujillo-Rodríguez, T., y Cruz-Hernández, N. 2010. Pathogenicity and Infection Route of *Vibrio parahaemolyticus* in American White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the world aquaculture society*, 41( 3)
2. Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, J. G., Pérez-Castañeda, R., Palacios-Monzón, A., Trujillo-Rodríguez, T., y Cruz-Hernández, N. 2010. Pathogenicity and Infection Route of *Vibrio parahaemolyticus* in American White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the world aquaculture society*, 41( 3)
3. Trujillo, T., Aguirre, G., Sánchez, G. y Rabago, J. 2005. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrios sp.* en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). *Cienc. Mar* IX(27):11-18.
4. Joshi, J., Srisala, J., Truong, V.H., Chen, I.T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., et al. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 428-429, 297-302.
5. FAO, FAO/MARD. 2013. Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (Under TCP/VIE/3304).
6. De Schryver, P., Defoirdt, T., y Sorgeloos, P. 2014. Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLOS Pathog.* 10 (4), e1003919.
7. Joshi, J., Srisala, J., Truong, V.H., Chen, I.T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., et al. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 428-429, 297- 302.
8. Lai, H.C., Ng, T.H., Ando, M., Lee, C.T., Chen, I.T., Chuang, J.C., et al. 2015. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish. Shellfish Immuno*, 47, 1006-1014
9. Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohney, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K., y Lightner, D.V. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Organ*, 105, 45-55
10. Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Noble, B.L., y Tran, L.H. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia, *Glob. Aquac. Advocate* 40.
11. Rahman, M. M., Escobedo-Bonilla, C.M., Corteel, M., Dantas-Lima, J.J., Wille, M., Alday, V.,... Nauwynck, H.J. 2006. Effect of high water temperature (33°C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. 2006. Science Direct. 261 842-849
12. De la Vega, E., Hall, M.R., Degnan, B.M., y Wilson, K.J. 2006. Short-term hyperthermic treatment of *Penaeus monodon* increases expression of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of gill associated virus (GAV). *Aquaculture*, 253 82-90.

13. Junprung, W., Supungul, P., Tassanakajon, A. 2017. HSP70 and HSP90 are involved in shrimp *Penaeus vannamei* tolerance to AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* after non-lethal heat shock. *Fish & Shellfish Immunology*, 60 237-242
14. Routsias, J.G., Tzioufas, A.G. 2006. *The role of chaperone proteins in autoimmunity*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1088 52-64
15. Zhou, J., Wang, W.N., He, W.Y., Zheng, Y., Wang, L., Xin, Y. et al. 2010. Expression of HSP60 and HSP70 in White shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge, *J. Invertebr. Pathol*, 103 170-178.
16. Cheng, W., Wang, L-U., y Chen, J-C. 2005. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. *Science Direct*, 272 240-245.
17. Rahman, M. M., Corteel, M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Pensaert, M. B., Sorgeloos, P., y Nauwynck, H. J. 2007. The effect of raising water temperature to 33 °C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). *Science Direct*, 272 240-245.
18. Lightner, D.V., Redman, R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164, 201–220.
19. Cuellar- Anjel, C. 2013. Síndrome de mortalidad temprana (EMS) Enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND). *The Center for Food Security & Public Health*.
20. Cuellar- Anjel, C. 2013. *Vibriosis*. *The Center for Food Security & Public Health*.
21. Cheng, W., Hsiao, I.S., Hsu, C.H., Chen, J.C. 2004. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 235 – 243.
22. Arzola, J., Piña, P., Nieves, M., Medina, M. 2013. Supervivencia de postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* a diferentes salinidades y temperaturas. *Revista MVZ Córdoba* 18(Supl):3618-36