



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**  
**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

**“Susceptibilidad de juveniles de *Penaeus vannamei* (Bonne, 1931) a infecciones con virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) relacionado con la edad, el estadio de muda y la temperatura”**

**Tesis de Grado**  
**Previa a la obtención del título de:**

**MAGISTER EN CIENCIAS**

**Presentada por:**  
**Mervin Lilia Guevara Torres**

**Guayaquil – Ecuador**  
**2003**

**TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:**



**FUNDACIÓN CENAIM-ESPOL**



**COOPERACIÓN TÉCNICA BELGA**



**UNIVERSIDAD DE GANTE  
BÉLGICA**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE LOVAINA – BÉLGICA**

## VITA

Mervin Lilia Guevara Torres hija de Mercedes Torres Valencia y Segundo Guevara Rodríguez, nació el 5 de mayo de 1976 en la ciudad de Tumbes- Perú. Graduada como Ingeniero Pesquero en la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes en abril del año 2001. Se incorporó en septiembre del 2001 al Programa de Maestría en Acuicultura Marina organizado por la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar de la Escuela Superior Politécnica del Litoral del Ecuador.

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

---

**Mervin L. Guevara Torres**

**TRIBUNAL DE TESIS**

---

**Eduardo Cervantes, Ing.**  
**Presidente del Tribunal**

---

**Julia Nieto, Ph.D.**  
**Director de Tesis**

---

**Bonny Bayot, M.Sc**  
**Miembro del Tribunal**

---

**Jenny Rodríguez, Ph.D.**  
**Miembro del Tribunal**

---

**Stanislaus Sonnenholzner, Ph.D.**

**Miembro del Tribunal**

## AGRADECIMIENTOS

- ✍ A Jehová por acompañarme siempre.
- ✍ A mis padres Segundo Guevara y Mercedes Torres, por su fe y cariño constante; a mis hermanas Yolka y Magali y a Luis por estar siempre presente.
- ✍ A Laurence Massaut (Ph.D.) por darme la oportunidad de ser incluida en el Programa de Maestría y por la disposición constante durante la misma.
- ✍ A Julia Nieto (Ph.D.) por su asesoría en la preparación de esta tesis.
- ✍ A Ignacio de Blass (Ph.D.) por su incomparable apoyo para la culminación de esta tesis, por su amistad, su tiempo y por todo lo aprendido.
- ✍ A Bonny Bayot y a su linda familia por hacerme sentir como en casa.
- ✍ A mi gran amiga Ing. Enedia Vieyra, sin ud. nada hubiera podido ser realidad.
- ✍ Al equipo de investigadores y técnicos de la Fundación CENAIM-ESPOL por compartir sus conocimientos en cada clase.
- ✍ Al CSA por la cuantificación del inóculo viral para los experimentos. A José Melena por la preparación del mismo y por acceder a todas mis consultas.
- ✍ A Andrés Pedrazoli por su apoyo, Fanny Panchana por su colaboración en histología., a Cecilia por ayudame con tantos papers, a Victor Granados, Julio Yagual y Eduardo Zambrano por su ayuda con la larvicultura y con “el caldero”
- ✍ A M-III: Ma. Fernanda Calderón, Mónica Reyes, Ma. Elena Sócola, Marita Monserrate, Ma. Elena Quevedo, René Rodríguez, Galo Solano, Yuri Espinosa, Robin Casalla y William Gualteros, por los momentos compartidos.
- ✍ A mis amiguitos de pregrado Jackelin, Wilo, Luis, María, José Luis, Jovanotti y Yordan, por hacer la vida más agradable en el CENAIM.
- ✍ A mi super amiga Marcia Pacheco por TODO.
- ✍ A María Fernanda y a Mónica por estar siempre conmigo aún a la distancia.
- ✍ A Adriana, Sara, Anita, Ivan, Edgar, Sonia y Roxana por estar en el momento oportuno.

*La vida no es un pasillo recto y fácil  
Por el que viajamos libres y sin obstáculos,  
Si no un laberinto de pasajes  
en el que debemos hallar nuestro camino,  
perdidos y confundidos, una y otra vez  
atrapados en un callejón sin salida.*

*Pero, si tenemos fé,  
Dios siempre nos abrirá una puerta  
que aunque tal vez no sea  
la que queríamos,  
al final será  
buena para nosotros.*

A.J. CRONIN

*Con Amor*

*A Brenda, Alberth, Tavata...  
y a ti ser especial por ser el mayor impulso  
para concluir con este trabajo*

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABLAS .....	x
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Impacto de los virus sobre la industria del camarón .....	3
2.2. El Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV:White Spot Syndrome Virus).. .....	5
2.3. Muda .....	11
3. MATERIALES Y METODOS .....	14
3.1. Sistema experimental .....	14
3.2. Hipótesis de trabajo.....	23
3.3. Diseño experimental .....	14
3.4. Material Biológico .....	24
3.5. Preparación del inóculo viral .....	15
3.6. Experimento: desafío con wssv y evaluación de la supervivencia. ....	26
3.7. Codificación de datos: variables del estudio.....	16
3.8. Análisis estadístico.....	16
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Analisis de datos al día 7 .....	36
4.2. Analisis de datos al día 15 .....	46
5. DISCUSIÓN .....	57
6. CONCLUSIONES .....	68
7. RECOMENDACIONES.....	69
8. BIBLIOGRAFÍA .....	44

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Efecto de las enfermedades en las exportaciones de camarón en Ecuador 1979 – 2000. Tomado de: CNA, 2003.....	7
Figura 2:	Manchas blancas en caparazón característica de camarones infectados con WSSV. a. <i>Penaeus vannamei</i> (Bonne,1931). b. <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (Pramod <i>et al.</i> , 2002).....	9
Figura 3:	(a). Microfotografía electrónica del virus del WSSV. (b) nucleocápside de WSSV (escala barra, 185nm) (Zhang <i>et al.</i> , 2001) (c) Sección histológica de células estomacales de un juvenil de <i>Penaeus chinensis</i> infectado con WSSV, cuerpo de inclusión intranuclear prominente (Lightner, 1996). (d) Sección de branquias de juvenil de <i>P. chinensis</i> infectado con WSSV, células infectadas muestran cuerpos de inclusión intranuclear (Lightner, 1996).....	11
Figura 4:	Estadíos del ciclo de muda identificado por la sucesión de cambios ocurridos en las setas de urópodos de adultos de <i>Penaeus setiferus</i> y <i>Penaeus stylirostris</i> (Robertson <i>et al.</i> , 1987).....	20
Figura 5:	Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para animales infectados con WSSV a 3 y 4 meses de edad y estratificado por temperatura (27 y 33°C)...	39
Figura 6:	Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para animales infectados con WSSV a 3 y 4 meses de edad y estratificado por estadio de muda (AB, C, D <sub>0</sub> , D <sub>1-2-3</sub> ).....	41
Figura 7:	Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en animales de 3 meses infectados con WSSV a 27 y 33°C y estratificado por estadio de muda (AB,C, D <sub>0</sub> , D <sub>1-2-3</sub> ).....	43
Figura 8:	Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para animales infectados con WSSV en 3 y 4 meses, estratificado por temperatura.....	49
Figura 9:	Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para animales infectados con WSSV en dos edades (3 y 4 meses) estratificados por estadio de muda (AB,C, D <sub>0</sub> , D <sub>1-2-3</sub> ).....	51
Figura 10:	Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para animales infectados con WSSV en diferentes estadios de muda (AB,C, D <sub>0</sub> , D <sub>1-2-3</sub> ) y estratificado por temperatura.....	54

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1:	Modelo de regresión logística de Cox que explica la contribución de las variables temperatura, edad y desafío a la variabilidad de la supervivencia a los 7 días p.i. Nivel de referencia animales no desafiados con WSSV a 33°C y 4 meses de edad .....	36
Tabla 2:	Tabla de contingencia para cada estrato de temperatura en ambas edades residuos normalizados y significancia estadística. A 7 días p.i.....	37
Tabla 3:	Riesgos relativos de mortalidad, para la variable edad y estratificados por temperatura. Los animales de 3 y 4 meses han sido colocados como grupo expuesto y no expuesto respectivamente.....	38
Tabla 4:	Tabla de contingencia para animales infectados con WSSV en 3 y 4 meses de edad y estratificado según el estadio de muda. Resultados a los 7 días p.i.....	39
Tabla 5:	Riesgos relativos de muerte para la variable edad, estratificado por estadio de muda. Los animales infectados a 3 meses han sido colocados como grupo expuesto y el grupo de 4 meses como no expuesto.....	40
Tabla 6:	Tabla de contingencia. Residuos normalizados y significancia estadística de animales infectados a 27 y 33°C . Resultados a 7 días p.i.....	41
Tabla 7:	Riesgos relativos para la temperatura estratificado por estadio de muda en los grupos de edad de 3 y 4 meses. Los animales infectados a 27 y 33°C han sido fijados como grupo expuesto y no expuesto respectivamente.....	42
Tabla 8:	Tabla de contingencia en función de la muda en el momento de la infección, estratificado por temperatura y edad. Resultados a 7 días p.i.....	44
Tabla 9:	Porcentaje de supervivencia, residuos normalizados y significancia estadística para los animales en estadios de muda (AB, D <sub>0</sub> y D <sub>1-2-3</sub> ) agrupados y estratificados según la edad.....	44
Tabla 10:	Modelo de regresión logística de Cox que explica la contribución de las variables temperatura, muda y edad sobre la variabilidad de la supervivencia. A los 7 días p.i. Los niveles de los factores base son temperatura de 27°C, edad de 3 meses y estadio de muda D <sub>123</sub> .....	45
Tabla 11:	Modelo de regresión logística de Cox que explica la contribución de las variables temperatura, edad y desafío a la variabilidad de la supervivencia a los 15 días p.i. Nivel de referencia, animales no desafiados con WSSV.....	46
Tabla 12:	Tabla de contingencia para cada estrato de temperatura. en ambas edades, residuos normalizados y significancia estadística. A 15 días p.i. ....	47
Tabla 13:	Riesgos relativos de muerte, para la variable edad, estratificados por temperatura . Los animales de 3 meses han sido colocados como el grupo expuesto y los de 4 meses el grupo no expuesto. ....	48
Tabla 14:	Tabla de contingencia para animales infectados con WSSV en 3 y 4 meses de edad y estratificado según el estadio de muda. Resultados a los 15 días p.i.....	49
Tabla 15:	Riesgos relativos de muerte para la variable edad y estratificado por estadio de muda. Los animales de 3 meses han sido colocados como grupo expuesto y el grupo de 4 meses como no expuesto.....	49
Tabla 16:	Tabla de contingencia. Residuos normalizados y significancia estadística de animales infectados a 27 y 33°C . La tabla está estratificada por estadios de muda. Resultados a 15 días p.i.....	51

Tabla 17:	Riesgos relativos para la temperatura (grupo expuesto 27°C) estratificado por estadio de muda en los grupos de edad de 3 y 4 meses.....	52
Tabla 18:	Tabla de contingencia en función de la muda en el momento de la infección, estratificado por temperatura y edad. Resultados a 15 días p.i.....	54
Tabla 19:	Porcentaje de supervivencia, residuos normalizados y significancia estadística para los animales en estadio de muda (AB, D <sub>0</sub> y D <sub>1-2-3</sub> ) agrupados y estratificados según la edad.....	54
Tabla 20:	Riesgos relativos de muerte para el grupo de muda estratificado por edad, siendo el grupo expuesto los animales infectados en los estadios de muda AB, D <sub>0</sub> , D <sub>1-2-3</sub> y el grupo no expuesto animales infectados en intermuda C.....	55
Tabla 21:	Modelo de regresión logística de Cox. que explica la contribución de las variables temperatura, muda y edad sobre la variabilidad de la supervivencia. A los 15 días p.i. Los niveles de los factores base son temperatura de 27°C, edad de 3 meses y estadio de muda D <sub>123</sub> .....	56

## RESUMEN

En este trabajo se estudió la influencia de tres potenciales factores de riesgo: edad, estadio de muda y temperatura que estarían influenciando sobre la susceptibilidad de camarones *Penaeus vannamei* frente a la infección del virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV por sus siglas en inglés). El objetivo fué probar si dichas variables (temperatura, edad y estadio de muda) por sí solas o combinadas están asociadas a la supervivencia luego de la infección por WSSV.

Se realizaron desafíos con WSSV por inmersión a camarones, en dos edades diferentes (3 y 4 meses), a dos temperaturas de agua (27 y 33°C) y en cuatro estadios de muda (AB, C, D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub>). Los animales se distribuyeron de manera individual en frascos de vidrio (3 L) para evitar reinfección por cohabitación. Los experimentos tuvieron una duración de 15 días en los cuales se observó la frecuencia de muda y el tiempo de supervivencia de los camarones. Al séptimo día del experimento se bajó la temperatura del grupo mantenido a 33°C hasta 27°C y se realizó un corte de pleópodos a todos los animales.

Los resultados mostraron una mayor supervivencia de los camarones de 3 meses comparado con los de 4 meses ( $p < 0.05$ ), indiferentemente de la temperatura y el estadio de muda en el que fueron infectados, esto podría explicarse en términos de talla y muda sugiriéndose que los animales más pequeños están menos expuestos a la entrada de virus por que el periodo entre muda y muda es más corto que en animales más grandes. Adicionalmente, dentro del grupo de camarones de 3 meses la mayor supervivencia fue obtenida en el grupo mantenido a 33°C. Se encontró que los estadios de muda AB, D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub> son un factor de riesgo en la infección a ambas temperaturas comparados con el estadio de intermuda (C), una de las características de este estadio de muda es que el sistema inmune de los camarones se encuentra repartido de manera homogénea en todos los órganos del cuerpo a diferencia de los estadios AB, D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub> en los que el sistema inmune se encontraría “distruido”.

Se puede concluir que la edad de 3 meses es determinante en la supervivencia de los camarones y que la temperatura de 33°C mejora la capacidad de los camarones de hacer frente a las infecciones por WSSV.

## ABSTRACT

In this work the influence of three potential risk factors are studied: age, molt stage and temperature maybe influencing the susceptibility of shrimp *Penaeus vannamei* when infected with of the virus White Spot (WSSV). The objective was to demonstrate if variables of temperature, age and stage of molt (individually or combined) were associated to the survival after infections with WSV.

Challenges with WSSV by shrimp immersion were made, at two different ages (3 and 4 months), at two water temperatures (27 and 33°C) and four molt stages (AB, C, D<sub>0</sub> and D<sub>1-2-3</sub>). The animals were distributed individually in glass bottles (3 L) to avoid reinfection by cohabitation. During the experiments period (15 days) the frequency of molt and the time of death were monitored daily. The seventh day of the experiment the temperature of the group at 33°C was lowered to 27°C.

The results showed a greater survival of the 3 months old shrimp compared with those of 4 month ( $p < 0.05$ ), independently to the temperature and the molt stage in which they were infected. Additionally within the 3 months old group of shrimp of greatest survival was obtained in the group maintained at 33°C. The stages of molt AB, D<sub>0</sub> and D<sub>1-2-3</sub> are considered as a risk factor in the infection at both temperatures when compared with the stage intermolt (C).

It may be concluded that the age is determinant the survival of shrimp after infection with WS, while temperature helps improve the capacity of shrimp to can front the infection by WSSV at specific molt stages.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de peneidos es una actividad de gran importancia en la economía del Ecuador. A finales de la década de los 80 esta actividad sufrió un rápido crecimiento y alta productividad en todo el mundo, debido principalmente a la expansión de nuevas áreas de cultivo y al desarrollo de tecnologías (CPC,1993). Sin embargo para la década de los 90 numerosos brotes epidémicos se registraron en el cultivo de este crustáceo, asociados a hongos, parásitos, bacterias y virus (Lightner *et al.*, 1995; Aguirre y Valle, 2000). Con el pasar el tiempo la industria aprendió a sobrellevar la mayoría de estas enfermedades, pero aquellas causadas por virus han producido serios estragos, debido a que no se cuenta con tratamientos para su control.

La tendencia hacia la intensificación de los sistemas de cultivo de camarón incrementan el riesgo de desarrollo de enfermedades (Kautsky *et al.*, 2000). Varios reportes indican que las condiciones de estrés favorecen la amplificación de las cargas virales y el desarrollo de epidemias; se ha observado que animales asintomáticos o portadores pueden pasar de un estado latente a uno activo convirtiéndose en una vía de transmisión de gran importancia (Tsai *et al.*, 1999).

En 1999 se reportó oficialmente en Ecuador la presencia del virus de la Mancha Blanca (Calderón *et al.*, 1999), luego de algunos meses el virus fue reportado en camaronerías a nivel nacional (Calderón *et al.*, 2000). El impacto del virus se puede evidenciar claramente en el decrecimiento de la producción en el año 2000, observándose una reducción en un 65% en comparación con el año anterior (CNA, 2000). Actualmente la enfermedad ha sido encontrada tanto en sistemas de producción camaronera como en ambientes naturales (Bayot, 2003).

Es imprescindible comprender los mecanismos implicados en la diseminación y evolución de las enfermedades dentro de las piscinas y encontrar cuales son los factores y/o variables ambientales y de manejo relacionadas a su ocurrencia y severidad, ya que es una prioridad para la sostenibilidad de la industria hallar métodos de prevención y control de las enfermedades (Bachere, 2000).

Una alternativa de manejo de las enfermedades virales en general, es el uso de familias resistentes, desafortunadamente esta es una solución a largo plazo, ya que el carácter bajo mejoramiento (resistencia viral) no puede ser medido directamente en el individuo (Pérez *et al.*, 2001). Para el caso de la Mancha Blanca esta opción no es todavía viable en el Ecuador debido a que aún no se han reportado familias resistentes. En CENAIM, estudios que evalúan la susceptibilidad de familias al WSSV indican la existencia de diferencias en la respuesta al virus; sin embargo, al momento no es posible determinar la ganancia genética por ciclo de selección por que la heredabilidad del carácter resistencia al WSSV de *P. vannamei* aún no ha sido determinada (Pérez *et al.*, 2001). Por tanto las soluciones a corto plazo se centran en el manejo de los animales infectados, en la disminución de las condiciones de estrés que pueden detonar una epidemia y finalmente en minimizar el contagio y la propagación (Bayot, 2003).

Ciertos países productores de camarón no se han visto gravemente afectados por el virus, siendo Colombia uno de ellos, donde se produce todo el año a temperaturas de agua de 29-32 °C (Nogales, *et al.*, 1995). En el litoral Ecuatoriano se han reportado las mejores

supervivencias en camarón en épocas de invierno (estación húmeda/cálida), cuando el agua de los estanques alcanzan temperaturas de 31°C (Sonnenholzner *et al.*, 2002a). Estas circunstancias dieron lugar a suponer que la temperatura podría estar jugando un papel importante en la disminución del impacto de la enfermedad. Vidal *et al.*, (2001) realizaron experimentos con el propósito de examinar el efecto de la hipertermia en la mortalidad de camarones infectados con WSSV, sus resultados indicaron que una temperatura sostenida de  $32.3 \pm 0.8^\circ\text{C}$  inhibe la mortalidad de camarones infectados por WSSV; así mismo en CENAIM se han realizados estudios que demuestran que animales infectados con el virus, pueden sobrevivir si son cultivados a temperaturas de 33°C (Sonnenholzner *et al.*, 2002b).

Otros estudios reportan que existe una potencial relación entre susceptibilidad a la infección y el estadio de muda. Se ha observado que la mayoría de los animales mueren en postmuda (cuando el animal se encuentra blando), siendo la premuda la fase crítica (Echeverría *et al.*, 2001). Se ha reportado que en premuda se observan cambios significativos en la fórmula hemocitaria así como un elevado grado de infección viral (Le Moullac *et al.*, 1997; Echeverría *et al.*, 2001). Adicionalmente, durante este período el sistema inmune del camarón se encuentra distraído (Van de Braak *et al.*, 2002). Estas observaciones nos llevan a suponer que puede existir alguna relación entre la muda y la temperatura sobre la susceptibilidad a la infección de camarones con el virus de la Mancha Blanca.

Esta investigación pretende determinar si la susceptibilidad a la infección por el virus de la Mancha Blanca, está relacionada con el estadio de muda, temperatura y edad en la cual se infecta a los camarones.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### IMPACTO DE LOS VIRUS SOBRE LA INDUSTRIA DEL CAMARÓN

Los camarones peneidos son crustáceos con un alto potencial para la acuicultura en el mundo. Su cultivo ha llegado a ser una industria comercialmente importante en diferentes países como Tailandia, China, Indonesia, India, Vietnam, Filipinas y Ecuador, quienes fueron los responsables en el año 1999 de casi el 90% de la producción mundial (FAO, 2002). Entre las principales especies de camarones cultivados tenemos en Asia, *Penaeus monodon* (camarón tigre gigante); en China, *Penaeus chinensis* (camarón chino); en América, Nueva Zelanda, Nueva Caledonia y otros países, *Penaeus stylirostris* (camarón azul); en la India, Japón y Australia, *Penaeus japonicus* (camarón kuruma) y en Latino América y Estados Unidos (USA), *Penaeus vannamei* (camarón blanco) (Aguirre y Ascencio, 2000).

En Ecuador los primeros intentos de cultivo de camarón se iniciaron en 1968 de manera extensiva, pero sólo a partir de 1977 las operaciones comerciales empiezan a gran escala (CPC, 1993). Una década después el Ecuador se ubica entre los principales exportadores de camarón de cultivo en el mundo, llegando a ser en el año 1998 el segundo productor de camarón de cultivo después de Tailandia (CNA, 2000). Así la camaronicultura se convierte en una industria fuente de exportación con positivo impacto en la economía del país, basando su crecimiento e intensificación en el progreso de las granjas de cultivo y laboratorios de larvas, pero con la falta de conocimiento de la fisiología de los peneidos y a menudo con poca o ninguna consideración de aspectos ecológicos (Bachere, 2000). Por tanto, la rápida expansión de la industria camaronera en los países productores se ha visto afectada por enfermedades infecciosas que afectan la supervivencia y crecimiento del camarón, representando un gran problema para el desarrollo de la industria (Aguirre y Ascencio, 2000).

Los brotes de enfermedades reportados en el cultivo del camarón han estado presentes de forma periódica, debiéndose principalmente a protozoos, hongos, bacterias y virus, asociados con variaciones climáticas (Regueira, 2001; Chavarría, 2003) y a la degradación paulatina del ambiente (Bachere, 2000). Estos patógenos impiden particularmente la producción de larvas o juveniles causando grandes mortalidades (IFREMER, 1999). Los camarones peneidos son afectados por aproximadamente veinte virus conocidos, la mayor parte de los cuales han sido descubiertos a raíz de sus efectos negativos sobre la acuicultura (Aguirre y Ascencio, 2000), entre ellos los que mayormente afectan al cultivo del camarón son:

- El Virus del Síndrome de Taura (TSV = Taura Syndrome Virus), apareció en Ecuador en 1992 (Jiménez, 1992) y se expandió rápidamente por América Central y Texas donde causó masivas pérdidas de producción. Este virus ataca a juveniles (0.1 a 0.5 g) quienes usualmente mueren durante la muda; *P. vannamei*, *P. stylirostris* y *P. setiferus* son las principales especies afectadas (Hasson *et al.*, 1995; Lightner *et al.*, 1995).
- El Virus de la Necrosis Hipodérmica Hematopoyética Infecciosa (IHHNV = Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus), se encuentra ampliamente distribuido en ambos hemisferios; afecta a camarones juveniles y adultos de *P. stylirostris*, *P. monodon* y *P. vannamei* tanto silvestres como de cultivo (Aguirre y

Ascencio, 2000); se caracteriza por causar infecciones persistentes y latentes, ocasionando grandes pérdidas a la industria; *P. vannamei* es relativamente resistente al virus pero su presencia esta relacionada con enanismo o deformaciones, obteniéndose resultados de producción mediocres (Lightner y Chen, 2002).

- El virus de la cabeza amarilla (YHV = Yellow Head Virus), aparece por primera vez en Tailandia en 1990 (Cowley *et al.*, 1999), causa infecciones latentes e infecciones abiertas, afecta a peneidos en general, siendo *P. monodon* la especie más susceptible (Shankar y Mohan, 1998).
- El virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV = White Spot Syndrome Virus), apareció en Asia en 1992 y se expandió rápidamente por diferentes países del Asia y América causando grandes pérdidas en la industria con mortalidades de hasta un 100% (Van Hulten, 2001a).

En las Américas, estos virus han tenido un fuerte impacto sobre la industria acuícola, (excepto YHV) propagándose extensamente debido al movimiento de larvas, juveniles y reproductores infectados y posiblemente al estrés causado por cambios ambientales (Alday, 2000a). Numerosos virus han sido reportados como agentes patógenos cuando los camarones están bajo condiciones de estrés ambiental (temperatura, salinidad, pH, oxígeno, exceso de alimento, etc) que al mismo tiempo incrementan la susceptibilidad a enfermedades (Kinne, 1980; Kautsky *et al.*, 2000). En Ecuador la incidencia de enfermedades ha estado asociada a bajas de temperaturas y éstas han ido intensificándose con la patogenicidad del agente viral (Alday, 2000a). Factores climáticos como la presencia del fenómeno de “El Niño”, que se caracteriza por temperaturas elevadas de agua, han dado lugar a elevadas producciones, en tanto que las enfermedades han menguado las producciones a través de los años (Fig.1) (CNA, 2003).



Figura 1. Efecto de las enfermedades en las exportaciones de camarón en Ecuador (1979 – 2000). Tomado de: CNA , 2003. Cifras dadas en toneladas métricas (TM)

Numerosas estrategias han sido usadas tratando de controlar los virus a través de medidas preventivas para mejorar el crecimiento de la industria camaronera y al mismo tiempo para decrecer la incidencia de enfermedades y efectos en el ambiente: (Aguirre y Ascencio.200; Bachere, 2000). Estas medidas son implementadas tanto en laboratorios, para la detección temprana del virus, como en el campo, para la toma drástica de decisiones como una cosecha de emergencia y esterilización del área infectada; así mismo, muchos vectores pueden entrar en los estanques de camarón a través del agua bombeada, por esta razón algunas estrategias de manejo muestran una tasa de intercambio de agua reducida a ciclo cerrado y recirculación (Aguirre y Ascencio, 2000). Además se sugiere medidas como: tratamiento del agua por filtración o por luz ultravioleta, uso de cal después de una cosecha, eliminación de posibles vectores como peces, cangrejos etc, (Kautsky *et al.*, 2000; Lightner y Chen, 2000).

#### EL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA (WSSV: WHITE SPOT SYNDROME VIRUS)

La Mancha Blanca es una de las enfermedades virales más agresivas que ha afectado la industria camaronera. El virus fue reconocido primero en Taiwán en el año 1992 en poblaciones de camarones de cultivo (Chou *et al.*, 1995), extendiéndose luego rápidamente por varios países asiáticos (Durand *et al.*, 1997, Jory y Dixon, 1999; Van Hulten, 2001a). Para 1999 el mismo virus fue reportado en tres países de Centro América (Nicaragua, Guatemala y Honduras) y en países de Sudamérica (desde Colombia a Perú) (Hill, 2002). En Ecuador la enfermedad se reportó en mayo de 1999 (Calderón *et al.*, 1999).

En camarones cultivados en condiciones experimentales la infección por WSSV puede alcanzar una mortalidad acumulativa hasta del 100% entre 3 a 10 días (Chout *et al.*, 1998; Jory y Dixon, 1999), causando grandes pérdidas económicas para la industria. Los signos clínicos típicos de los animales enfermos incluyen: nado lento o errático, disminución rápida del apetito, manchas blancas en la cutícula que oscilan entre 0.5 y 2.0 mm de diámetro (Fig. 2) (Wang *et al.*, 1995; Kasornchandra *et al.*, 1998). A menudo los animales moribundos muestran una coloración del cuerpo que va de rojiza a rosada y que está dada en parte por la presencia de cromatóforos expandidos (Chang *et al.*, 1996; Lightner, 1996; Kasornchandra *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1998) y porque la hemolinfa se torna rosada (Montesdeoca *et al.*, 2002)

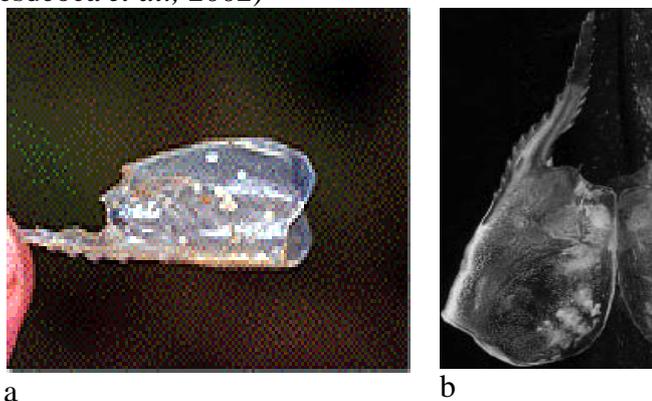


Figura 2. Manchas blancas en caparazón características de camarones severamente

infectados con WSSV. a. *P. vannamei* b. *Macrobrachium rosenbergii* (Pramod *et al.*, 2002).

### 2.2.1. Nomenclatura del WSSV:

El virus fue descrito por varios investigadores en un mismo periodo de tiempo. En reportes tempranos de la enfermedad, se le dió numerosos nombres como: HHNBV: Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Baculovirus en China (Huang *et al.*, 1995); RV-PJ: Rod-shaped nuclear virus de *P. japonicus* en Japón (Inouye *et al.*, 1994); SEMBV: Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus en Tailandia (Wongteerasupaya *et al.*, 1995); WSBV: White Spot Baculovirus en Taiwan (Chou *et al.*, 1995). En el año 2000 análisis genéticos indicaron que el WSSV es representativo de un género provisionalmente llamado Whispovirus dentro de los *Baculoviridae* (Van Hulten *et al.*, 2000) o miembro de una familia enteramente nueva de virus familia *Nimaviridae*, pues el genoma del WSSV muestra que es distinto del ADN de virus estudiados anteriormente (Van Hulten *et al.*, 2001b).

### 2.2.2. Ultraestructura y Morfogénesis

Durand *et al.* (1997) estudiaron la ultraestructura y morfogénesis del virus de la Mancha Blanca encontrando que está típicamente caracterizado por una extensión apical de la envoltura (Fig. 3a). Los viriones presentan forma baciliforme a ovoide con una extensión en un extremo. Poseen un tamaño de alrededor de 250 x 100 nm, y su nucleocápside exhibe una apariencia superficialmente segmentada y cada segmento parece estar formado por subunidades de 8 nm de diámetro dispuestas en dos filas (Fig. 3b). La envoltura tiene de 6 a 7 nm de grosor y presenta una estructura de membrana trilaminar. El área entre la nucleocápside y la envoltura varía entre 2 y 7.5 nm. Contiene ADN doble cadena de alrededor de 290 Kpb (Van Hulten *et al.*, 2001a).

Las infecciones tempranas de los tejidos afectados están caracterizadas por hipertrofia nuclear y marginación de la cromatina. El núcleo contiene material finamente fibrilar y granular localizado centralmente presentando además numerosos fragmentos de membrana lineares o circulares (Mohan *et al.*, 1998). En núcleos altamente infectados, los viriones en formación son localizados centralmente (Fig 3c y d), mientras que los viriones maduros tienden a concentrarse a lo largo de los márgenes nucleares (Durand *et al.*, 1997).

El tejido infectado es generalmente de origen meso y ectodermal incluyendo tejido conectivo y epitelial, nódulos hematopoyéticos, hemocitos, epitelio subcuticular de la epidermis y del estómago, branquias, intestino, músculo estriado, hepatopáncreas, corazón, tejidos reproductivo y nervios (Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Durand *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1998).

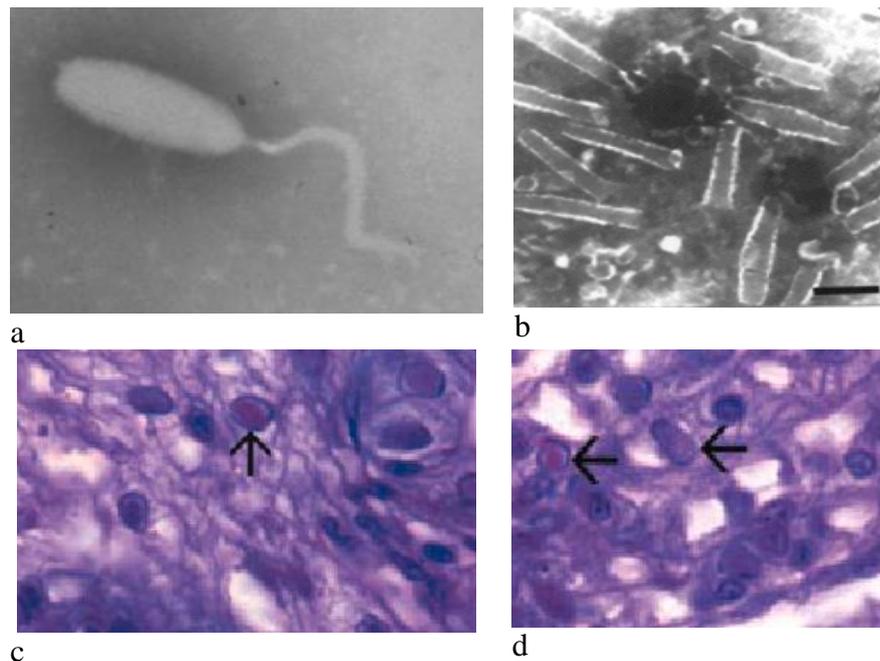


Figura 3. (a). Microfotografía electrónica del virus del WSSV (Wageningen University, Laboratory of Virology, 2001). (b) nucleocápsides de WSSV (escala barra, 185nm) (Zhang *et al.*, 2001). (c) Sección histológica de células estomacales de un juvenil de *P. chinensis* infectado con WSSV, cuerpo de inclusión intranuclear prominente (Lightner, 1996). (d) sección de branquias de juvenil de *P. chinensis* infectado con WSSV, células infectadas muestran cuerpos de inclusión intranuclear (Lightner, 1996).

### 2.2.3. Patogenicidad del WSSV:

El virus del WSS es poco específico y extremadamente virulento, tiene un amplio rango de hospederos y varios tejidos objetivos, puede inducir a mortalidades del 100% entre 3 y 5 días en camarones sometidos a pruebas experimentales de infección (Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1998; Kou *et al.*, 1998). Los hospederos conocidos del WSSV incluyen *P. monodon*, *P. chinensis*, *P. penicillatus*, *P. japonicus*, *P. indicus* y *P. vannamei* (Inouye *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996; Chou *et al.*, 1998; Karsornchandra *et al.*, 1998; Calderón *et al.*, 1999; Rajan *et al.*, 2000), también puede ser detectado en diferentes tipos de crustáceos silvestres como camarones marinos (*Trachypenaeus curvirostris*, *Metapenaeus ensis* y *Exopalaemon orientalis*) (Chang *et al.*, 1998), camarones de río (*Macrobrachium* sp, *Procambarus clarkii*) (Wang *et al.*, 1998; Pramod Kiran *et al.*, 2002), cangrejos (*Portunus sanguinolentus*, *Caribdis granulata*, *Calapa philarigus*, *Caribdis feriatius*, *Caribdis natator*, *Scylla serrata*, *Portunus sanguinolentus*, *Portunus pelagicus*, y *Helice tridens*) (Kou *et al.*, 1998) y langostas (*Panulirus versicolor*, *P. penicillatus*, *P. ornatus* y *P. longipes*), siendo el grado de infección diferente dependiendo de la especie (Rajendran *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2000). Todas las especies silvestres encontradas libres de WSSV fueron capaces de ser infectadas experimentalmente por el virus. Además ha sido detectado en copépodos, insectos y *Artemia* (Otta *et al.*, 1999; Chag *et al.*, 2002).

#### 2.2.4. Vías de transmisión y propagación del virus:

El traslado de animales comerciales (importación y exportación de larvas, juveniles y reproductores) es el principal medio de propagación de agentes infecciosos (Kinne, 1980). La transmisión del WSSV es horizontal (Wang *et al.*, 1999), el virus puede extenderse horizontalmente en las poblaciones de camarones cultivados a través del agua o del alimento infectado congelado (Chou *et al.*, 1995). Esta es una importante forma de transmisión en las poblaciones de camarones peneidos por la característica caníbal de estos (Chou *et al.*, 1998, Rajan *et al.*, 2000).

La presencia del ADN de WSSV en las gónadas, principalmente en el tejido conectivo, de camarones y cangrejos, sugiere que el WSSV puede tener transmisión vertical (Lo *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1999). Existe la posibilidad de transmisión vertical del virus en la superficie del huevo: “*per ovum*”, pero no se ha demostrado una transmisión dentro del huevo “*intra ovum*” ya que los óvulos que se han detectado infectados degeneran (Lo *et al.*, 1997; Shankar y Mohan, 1998). La detección de WSSV por PCR, hibridación *in situ* y microscopía electrónica, en ovarios de *P. monodon* y en los nauplios descendientes de estas hembras, sugieren que sólo los reproductores sanos o ligeramente infectados pueden desovar de manera efectiva y que el WSSV es altamente virulento durante este período (Lo *et al.*, 1997). Los ovarios que presentan reacción positiva tienen mayor número de células positivas que las no infectadas, sugiriendo que los oocitos infectados degeneran y no son viables (Wang *et al.*, 1999). En conclusión el virus no sería transmitido por los reproductores a través de los huevos pero podría serlo al liberar las partículas virales presentes en el tejido conectivo del ovario y estas ser ingeridas por las larvas durante el cultivo (Lo *et al.*, 1997).

#### 2.2.5. Técnicas de detección del virus de WSSV:

Existen diferentes técnicas para la detección de virus del WSSV: reconociendo los cambios que provoca en los tejidos (histopatología), por la detección de su morfología a través de microscopía electrónica (Kasornchandra *et al.*, 1998; Rajedran *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003a); haciendo uso de anticuerpos con técnicas como ELISA (Sahul Hameed *et al.*, 1998); Dot Blot (Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Sahul Hameed *et al.*, 1998); Western blot (Jory y Dixon, 1999; van Hulten *et al.*, 2001a); o por la detección del ADN del virus por PCR (Lo *et al.*, 1998; Kou *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1998; Calderón *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000; Durand y Lightner, 2002; Wang *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003a) e hibridación *in situ* (Chang *et al.*, 1996; Durand *et al.*, 1997; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1998; Kou *et al.*, 1998; Alday, 2000b).

La técnica de PCR (Reacción de polimerización en cadena) es la más sensible y comúnmente utilizada, consiste en la amplificación de ADN viral y fue inventada y desarrollada por el químico Kary B. Mullis en 1985. La técnica en acuicultura es empleada para detectar y secuenciar ADN de virus, bacterias e invertebrados (Lightner y Redman, 1998; Walker y Subasinghe, 2000). Su uso está recomendado para el diagnóstico de infecciones asintomáticas o certificaciones de reproductores libres de patógenos o larvas.

### 2.2.6. Factores de riesgo asociados a WSSD:

Son muchos los factores de riesgos asociados con la enfermedad de la Mancha Blanca (WSD = White spot disease), entre estos: siembra de post larva (PL) infectada (Thakur *et al.*, 2002), adición de agua infectada al estanque (Chou *et al.*, 1998), ocurrencia de factores de estrés (Chou *et al.*, 1995, Sudha *et al.*, 1998), presencia de portadores de WSSV en el estanque o en el afluente de agua (Lo *et al.*, 1996), y la ingestión oral de camarones o alimento fresco infectado (Chou *et al.*, 1995, 1998). Así mismo Leung *et al.* (2000) encontró que al menos 2 de 3 niveles de cultivo intensivo estarían asociados a un alto riesgo de ocurrencia del WSSV que tendrían como característica la remoción de sedimentos entre cosecha y cosecha versus la no remoción. De la misma manera un efecto de localización fue identificado en estudios realizados por Corsin *et al.* (2001) quienes encontraron que en los estanques próximos al mar, los camarones tuvieron más probabilidad de resultar positivos a pruebas de WSSV en la cosecha.

### Temperatura y WSSV

Los cambios en factores ambientales inducen a alteraciones en el metabolismo de los crustáceos. Estas variaciones ambientales a menudo causan estrés en los animales, resultando en una reducción del vigor inmune (Le Moullac y Haffener, 2000). La temperatura del agua es probablemente el factor ambiental más importante para los camarones de cultivo afectando directamente el metabolismo, consumo de oxígeno, crecimiento, muda y supervivencia (Chen *et al.*, 1995; Wyban *et al.*, 1995; Ponce *et al.*, 1997). Jiang *et al.* (2000) reportan que juveniles de *P. vannamei* son más susceptibles a la excreción del amonio en temperaturas bajas (24-28 °C) que a temperaturas elevadas (28-32 °C). De la Peña *et al.* (1993) afirma que la dinámica de ocurrencia de patógenos en sistemas acuáticos estaría modulada por parámetros ambientales tales como salinidad y temperatura.

Así mismo, Vidal *et al.* (2001) observaron una gran diferencia en supervivencia de camarones cultivados en las costas del océano Pacífico y en las costas del océano Atlántico; hipotetizando que las temperaturas más bajas de las aguas de la costa pacífica permiten que la infección por WSSV progrese causando severas mortalidades. En desafíos por infección con WSSV sus resultados indican que incrementando la temperatura del agua de 26 a 32 °C modifica la historia natural del WSSV y las curvas de supervivencia de los animales infectados. La reducción gradual de la temperatura de 33 a 26 °C fue seguida por el inicio de mortalidades que comenzó en el segundo día seguido de la reducción de la temperatura y extendiéndose al 100 % en 8 días.

Sonnenholzner *et al.* (2001) sugieren que el WSSV es capaz de infectar a juveniles de *P. vannamei* a cualquier temperatura, pero que temperaturas inferiores a 31 °C podrían no ser las óptimas para el buen desempeño del sistema inmune de los camarones por lo que la respuesta no se produciría con la rapidez y energía que la agresión de un virus de tan alta replicación como el WSSV demanda. Adicionalmente, el camarón requiere de 4 días de alta temperatura (33 °C  $\pm$  1 °C) para alcanzar a la vez un estado de alerta inmunitaria. Las altas supervivencias a 33 °C no serían causadas por inactivación viral, sino más bien por la respuesta inmune del camarón.

### Muda y WSSV:

La cutícula o exoesqueleto es la principal barrera de defensa de los crustáceos contra los patógenos, los camarones necesitan desprenderse de su exoesqueleto (mudar) para poder crecer. Desde que se inicia la muda hasta que el nuevo caparazón está totalmente endurecido (muda y post muda), es presa fácil para otros animales de su entorno, así como para agentes patógenos que podrían fácilmente entrar por heridas causadas por depredadores, causando la mayor mortalidad en este periodo (Kinne, 1980).

Algunos estudios asocian varias enfermedades al ciclo de muda, Le Mollulac *et al.* (1997) encontraron que *P. stylirostris* es más sensible al *Vibrio* patógeno AM23 durante la premuda que durante la intermuda; Hasson *et al.* (1995) reportaron que el TSV ocasiona mortalidad de *P. vannamei* en premuda tardía (estadío D) o en exuvia (estadío E); Echeverría *et al.* (2001) indican que juveniles de *P. vannamei* son infectados por ingestión de tejido con WSSV en intermuda (estadío C) y mueren en postmuda (estadío AB). Estudios como los de Tsing *et al.* (1989) y Le Moullac *et al.* (1997), realizados en camarones *P. japonicus* y *P. stylirostris* respectivamente, encuentran cambios en la fórmula hemocitaria durante los diferentes estadíos del ciclo de muda (mayor número de hemocitos circulantes en postmuda y menor número en intermuda).

Siendo la respuesta inmune del hospedero de gran importancia contra la agresión de patógenos y teniendo en cuenta que el sistema inmune del camarón se distrae durante la muda, se han desarrollado varias pruebas de desafío con WSSV, tanto en laboratorio como en el campo, en las cuales se ha seguido el ciclo de muda de los animales. Echeverría *et al.* (2001) sugieren que el virus del WSSV modifica el ciclo de muda y describe la presencia de exuvios previos al inicio de las mortalidades como un indicador de que la infección se desarrolló, hipotetizándose finalmente que el virus mata a los animales en postmuda y que esto favorece la propagación del virus en los exuvios en tanto que los animales blandos de postmuda son fácil presa de los camarones sanos, expandiéndose la enfermedad por canibalismo.

### Edad y WSSV:

La edad es un factor importante, se especula que existen ventanas de edad en las cuales los animales son más susceptibles a infectarse (multiplicación de un agente en el organismo animal que puede producir o no enfermedad) o morir por los efectos de una enfermedad. En Ecuador, los animales de camaronera mueren por WSSV entre la cuarta y sexta semanas luego de la siembra que correspondería a PL42 a PL52. Pérez *et al.* (2002) sugiere que el periodo sin mortalidad inmediatamente después de la siembra podría explicarse como el tiempo necesario para que la enfermedad se amplifique en un evento tipo cascada, alrededor de PL30 aparecerían los primeros animales muertos a causa del virus, que serían canibalizados y una segunda ola de moribundos se produciría entre 7 y 10 días después, se necesitarían 2 ó 3 olas sucesivas de infección para que a la mayor parte de la población sea afectada y producir mortalidades masivas. Kasornchandra *et al.* (1998) afirman que el WSSV se manifiesta en juveniles de camarón de todas las edades y tallas; sin embargo las edades de mayor susceptibilidad se encuentran entre 1 ó 2 meses después de la siembra en estanques. Así mismo, Yoganandhan *et al.* (2003) en infecciones experimentales por inmersión de larvas y estadíos tempranos de post-larvas

de *P. monodon* encontraron que la virulencia del WSSV se incrementa conforme avanzan los estadios de desarrollo y que el WSSV no se desarrolla como enfermedad en post-larvas menores a PL10.

F. Pérez, Fundación CENAIM-ESPOL, Ecuador comunicación personal, observaron que al realizar infecciones por inmersión en extracto viral, inyección en músculo e ingestión de tejido infectado (papilla) a camarones en PL20, PL30 y PL40, se obtuvieron tasas de supervivencia que varían no sólo con el método de infección si no también con los estadios de postlarva. La supervivencia más baja (35.6 %) fue observada en los estadios de PL40, siendo significativamente diferente a la supervivencia de los estadios de PL20 (51.9 %) y de PL30 (54.7 %). El estadio más temprano donde se observó mortalidad masiva fue en PL20, soportando la hipótesis de una alta resistencia para el WSSV en estadios tempranos de *P. vannamei* sugiriendo que la susceptibilidad al virus depende de la talla y del estado fisiológico de los animales incrementándose con la edad de la PL (Venegas *et al.*, 1999).

## MUDA

El término “muda” es usado en un sentido amplio e incluye todo el proceso de preparación de los crustáceos para desprenderse de su viejo integumento e incrementar la talla lineal así como el subsecuente crecimiento del tejido (Passano, 1961). Este proceso ocurre en forma cíclica cada vez que el organismo está preparado para aumentar de talla y de peso, el viejo esqueleto es liberado rápidamente y se produce una nueva capa quitinosa que tenderá a endurecerse hasta obtener la consistencia y dureza del exoesqueleto anterior (Passano, 1961; Vega Villasante *et al.*, 2000). Durante este proceso los tejidos del camarón absorben grandes cantidades de agua y se favorece la división celular, incrementándose el volumen y peso del animal (Van Wormhoudt y Bellon-Humbert, 1996).

### *Ciclo de muda*

La muda es controlada por mecanismos hormonales. La secreción de una neurohormona por el órgano X, que se encuentra en los pedúnculos oculares, inhibe la muda. La secreción de una neurohormona por el órgano Y, que se encuentra en la cámara branquial, activa la muda (Huberman, 2000).

La formación de la nueva cutícula involucra cambios en las reservas de lípidos, un aumento en la división celular de los tejidos y síntesis de nuevas proteínas (Passano, 1961). El proceso de muda generalmente ha sido dividido en cuatro estadios, y cada especie posee su propia definición de subestadios según los cambios morfológicos internos observados así como la duración de los mismos (Robertson *et al.*, 1987). Para la identificación de los estadios de muda, Robertson *et al.* (1987) y Chan (1988) usaron criterios basados en cambios observables en el integumento que involucraban el color y textura (grado de dureza) del exoesqueleto y la examinación microscópica del borde transparente de los urópodos y pleópodos donde el epitelio se retira y puede observarse el desarrollo de nuevas setas.

Basados en los estudios realizados por Robertson *et al.* (1987) y Chang (1992), los estadios de muda fueron clasificados como: la *postmuda* (estadios A y B) es el estadio justo después de la exuviación; durante este período el exoesqueleto se expande debido a la absorción de agua, e inicia su endurecimiento. Seguidamente la *intermuda* (estadio C) es cuando el exoesqueleto obtiene su máxima rigidez a través de deposición de minerales y proteínas. La *premuda* (estadio D<sub>0</sub> y D<sub>1</sub>) está definida por la separación del viejo exoesqueleto y el inicio de la formación de la nueva epicutícula. Se caracteriza por el aumento en las concentraciones de la hormona de la muda en la hemolinfa, y por último la *exuvia* (estadio E) (Fig. 4) que consiste en el escape del crustáceo de su viejo exoesqueleto (Chang, 1992).

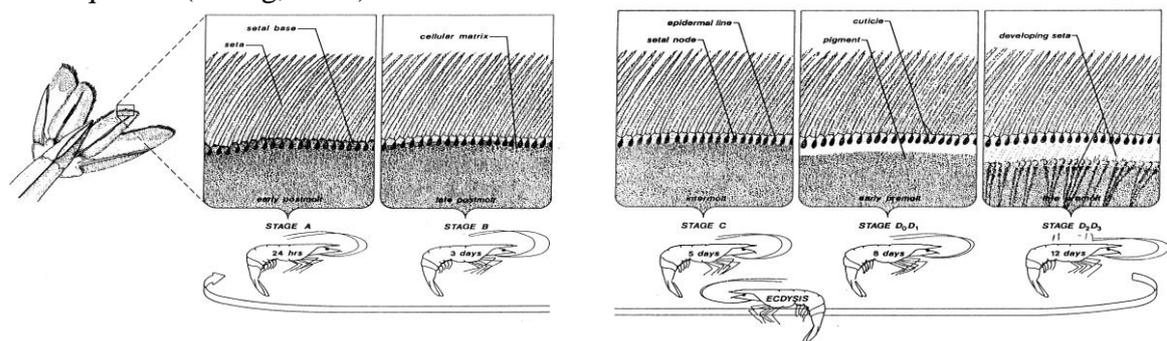


Figura 4. Estadios del ciclo de muda identificado por la sucesión de cambios ocurridos en las setas de urópodos de adultos de *Penaeus setiferus* y *Penaeus stylirostris* (Robertson *et al.*, 1987).

### 2.3.2. Sistema inmune

Es evidente que la muda es beneficiosa ya que está relacionada con el crecimiento, pero también puede presentarse durante episodios de estrés o enfermedades. Cuando la muda se presenta en ambientes donde los animales están enfermos puede convertirse en un momento crítico, puesto que estos quedan expuestos al medio ambiente, depredadores o invasión por microorganismos oportunistas (Söderhall y Cerenius, 1998).

Se ha relacionado a la muda con algunas enfermedades (Le Moullac *et al.*, 1997) tales TSV, IHNV, WSSV y los síndromes de zoea y de la muda, presentándose en algunos casos elevadas mortalidades.

Estudios realizados han demostrado que los cambios bioquímicos, biológicos, así como las modificaciones morfológicas en la epidermis de los crustáceos influye también en el sistema inmune (Echeverría *et al.*, 2001). Tsing *et al.* (1989) señalan cambios del hemograma durante el ciclo de muda en *P. japonicus* encontrando que al inicio del ciclo A-B<sub>1</sub> el número de hemocitos es alto, disminuye significativamente a un mínimo en B<sub>2</sub>, incrementa en C y se mantiene estable en D<sub>2</sub>, incrementa de nuevo y alcanza un máximo en D<sub>3</sub>-D<sub>4</sub>. Le Moullac *et al.* (1997), en *P. stylirostris*, encontraron el mayor número de hemocitos circulantes durante la postmuda y el menor número durante la intermuda. En *P. stylirostris* y *S. ingentis* la fórmula hemocitaria reportó el mayor número de hemocitos granulares circulantes en intermuda (Hose *et al.*, 1992; Le Moullac *et al.*, 1997). El pico

de las células hialinas relacionadas a la coagulación y a la formación de cutícula, ocurre durante el período de exuvia en *S. ingentis* y en *P. japonicus* (Hose *et al.*, 1992; Sequeira *et al.*, 1995). Hay que considerar que siendo la respuesta inmune del hospedero vital para enfrentar la agresión viral, está sujeta a modificaciones según el estadio de muda.

### 2.3.3. Muda y temperatura

Los factores ambientales juegan también un importante papel en el desarrollo de la muda (Huberman, 2000). La temperatura del agua es un factor que afecta el desarrollo y crecimiento del camarón modificando el metabolismo (Kinne, 1980; Vega-Villasante *et al.*, 2000). Cada especie de camarón tiene capacidad para resistir un rango específico de temperatura, dentro del cual presenta un óptimo crecimiento. Ponce *et al.* (1997) reportan que la temperatura óptima para *P. vannamei* va de un rango de 25 a 30 °C.

Se considera que la temperatura puede influenciar la muda y el control del proceso de la misma, debido a que la mayoría de los procesos metabólicos actúan positivamente (Passano, 1961). Así mismo Hewitt y Duncan (2001) probaron el efecto de temperatura elevada (28-36°C) en el ciclo de muda de *P. japonicus*, encontrando que un aumento en la temperatura dentro de cierto rango (30-32°C), acelera el ciclo de muda (15 días de intermuda a 32°C) y la retarda a temperaturas más elevadas (27.4 días a 34°C y >104 días a 36°C). Hennig y Andreatta (1998) probaron que bajas temperaturas (18 °C) en cultivo de *Penaeus paulensis* resultaba en baja supervivencia, letargia, disminución del consumo de alimento y dejaban de mudar, encontrando en sus resultados que existía una correlación positiva entre la temperatura del agua, el crecimiento y la supervivencia.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. CONDICIÓN EXPERIMENTAL

En este estudio se analizó la influencia de dos niveles de temperatura (27 y 33°C), de 4 estadíos de muda y 2 edades (3 y 4 meses) en la susceptibilidad de camarones juveniles de *P. vannamei* para enfermar y morir tras ser infectados con un inóculo del virus de la Mancha Blanca.

Se contó con una sala experimental del CENAIM (Set experimental N°1) en la cual fue posible mantener de forma permanente y estable la temperatura del agua y aireación individual para cada frasco así como iluminación controlada y homogénea. El agua de mar utilizada fue esterilizada con rayos ultravioletas y posteriormente clorada para evitar la entrada de patógenos ajenos al estudiado.

#### 3.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Las variables temperatura, edad, estadío de muda e infección por sí solas o combinadas están asociadas a la supervivencia de camarones juveniles de *P. vannamei* desafiados por inmersión al WSSV.

#### 3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental consistió en la observación de la supervivencia durante 15 días de camarones infectados con el virus de la Mancha Blanca, en cuatro diferentes estadíos de muda (AB, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1-2-3</sub>) sometidos a dos temperaturas (27 y 33 °C) y a dos edades (3 y 4 meses).

Para cada edad, se seleccionaron camarones provenientes de las poblaciones A y B de la siguiente manera: 70 camarones de cada población en estadío AB, 70 camarones en estadío C, 70 camarones en estadío D<sub>0</sub> y 70 camarones en estadío D<sub>1-2-3</sub>. Cada uno de estos grupos fué infectado con un inóculo viral por inmersión por 12 h, de los cuales 30 camarones fueron colocados de manera individual en frascos de vidrio (3L); los 20 restantes se usaron para determinar la efectividad de la infección mediante PCR (datos no mostrados) y 20 para estimar la mortalidad asociada a manipulación (estrés).

Las unidades experimentales utilizadas fueron frascos de vidrio de 3 L de capacidad y las unidades observacionales los camarones de la poblaciones A y B de ambos grupos de edades. La distribución de los tratamientos y los animales en las unidades experimentales fue al azar. Se incluyó un grupo control con animales no desafiados en diferentes estadíos de muda y temperatura a fin de evaluar la presencia de mortalidad debida a agentes etiológicos distintos al estudiado. Las variables independientes fueron: la infección (infectados o no infectados), el estadío de muda, la temperatura, la edad y suceso (vivo o muerto), mientras que la variable dependiente fue el tiempo de supervivencia (o tiempo transcurrido hasta que ocurra el suceso).

#### 3.4. MATERIAL BIOLÓGICO

Se trasladaron a las instalaciones del CENAIM 6,372 camarones desde la camaronera Pesglassa ubicada en Pto. Inca provincia del Guayas (cultivados en invernadero a temperatura de 33°C y 4 ppt de salinidad), los que tenían un peso promedio de  $2.14 \pm 0.2$  g. Los animales fueron aclimatados a 33°C y 35 ppt en dos estanques de 8 TN de capacidad durante una semana. Al final de la aclimatación, la temperatura del agua de

uno de los estanques fue bajada hasta 27°C y mantenida de esta forma, población a la que llamaremos A y el otro tanque se mantuvo a la temperatura inicial de 33°C, población que llamaremos B.

### 3.5. PREPARACIÓN DEL INÓCULO VIRAL

La solución viral fue preparada siguiendo el protocolo Chou *et al.* (1998). Se utilizaron animales diagnosticados positivos en grado severo por análisis de PCR (Polymerase Chain Reaction) para el virus de la Mancha Blanca (obtenidos de camaronas locales). Se utilizaron los pleópodos, branquias y exoesqueleto que fueron macerados y homogenizados en tampón TN 1X (20 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl) centrifugadas a 4,977.78 g por 10 min y equilibrado a pH 7.4. El sobrenadante fue filtrado a 0.45 µm y almacenado a una temperatura de -80 °C. Se efectuó una dilución en serie de la solución viral elaborada, la cual empezó desde el stock (solución sin diluir) de 10<sup>0</sup> hasta una dilución de 10<sup>-9</sup>. Esta dilución fue hecha en cascada y el volumen para trabajar fue de 1 ml. Se realizó un análisis de PCR de toda la serie ya preparada y con los resultados se estimó la concentración viral de la solución, para lo cual se determinó la menor dilución en la que se observó producto amplificado de WSSV y se multiplicó con el valor límite de detección del PCR en CENAIM. Esta cuantificación fue corroborada por el Dr. Lightner en sus laboratorios siguiendo el método de PCR en tiempo real descrito por Durand *et al.* (2002) y por análisis realizados en el Centro de Servicios Acuícolas (CSA) utilizando el Kit IQ 2000 (Farming Intellegene Tech. Corp.).

### 3.6. EXPERIMENTO: Desafío con WSSV y evaluación de la supervivencia

Se realizaron dos experimentos usando el mismo lote de animales a dos edades. En el primer y segundo experimento los camarones tenían una edad aproximada de 3 y 4 meses respectivamente. En ambos experimentos se evaluó la supervivencia en los diferentes tratamientos (2 temperaturas y 4 estadíos de muda), más el control no infectado.

#### Desafío con WSSV

El desafío se realizó en el primer experimento adicionando 30 ml de inóculo viral de concentración 5.5 x 10<sup>8</sup> viriones/µg de ADN de inóculo a cada una de 8 gavetas de 50 L de capacidad, que contenían 70 camarones en igual estadío de muda y temperatura. Por lo tanto se contó con 1 gaveta por cada tratamiento formado por la combinación de 4 estadíos de muda y 2 temperaturas de agua. Para el segundo experimento la aplicación del inóculo se realizó en las mismas condiciones que en el primero, pero la concentración viral fue de 3.8 x 10<sup>8</sup> viriones/µg de ADN debido a la escasez de material infectado. En ambos casos se mantuvo a los camarones en contacto con el virus por 12 horas. Los animales del control no infectado fueron manipulados de la misma manera que los infectados. Al término de la infección, tanto los camarones infectados como no infectados fueron distribuidos aleatoriamente y de manera individual en cada una de las unidades experimentales, para evitar una posible reinfección por cohabitación o canibalismo.

A fin de conocer si la prevalencia del virus a los 7 días post infección (p.i.) había variado (datos no mostrados) se realizó el corte de un par de pleópodos a todos los camarones en ambos grupos; adicionalmente se bajo la temperatura del grupo mantenido a 33°C hasta 27°C para observar si existía algún efecto residual de la temperatura sobre la resistencia al WSSV.

### Eficacia de la infección por inóculo del WSSV

Con el objeto de excluir la infección previa de los animales se analizaron individualmente 150 animales en cada una de las poblaciones (A y B), colectados al tiempo cero de infección ( $T_0$ ) número suficiente para detectar la infección viral por encima de una prevalencia del 2 % con un 95 % de nivel de confianza (Thrusfield, 2001). A las 12 horas p.i. se colectaron 20 animales por cada estadio de muda y cada temperatura ( $T_f$ ).

La eficacia de la infección con el WSSV se determinó comparando los resultados de los análisis por PCR para 150 animales de las poblaciones A y B, colectados al tiempo cero de infección ( $T_0$ ) frente a los 20 animales por cada estadio de muda y temperatura colectados a las 12 horas p. i. ( $T_f$ ), la efectividad de la infección se estableció, detectando prevalencias de infección superiores al 15 % con un nivel de confianza del 95 %.

### Supervivencia del Experimento

Se evaluó la tasa de supervivencia mediante el conteo diario cada 3 horas durante los dos primeros días y cada 6 horas hasta el término del experimento. Los animales muertos o moribundos de los 7 primeros días se preservaron en alcohol al 95% para la estimación de prevalencia de WSSV y los animales muertos de los 7 días restantes fueron fijados con dilución Davidson para pruebas histológicas en estudios posteriores.

### 3.7. CODIFICACIÓN DE DATOS: Variables del estudio:

Para cada animal se asignó variables de tipo categórico a excepción del tiempo;

1. Variables explicatorias: Datos relativos al momento de la infección: Edad, estadio de muda y temperatura del agua.
2. Variables de respuesta: Datos referidos a la supervivencia, tiempo transcurrido hasta que ocurrió el suceso (vivo o muerto).

### 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

#### 3.8.1. Estudios de Cohorte

Son estudios epidemiológicos observacionales longitudinales, es decir realizados en un periodo de tiempo definido y generalmente con carácter prospectivo. El estudio clasifica inicialmente individuos en dos grupos (expuestos a un factor y no expuestos/control), parten de conocer el grado de exposición a los factores de un grupo que no presenta la enfermedad o suceso y se analiza la posterior presentación o no de esta, generando una tabla de contingencia de 2x2. Los integrantes para este tipo de estudio se seleccionan según la exposición al factor (Ortega, *et al* 1998; De Blas, 2001).

#### *Tablas de contingencia*

Es una tabla de doble entrada (2x2); se construye para establecer la probabilidad de que dos variables estén asociadas, o si por el contrario pueden considerarse independientes. El procedimiento estadístico habitual para contrastar la presencia de asociación entre las variables es utilizar la prueba del Chi-cuadrado, además con las tablas de contingencia se puede calcular las medidas de asociación entre las variables (Thrusfield, 2001).

		Tabla de contingencia		
		Expuestos al factor		
		Si	No	
Suceso	Muertos	a	b	a+b
	Vivos	c	d	c+d

a+c	b+d	N= a+b+c+d
-----	-----	------------

Donde:

- a: Muertos expuestos al factor
- b: Muertos no expuestos al factor
- c: Vivos expuestos al factor
- d: Vivos no expuestos al factor

### *Test de significancia de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ )*

La prueba de  $\chi^2$  en las tablas de contingencia determina si la diferencia entre las frecuencias observadas correspondientes al cruce de los valores de las 2 variables y las frecuencias esperadas son estadísticamente significativas. El análisis de  $\chi^2$  arroja un valor de  $p$  determinado, que si es inferior a 0.05, indica que existe una asociación entre las variables estudiadas.

La fórmula de  $\chi^2$ :

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Donde "O" y "E" representan respectivamente las frecuencias observadas y las esperadas.

### *Residuos Normalizados de Pearson*

Se obtienen dividiendo la diferencia de los valores observados y esperados entre la desviación estándar de los valores esperados. Con el valor de los residuos observaremos la desviación entre los datos observados y los esperados. Los valores de residuales normalizados entre  $-2$  y  $2$  nos indican que el ajuste del modelo de  $\chi^2$  es adecuado; es decir, que los valores observados no son significativamente distintos de lo esperado (Agresti, 1996).

### *Riesgo relativo (RR)*

El valor del RR determina la medida del grado de asociación entre dos variables, se define como la razón de probabilidades de que un individuo, libre de la enfermedad y susceptible de ella, la desarrolle en un periodo determinado (Ortega, *et al* 1998; De Blas, 2001).

Fórmula del RR : (Ver tabla de contingencia)

$$RR = \frac{a/a+c}{b/b+d}$$

### Interpretación de Resultados:

Valores de “1” indican que no existe asociación entre la exposición al factor de riesgo y el estado de la enfermedad. Valores diferentes a “1” indican que el factor de riesgo tiene influencia en que la enfermedad se presente (Thrusfield, 1995). Presentándose las siguientes situaciones:

- Valores mayores a 1: Indican un crecimiento del riesgo de presentación de la enfermedad entre los expuestos al factor, equivalente a tantas veces dicho factor, denominándose en este caso Factor de riesgo.
- Valores menores a 1: Indican una disminución del riesgo entre los expuestos al factor equivalente a tantas veces el inverso del factor, en este caso el determinante se denomina Factor de protección.

Al no trabajar con toda la población de estudio si no con una muestra representativa, se introduce un margen de error que se representa por un intervalo de confianza. Cuando el valor de 1 está incluido en el intervalo se considerará que no existe suficiente evidencia para afirmar que el factor influye en la variable de respuesta (Ortega, *et al* 1998; De Blas, 2001).

### **Riesgo relativo crudos**

Cuando el RR se calcula mediante análisis univariable se denomina Riesgo relativo crudo; no obstante, este tipo de análisis no considera la posible interacción entre si de varios determinantes (un factor que afecta a la presentación de la enfermedad puede estar condicionado por un segundo factor) o la existencia de factores de confusión (confounding, dos factores parecen estar asociados, pero realmente esa asociación se debe a la existencia de un tercer factor común a aquellos dos). Esto supone, que la asociación observada se debe en realidad a una mezcla de efectos entre la exposición, la enfermedad y un tercer factor que afecta a los dos anteriores (Thrusfield, 1995).

### ***Interacción y confusión***

La existencia de confusión implica un sesgo debido a que la relación entre el factor estudiado y la enfermedad es diferente en diferentes estratos que se presentan en la población, mientras que la interacción indican asociación entre el determinante y la enfermedad depende de la acción de un tercer elemento.

Para controlar este tipo de situaciones se trata de igualar la intervención de ese factor que actúa como *confusor* entre los grupos que se comparan, para lo cual se realiza un estudio de cohorte estratificado (Thrusfield, 1995).

### ***Estudio de cohorte estratificado***

La estratificación es una técnica que controla los factores de confusión, analiza la asociación entre la exposición y la enfermedad en cada estrato del factor de confusión, (cada estrato representa un nivel del factor de confusión). (Thrusfield *et al.*,2001)

En el caso de confusión la verdadera asociación entre el determinante y la enfermedad se estima mediante el RR de Mantel- Haenszel, mientras que si existe interacción, ese grado de asociación entre el determinante y la enfermedad se estima mediante los estadísticos de Breslow-Day.

### 3.8.2. Análisis de Supervivencia

El Análisis de supervivencia engloba un conjunto de técnicas en las que la variable que se pretende analizar es el tiempo que transcurre hasta la ocurrencia del suceso de interés, la supervivencia es una medida de tiempo a una respuesta, fallo, muerte, desarrollo de determinada enfermedad o evento. Su análisis tiene como objetivo establecer el efecto de una variable independiente sobre una variable dependiente cuando ésta puede expresarse en términos de “tiempo hasta que ocurre el suceso”, es decir si existe diferencia entre las curvas de supervivencia en cada tratamiento (Saez y Barceló 2002).

Las respuestas de este tipo de análisis son tiempos y se han de medir secuencialmente, lo que trae como consecuencia la *censura* (cuando se tiene información incompleta sobre la supervivencia de algunos individuos) (Saez y Barceño, 2002)

#### 3.8.2.1. Método de Kaplan-Meier

Para estimar puntualmente la función de supervivencia Kaplan y Meier propusieron un método que descompone la supervivencia de un individuo al cabo de determinado periodo de tiempo en un producto de probabilidades condicionadas y estima cada factor de este producto, el cual es conocido como “límite del producto” o como Método de Kaplan Meier.

La característica distintiva del análisis con este método es que la proporción acumulada que sobrevive se calcula para el tiempo de supervivencia individual y no se agrupan los tiempos de supervivencia en intervalos. Por esta razón es especialmente útil para estudios que utilizan un número pequeño de individuos (muestra menor de 30). El método de Kaplan-Meier incorpora la idea del tiempo al que ocurren los eventos, calcula la supervivencia cada vez que un individuo muere, da proporciones exactas de supervivencia debido a que utiliza tiempos de supervivencia precisos. La supervivencia se calcula mediante la fórmula:

$$S_{(ti)} = r_i - m_i / r_i ( S_{(ti-1)} )$$

Donde:

$S_{(ti)}$ : Supervivencia en un tiempo determinado.

$S_{(ti-1)}$ : Supervivencia del días anterior del tiempo determinado.

$r_i$ : Número de individuos expuestos al riesgo.

$m_i$ : Número de individuos que presentan el suceso.

Las variables en el estudio son:

Variable independiente: Tiempo en horas

Variable dependiente: Supervivencia: codificada como

1 = casos no censurados, evento terminal *ha ocurrido*

0 = casos censurados, evento terminal *no ha ocurrido*

\* Se debe tener en cuenta que al hablar de *tiempo de supervivencia* no nos referimos necesariamente a la vida biológica, sino que en sentido amplio debe interpretarse como el tiempo necesario hasta que ocurre cierto acontecimiento; por lo que también se utiliza el término *tiempo de fallo* (Saez y Barceló 2002).

### Prueba del logaritmo del rango “Log-rank”

Hay diversas pruebas para comparar distribuciones de supervivencia. La prueba de Log-rank es una de ellas. Este método estadístico es una prueba de hipótesis, en la cual la hipótesis nula es aquella que postula que no existen diferencias estadísticas significativas entre las tendencias de la supervivencia (es decir el riesgo es el mismo) compara en esencia el número de eventos (muertes, fracasos) en cada grupo con el número de fracasos que podría esperarse de las pérdidas en los grupos combinados (Saez y Barceló 2002). Se calcula con la fórmula:

#### 3.8.2.2. Modelo de Regresión Logística de Cox (Modelo de riesgos proporcionales)

El modelo de riesgos proporcionales de Cox, utilizado esencialmente en estudios de seguimiento, estima el RR de padecer una enfermedad en aquellos individuos que han sufrido una exposición respecto a aquellos individuos que no la han sufrido, ajustado por un conjunto de características y que tienen en cuenta el tiempo de exposición a partir de la función del riesgo acumulado (Moliner, 2001).

El modelo de Cox supone:

1. La razón de riesgo de dos individuos es constante a lo largo del tiempo.
2. Los tiempo de “fallo” de los individuos son independientes.
3. Todos los individuos experimentan el “fallo” sólo una vez en la vida.
4. Todos los individuos experimentarán el “fallo”.

#### **Coefficientes del Modelo de Cox:**

$\beta$ : Es el valor de las constantes asociadas al estudio.

*Exponencial de  $\beta$* : Es una medida que cuantifica el riesgo que representa poseer el factor correspondiente respecto a no poseerlo, suponiendo que el resto de variables del modelo permanecen constantes.

*Intervalo de Confianza (IC)*: El Riesgo relativo que podemos considerar como válido no debe incluir el 1 en el intervalo de confianza calculado.

\* Para el análisis estadístico de los datos de este estudio se utilizó el programa SPSS (Statistic Package Social Science) versión 11.0, y el programa Win Episcope 2.0 para realizar el cálculo de los Riesgos Relativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISIS DE DATOS AL DÍA 7

#### 4.1.1. *Efectividad del desafío*

Para comprobar la efectividad del desafío sobre la infección, se realizó el cálculo del Modelo de regresión logística de Cox, utilizando la supervivencia como variable dependiente; y temperatura, edad y desafío como variables independientes. El modelo resultó significativo para las variables edad ( $p = 0.001$ ) y desafío ( $p = 0.002$ ) (Tabla 1). Los animales expuestos al desafío experimental con el virus de WSSV tuvieron 88.7% (1/0.53) más probabilidad de morir que el grupo control no desafiado, con lo que se aseguró la efectividad de la exposición al virus a los 7 días p.i (Tabla 1).

Tabla 1: Modelo de regresión logística de Cox que explica la contribución de las variables temperatura, edad y desafío a la variabilidad de la supervivencia a los 7 días p.i. Nivel de referencia animales no desafiados con WSSV a 33°C y

Variables	$\beta$	ET	gl	$p$	Exp( $\beta$ )
TEMPERATURA	-0.095	0.143	1	0.506	0.910
EDAD	-0.472	0.144	1	0.001	0.624
DESAFIO	-0.634	0.207	1	0.002	0.530

4 meses de edad.

$\beta$ : coeficiente de la ecuación; ET: error estándar de  $\beta$ ; gl: grados de libertad;  $p$ : valor asociado a  $\chi^2$ ; Exp ( $\beta$ ): valor del riesgo relativo.

#### Prevalencia y tiempo de exposición al WSSV

Estudios de prevalencia paralelos a este, encontraron que el estrés al que fueron sometidos los camarones al efectuarse la clasificación por estadíos de muda previa a la distribución en el set experimental N°1, aumentó la probabilidad de encontrar animales positivos al WSSV en 5.5 veces. Así mismo a las 12 h.p.i. los porcentajes de prevalencia para el grupo mantenido a temperatura de 27°C fue para cada estadío de muda: AB = 16%, C = 15%, D<sub>0</sub> = 20%, D<sub>123</sub> = 0% incrementándose a los 7 días p.i. AB = 5.3%, C = 84%, D<sub>0</sub> = 100%, D<sub>123</sub> = 52.6% . Para el grupo de 33°C a las 12 h.p.i. las prevalencias fueron de 0% para todos los estadíos manteniéndose de la misma manera a los 7 días p.i. para los estadíos D<sub>0</sub> y D<sub>123</sub> y para los estadíos AB y C fueron de 17% y 10% respectivamente (M. Pacheco, Fundación CENAIM-ESPOL, Ecuador, comunicación personal).

#### 4.1.2. *Análisis Univariado*

##### 4.1.2.1. Edad como factor de riesgo

##### Análisis estratificado por temperatura

A los 7 días post infección (p.i.) los porcentajes de supervivencia fueron mayores en el grupo de 3 meses de edad en ambas temperaturas (Tabla 2). El valor de los residuos normalizados respalda estos resultados, indicando que a 27 y 33°C de temperatura los animales desafiados a 3 meses tienen más probabilidad de sobrevivir que 4 meses de edad.

Tabla 2: Tabla de contingencia para cada estrato de temperatura en ambas edades residuos normalizados y significancia estadística. Resultados a 7 días p.i.

Temperatura	Estatus	Edad				<i>p</i>
		3meses		4 meses		
		n	%	n	%	
27 °C	Vivo	68	45.3 (3.6)	38	25.3 (-3.6)	0.000
	Muerto	82	54.7(-3.6)	112	74.7(3.6)	
33 °C	Vivo	80	53.3(5.1)	27	22.5 (-5.1)	0.000
	Muerto	70	46.7(-5.1)	93	77.5(5.1)	

Valores de residuos normalizados de Pearson entre paréntesis; *p*. valor asociado a  $\chi^2$ .

El análisis de RR para los valores de supervivencia en función de la edad, indicó que en los animales de 3 meses de edad (grupo expuesto) disminuye el riesgo de mortalidad en un 23% (1/0.811) comparado con el grupo de 4 meses (grupo no expuesto) (Tabla 3).

Para conocer la presencia de interacción entre el factor temperatura y edad sobre la supervivencia se calculó el estadístico Q de Breslow-Day ( $Q_{BD}$ ) ( $p = 0.017$ ), el que indicó diferencias significativas entre los RR de morir en cada temperatura. Al realizar la estratificación por temperatura, se encontró que los animales de 3 meses de edad y desafiados con WSSV a 27°C tienen 33% (1/0.75) menos probabilidad de morir que los animales de 4 meses desafiados con WSSV a 27°C (Tabla 3).

Tabla 3: Riesgos relativos de mortalidad, para la variable edad y estratificados por temperatura. Los animales de 3 y de 4 meses han sido colocados como grupo expuesto y no expuesto respectivamente.

	Valor	IC - 95%	<i>p</i>
RR	0.811	0.799-0.822	
RR <sub>MH</sub>	0.818	0.726-0.922	
$Q_{BD}$			0.017
RR (27°C)	0.750	0.630-0.894	
RR (33°C)	0.903	0.771-1.058	

RR: Riesgo relativo, RR<sub>MH</sub>: Riesgo relativo de Mantel- Haenszel,  $Q_{BD}$ : Estadístico de Breslow-Day; IC: Intervalo de confianza; *p*: valor asociado a  $\chi^2$

Las curvas de supervivencia respaldan los resultados del análisis de RR, observándose diferencias significativas ( $p = 0.0014$ ) en el tiempo en que ocurren las mortalidades. Los animales de 4 meses presentan mortalidades significativamente mayores comparado con los animales de 3 meses (Fig.5).

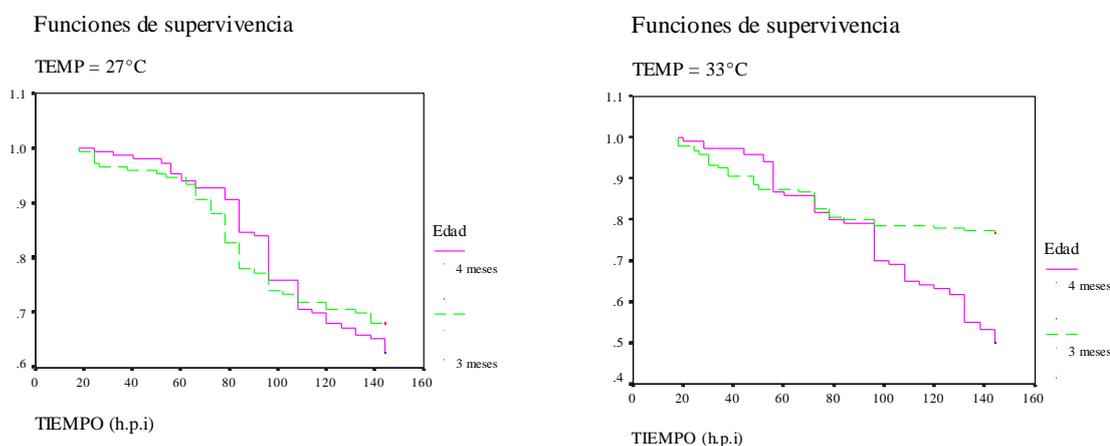


Figura 5: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para animales infectados con WSSV a 3 y 4 meses de edad y estratificado por temperatura (27 y 33°C)

#### Análisis estratificado por estadio de muda

El porcentaje de supervivencia fue mayor en todos los estadios del grupo de animales de 3 meses de edad (Tabla 4). Sin embargo estas diferencias fueron significativas sólo en los estadios AB y D<sub>0</sub>, indicado que en estos estadios los animales de 3 meses tienen más probabilidades de sobrevivir comparados con los de 4 meses (Tabla 4).

Tabla 4: Tabla de contingencia para animales infectados con WSSV en 3 y 4 meses de edad y estratificado según el estadio de muda. Resultados a los 7 días p.i.

Estadio de Muda	Estatus	Edad				p
		3 meses		4 meses		
		n	%	n	%	
AB	Vivo	41	57.7(2.0)	30	42.3(-2.0)	0.041
	Muerto	19	38.8(-2.0)	30	61.2(2.0)	
C	Vivo	41	53.2(1.0)	36	46.8(-1.0)	0.341
	Muerto	19	44.2(-1.0)	24	55.8(1.0)	
D <sub>0</sub>	Vivo	43	63.2(3.3)	25	36.8(-3.3)	0.001
	Muerto	17	32.7(-3.3)	35	67.3 (3.3)	
D <sub>123</sub>	Vivo	43	69.4(0.8)	19	30.6(-0.8)	0.421
	Muerto	17	60.7 (-0.8)	11	39.3(0.8)	

Valores de residuos normalizados de Pearson entre paréntesis; p: valor asociado a  $\chi^2$ .

El análisis del RR para la edad (Tabla 5) indica que animales infectados a los 3 meses, son un factor protector frente al desafío por WSSV. El riesgo a morir varía dependiendo del estadio de muda, teniendo los animales infectados a 3 meses mayores probabilidades de sobrevivir comparado con los animales de 4 meses, en los estadios AB y D<sub>0</sub> con valores de 54 (1/0.64) y 53% (1/0.63) respectivamente.

Tabla 5: Riesgos relativos de mortalidad para la variable edad, estratificado por estadio de muda. Los animales infectados a 3 meses han sido colocados como grupo expuesto y el grupo de 4 meses como no expuesto.

	Valor	IC - 95%	p
RR	0.717	0.700-0.734	0.006
RR <sub>MH</sub>	0.713	0.625-0.813	
Q <sub>BD</sub>			
RR (AB)	0.647	0.510-0.822	
RR (C)	0.833	0.637-1.091	
RR (D <sub>0</sub> )	0.653	0.507-0.841	
RR (D <sub>123</sub> )	0.750	0.556-1.011	

RR: Riesgo relativo, RR<sub>MH</sub>: Riesgo relativo de Mantel-Haenszel, Q<sub>BD</sub>:

Estadístico de Breslow-Day; IC: Intervalo de confianza; p: valor asociado a  $\chi^2$

La prueba de log rank de las curvas de supervivencia sólo mostró diferencias significativas para el estadio D<sub>0</sub> (p = 0.025)(Fig. 6).

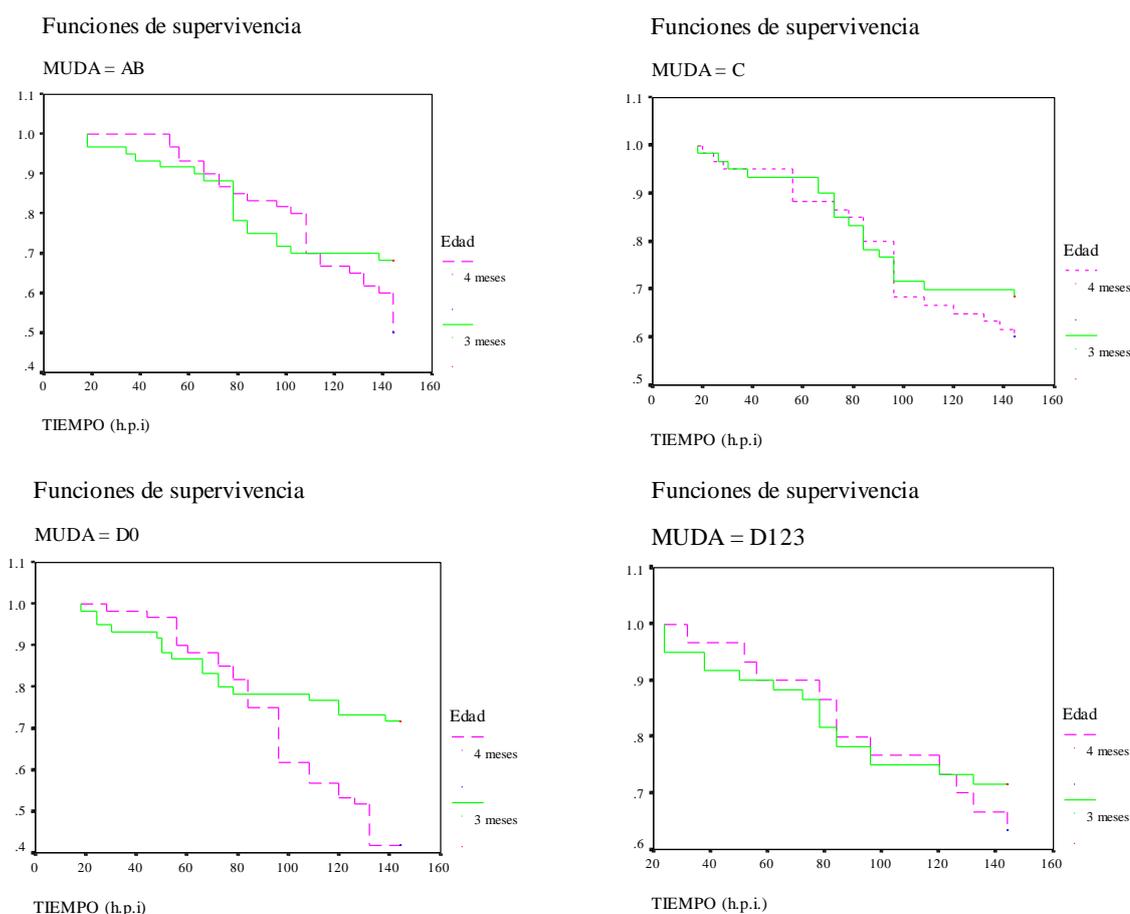


Figura 6: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para animales infectados con WSSV a 3 y 4 meses de edad y estratificado por estadio de muda (AB, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1-2-3</sub>).

#### 4.1.2.2. Temperatura como factor de riesgo

##### Análisis estratificado por estadio de muda

Los valores más altos de supervivencia a los 7 días p.i. se obtuvieron en los animales de 3 meses de edad desafiados y mantenidos a 33°C de temperatura; sin embargo, no se encontró asociación significativa entre temperatura y estadio de muda excepto en animales infectados a 4 meses y en estadio C (Tabla 6).

Animales infectados en estadio de muda C, a 27°C y a 4 meses de edad tiene una menor probabilidad de morir que lo esperado para esa edad, estadio de muda y temperatura (Tabla 6).

Tabla 6: Tabla de contingencia. Residuos normalizados y significancia estadística de animales infectados a 27 y 33°C. Resultados a los 7 días p.i.

Edad	Estadio de Muda	Estatus	Temperatura				p
			27°C		33°C		
			n	%	n	%	
3 meses	AB	Vivo	20	66.7(-0.3)	21	70.0(0.3)	0.781
		Muerto	10	33.3(0.3)	9	30.0(-0.3)	
	C	Vivo	19	63.3(-0.8)	22	73.3(0.8)	0.405
		Muerto	11	36.7(0.8)	8	26.7(-0.8)	
	D <sub>0</sub>	Vivo	19	63.3(-1.4)	24	80.0(1.4)	0.152

		Muerto	11	36.7(1.4)	6	20.0(-1.4)	
	D <sub>123</sub>	Vivo	19	63.3(-1.4)	24	80.0(1.4)	0.152
		Muerto	11	36.7(1.4)	6	20.0(-1.4)	
	AB	Vivo	16	53.3(0.5)	14	46.7(-0.5)	0.606
		Muerto	14	46.7(-0.5)	16	53.3(0.5)	
4 meses	C	Vivo	22	73.3(2.1)	14	46.7(-2.1)	0.035
		Muerto	8	26.7(-2.1)	16	53.5(2.1)	
	D <sub>0</sub>	Vivo	12	40.0(-0.3)	13	43.3(0.3)	0.793
		Muerto	18	60.0(0.3)	17	56.7(-0.3)	
	D <sub>123</sub>	Vivo	19	63.3(0.0)	-	-	-
		Muerto	11	36.7(0.0)	-	-	

Valores de residuos normalizados de Pearson entre paréntesis;  $p$ : valor asociado a  $\chi^2$

No se observó una interacción entre la temperatura y el estadio de muda en animales infectados a 3 y 4 meses (Tabla 7). Sin considerar el estadio de muda el RR indicaría mayor riesgo de morir a 27°C comparado con los animales de 33°C; sin embargo al removerse el efecto de confusión (estadio de muda) no se observó diferencias significativas entre temperatura y supervivencia.

Tabla 7: Riesgos relativos para la temperatura estratificado por estadio de muda en los grupos de edad de 3 y 4 meses. Los animales infectados a 27 y 33°C han sido fijados como grupo expuesto y no expuesto respectivamente.

Edad		Valor	IC - 95%	$p$
3 meses	RR	1.483	1.391-1.581	0.731
	RR <sub>MH</sub>	1.483	0.999-2.200	
	Q <sub>BD</sub>			
4 meses	RR	0.850	0.832-0.869	0.380
	RR <sub>MH</sub>	0.885	0.645-1.215	
	Q <sub>BD</sub>			

RR: Riesgo relativo, RR<sub>MH</sub>: Riesgo relativo de Mantel-Haenszel,

Q<sub>BD</sub>: Estadístico de Breslow-Day., IC: Intervalo de confianza;

$p$ : valor asociado a  $\chi^2$ .

Kaplan-Meier compara las curvas a 27 y 33°C de supervivencia en cada estadio de muda. Para los animales de 3 meses de edad, sólo se muestran diferencias de supervivencia en los estadios de muda D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub>, donde los animales de 33°C tienen supervivencias mayores que los desafiados a 27°C (Fig 7).

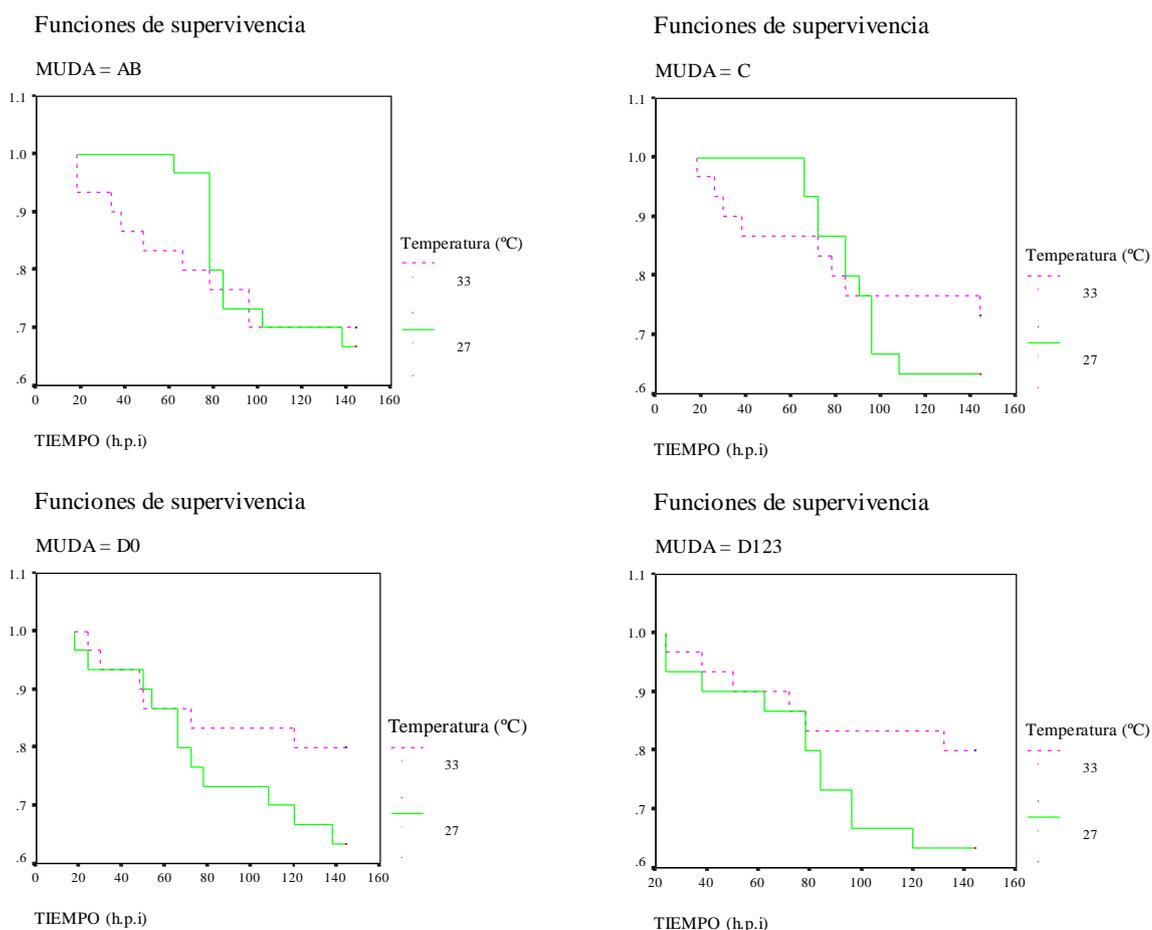


Figura 7: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en animales de 3 meses infectados con WSSV a 27 y 33°C y estratificado por estadio de muda (AB, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1-2-3</sub>).

4.1.2.3. Muda como factor de riesgo  
Análisis estratificado por temperatura

Los valores de *p* (Tabla 8) no muestran valores significativos para la asociación de estadios de muda y la supervivencia a ninguna temperatura y a ninguna edad a los 7 días p.i.; sin embargo, los valores de los residuos tipificados de 2.0 para el estadio de muda C a 27°C y en el grupo de 4 meses de edad, indica que los animales en ese estadio tienen más probabilidad de sobrevivir de lo esperado y el valor de -2.2 para el estadio D<sub>0</sub>, indicaría que en este estadio los animales tienen más probabilidades de morir que lo esperado. Al observar que el estadio de intermuda (C) tiene un comportamiento diferente al resto de estadios, se creó una nueva variable agrupando los estadios correspondientes a las muda (AB, D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub>) y contrastando con el periodo de intermuda (C) se calcularon los residuos tipificados para la nueva variable, pero no se encuentran mayores diferencias entre los valores esperados (Tabla 9).

Tabla 8: Tabla de contingencia en función de la muda en el momento de la infección, estratificado por temperatura y edad. Resultados a 7 días p.i.

Edad	Temperatura °C	Status	Estadios de Muda				<i>p</i>
			AB	C	D <sub>0</sub>	D <sub>123</sub>	

			n	%	n	%	n	%	n	%	
3 meses	27	Vivo	20	66.7(0.3)	19	63.3(-0.1)	19	63.3(-0.1)	19	63.3(-0.1)	0.991
		Muerto	10	33.3(-0.3)	11	36.7(0.1)	11	36.7(0.1)	11	36.7(0.1)	
	33	Vivo	21	70.0(-0.9)	22	73.3(-0.4)	24	80.0(0.6)	24	80.0(0.6)	0.746
		Muerto	9	30.0(0.9)	8	26.7(0.4)	6	20.0(-0.6)	6	20.0(-0.6)	
4 meses	27	Vivo	16	53.3(-0.5)	22	73.3 (2.0)	12	40.0(-2.2)	19	63.3(0.7)	0.058
		Muerto	14	46.7(0.5)	8	26.7(-2.0)	18	60.0(2.2)	11	36.7(-0.7)	
	33	Vivo	14	46.7(-0.1)	14	46.7(-0.1)	13	43.3(0.3)	-	--	0.956
		Muerto	16	53.3(0.1)	16	53.3(0.1)	17	56.7(-0.3)	-	--	

Valores de residuos normalizados de Pearson entre paréntesis;  $p$ : valor asociado a  $\chi^2$ .

Tabla 9: Porcentaje de supervivencia, residuos normalizados y significancia estadística para los animales en estadios de muda (AB, D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub>) agrupados y estratificados según la edad.

Edad	Grupo de Muda		$p$
	Muda (AB, D <sub>0</sub> y D <sub>1-2-3</sub> )	C	
3 m	70.6% (0.3)	68.3% (-0.3)	0.745
4 m	49.3% (-1.4)	50.7% (1.4)	0.162

Valores de residuos normalizados de Pearson entre paréntesis

$p$ : valor asociado a  $\chi^2$

En el cálculo de los RR generales indicaron que a 7 días después del desafío los estadios de muda AB, D<sub>0</sub> y D<sub>123</sub> son un factor de riesgo es decir que tienen mayor probabilidad de morir en un 9% frente a la infección con WSSV en ambas edades ( $p = 0.308$ ) y temperaturas ( $p = 0.248$ ) comparados con el estadio de intermuda.

#### 4.1.3. Análisis Multivariado

##### Modelo de regresión logística de Cox

Los RR calculados como  $\text{Exp}(\beta)$  indican que exponer a infecciones con WSSV en temperaturas de 27°C a camarones juveniles de *P. vannamei* el riesgo de morir es indiferente a la temperatura de infección; de la misma manera se encontró que los animales expuestos a la infección en estadio D<sub>123</sub> tienen más riesgo de morir que aquellos expuestos en estadios AB, C y D<sub>0</sub>; sin embargo estos resultados no muestran significancia estadística. Mientras que para la variable edad la asociación fue significativa ( $p = 0.003$ ), indicando que la edad de 3 meses se comporta como un factor protector en un 58% (1/0.63) frente a infecciones de WSSV comparado con la edad de 4 meses (Tabla 10).

Tabla 10: Modelo de regresión logística de Cox que explica la contribución de las variables temperatura, muda y edad sobre la variabilidad de la mortalidad. A los 7 días p.i. Los niveles de referencia son temperatura de 33°C, edad de 4 meses y estadio de muda D<sub>123</sub>.

	$\beta$	ET	$p$	Exp ( $\beta$ )	95% IC para Exp ( $\beta$ )	
					Limite Inferior	Limite Superior
TEMPERATURA	0.017	0.156	0.912	1.017	0.750	1.381
MUDA			0.507			
AB	0.209	0.241	0.386	1.232	0.769	1.975
C	0.091	0.246	0.712	1.095	0.676	1.773
D <sub>0</sub>	0.325	0.239	0.173	1.384	0.867	2.209
EDAD	-0.459	0.157	0.003	0.632	0.465	0.860

$\beta$ : coeficiente de la ecuación; ET: error estándar de  $\beta$ ; gl: grados de libertad; Exp ( $\beta$ ): valor del riesgo relativo;  $p$ : valor asociado a  $\chi^2$ .

## 4.2. ANÁLISIS DE DATOS AL DÍA 15

### 4.2.1. Efectividad del desafío

El modelo de regresión logística de Cox fue también significativa para la variable desafío a los 15 días p.i. Los animales desafiados a 12 horas de exposición al WSSV, tienen 80% (1/0.55) más probabilidades de morir que los no desafiados, asegurando así la efectividad de la infección (Tabla 11).

Tabla 11: Modelo de regresión logística de Cox que explica la contribución de las variables temperatura, edad y desafío a la variabilidad de la supervivencia a los 15 días p.i. Nivel de referencia, animales no desafiados con WSSV.

VARIABLES EN LA ECUACIÓN	$\beta$	ET	gl	$p$	Exp( $\beta$ )
TEMPERATURA	0.009	0.107	1	0.932	1.009
EDAD	-0.634	0.108	1	0.000	0.530
DESAFIO	-0.589	0.147	1	0.000	0.555

$\beta$ : Coeficiente de la ecuación; Et: error estándar de  $\beta$ ; gl: grados de libertad; Exp ( $\beta$ ): valor del riesgo relativo;  $p$ : valor asociado  $\chi^2$ .

### 4.2.2. Análisis Univariado

#### 4.2.2.1. Edad como factor de riesgo

##### Análisis estratificado por temperatura

Los porcentajes de supervivencia fueron mayores en el grupo de camarones infectados a la edad de 3 meses comparado con el grupo de 4 meses. Existe una fuerte asociación de la edad con la supervivencia independiente de la temperatura de infección ( $p = 0.000$ ). Los residuos tipificados confirman que los animales infectados a 3 meses de edad ya sea a 27 ó 33°C de temperatura tienen más probabilidades de sobrevivir comparados con los de 4 meses (Tabla 12).

Tabla 12: Tabla de contingencia para cada estrato de temperatura. en ambas edades, residuos normalizados y significancia estadística. Resultados a 15 días p.i.

Temperatura	Estatus	Edad				$p$
		3meses		4 meses		
		n	%	n	%	
27 °C	Vivo	57	38.3(2.7)	33	22.3(-2.7)	0.000
	Muerto	93	61.7(-2.7)	117	77.7(2.7)	
33 °C	Vivo	72	48.3(4.4)	28	18.9(-4.4)	0.000
	Muerto	78	51.7(-4.4)	122	81.1(4.4)	

Valores de residuos normalizados de Pearson entre paréntesis;  $p$ : valor asociado a  $\chi^2$ .

El cálculo de RR (Tabla 13) para los valores de supervivencia (en función de la edad) indican que los animales infectados a los 3 meses tienen un 39.5 % (1/0.717) más probabilidad de sobrevivir con respecto a los de 4 meses. Al calcular el RR de Mantel y Haenszel, considerando la temperatura como variable de confusión, obtenemos un valor

significativo de 0.724 que nos confirma que los animales de menor edad tienen mayor probabilidad de sobrevivir (Tabla 13).

Para establecer la existencia de interacción entre el factor temperatura y edad sobre la supervivencia se calculó el estadístico Q de Breslow Day (QBD) ( $p = 0.0001$ ), lo que indicó diferencia significativa entre los RR de cada temperatura, por lo que se procedió al cálculo de los RR de cada estrato, y se obtuvo que los animales infectados a 33°C tienen 56.9% (1/0.637) más probabilidad de sobrevivir que aquellos infectados a 27°C que presentan sólo un 25.6% (1/0.79) de probabilidad de sobrevivir a la infección por WSSV.

Tabla 13: Riesgos relativos de mortalidad, para la variable edad, estratificados por temperatura. Los animales de 3 meses han sido colocados como el grupo expuesto y los de 4 meses el grupo no expuesto.

	Valor	IC - 95%	$p$
RR	0.717	0.700 - 0.734	
RR <sub>MH</sub>	0.724		
Q <sub>BD</sub>			0.0001
RR (27 °C)	0.796	0.672– 0.942	
RR (33 °C)	0.637	0.521 – 0.779	

RR: Riesgo relativo, RR<sub>MH</sub>: Riesgo relativo de Mantel-Haenszel, Q<sub>BD</sub>: Estadístico de Breslow-Day., IC: Intervalo de confianza;  $p$ : valor asociado a  $\chi^2$

Al realizar la estimación de las curvas de supervivencia para la edad ajustada a la temperatura usando el método de Kaplan-Meier y la comparación de las mismas por la prueba de Log rank, se confirma con un valor de significancia de  $p = 0.000$  que existe diferencia en las curvas de supervivencia influenciadas por la edad siendo mayor en los animales de 3 meses independientemente de la temperatura en la que se encuentren en el momento de desafío (Fig. 8).

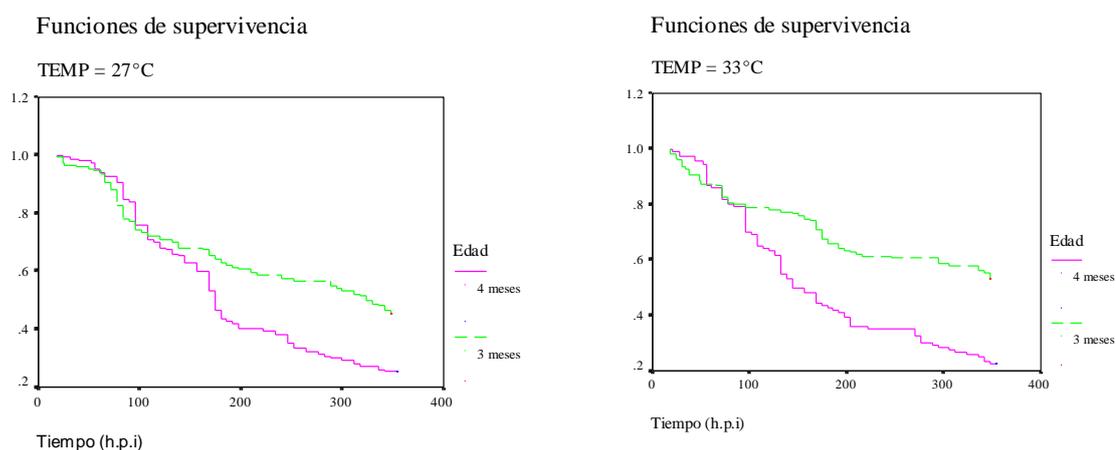


Figura 8: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para animales infectados con WSSV para 3 y 4 meses, estratificado por temperatura.

#### Análisis estratificado por estadio de muda

El porcentaje de supervivencia fue mayor en los animales de menor edad independientemente del estadio que fueron infectados. Los residuos normalizados indican que además en el grupo de menor edad los estadios AB y D<sub>0</sub> presentan una mayor probabilidad de sobrevivir comparados con los de mayor edad (Tabla 14).

Tabla 14: Tabla de contingencia para animales infectados con WSSV en 3 y 4 meses de edad y estratificado según el estadio de muda. Resultados a 15 días p.i.

Estadio de Muda	Estatus	Edad				<i>p</i>
		3 meses		4 meses		
		n	%	n	%	
AB	Vivo	27	75.0(3.6)	9	25.0(-3.6)	0.000
	Muerto	33	39.3(-3.6)	51	60.7(3.6)	
C	Vivo	25	58.1(1.3)	18	41.9(-1.3)	0.183
	Muerto	35	45.5(-1.7)	42	54.5(1.3)	
D <sub>0</sub>	Vivo	28	71.8(3.3)	11	28.2(-3.3)	0.001
	Muerto	32	39.5(-3.3)	49	60.5(3.3)	
D <sub>123</sub>	Vivo	24	80.0(1.9)	6	20.0(-1.9)	0.058
	Muerto	36	60.0(-1.9)	24	40.0(1.9)	

Valores de residuos tipificados de Pearson entre paréntesis; *p*: valor asociado a  $\chi^2$ .

El riesgo de morir de los animales desafiados con WSSV a 3 meses de edad fue significativamente distinto según el estadio de muda, por lo que se realizó un estudio estatificado de los RR para cada estadio obteniéndose que los animales infectados a 3 meses y en los estadios de muda AB y D<sub>0</sub>, presentaron 55% (1/0.64) y 53% (1/0.65) más probabilidad de sobrevivir que los camarones desafiados a 4 meses, a los 15 días p.i.

Tabla 15: Riesgos relativos de muerte para la variable edad y estratificado por estadio de muda. Los animales de 3 meses han sido colocados como grupo expuesto y el grupo de 4 meses como no expuesto.

	Valor	IC - 95%	<i>p</i>
RR	0.717	0.700 - 0.734	0.0001
RR <sub>MH</sub>	0.713	0.625 - 0.813	
Q <sub>BD</sub>			
RR (AB)	0.647	0.510- 0.822	
RR (C)	0.833	0.637- 1.091	
RR (D <sub>0</sub> )	0.653	0.507 - 0.841	
RR (D <sub>123</sub> )	0.750	0.556- 1.011	

RR: Riesgo relativo, RR<sub>MH</sub>: Riesgo relativo de Mantel- Haenszel, Q<sub>BD</sub>: Estadístico de Breslow-Day., IC: Intervalo de confianza; *p*: valor asociado a  $\chi^2$

Al comparar las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (*p* = 0.000), se respalda los resultados anteriores, encontrando diferencias significativas en las supervivencia de los diferentes grupo de edad en los estadios AB y D<sub>0</sub> (Fig.9).

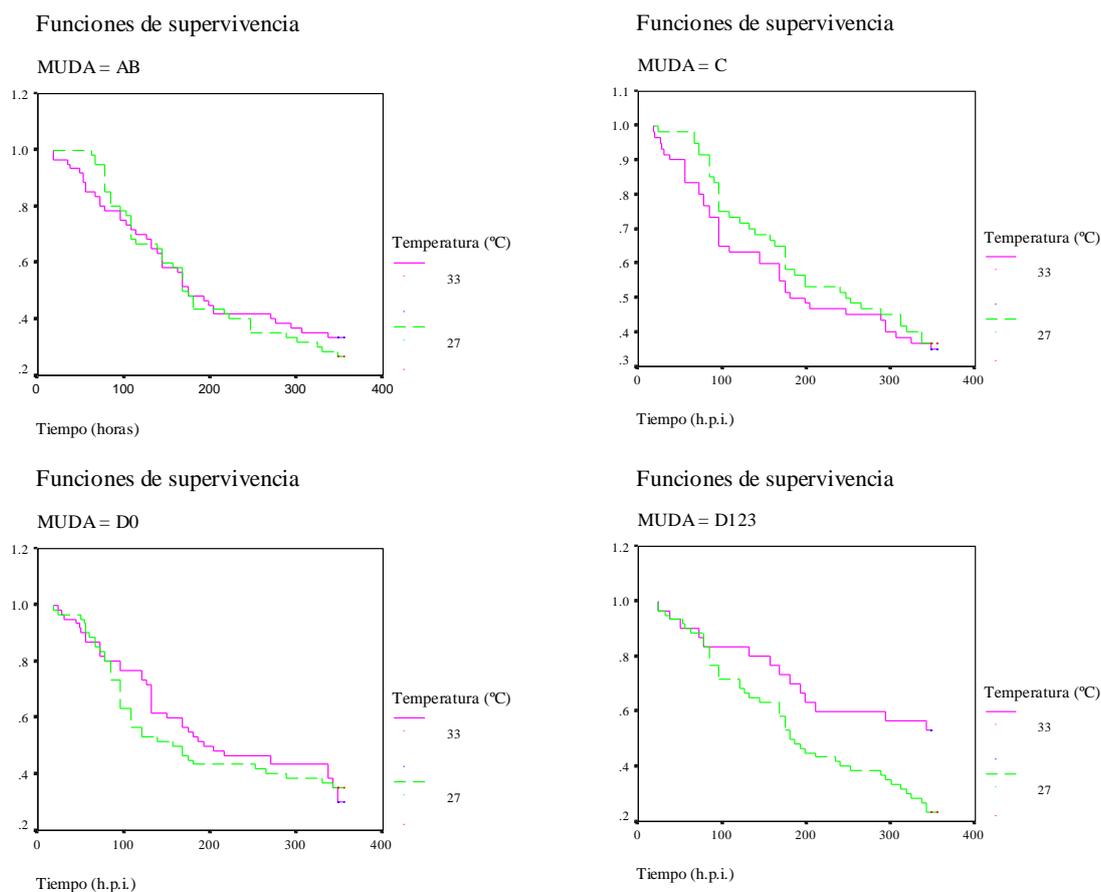


Figura 9: Curvas de supervivencia por Kaplan-Meier para animales infectados con WSSV en dos edades (3 y 4 meses) y estratificado por estadio de muda (AB, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1-2-3</sub>).

#### 4.2.2.2. Temperatura como factor de riesgo

##### Análisis estratificado por estadio de muda

Al igual que a los 7 días p.i. la mayor supervivencia se obtuvo en los animales de 3 meses de edad que además fueron desafiados y mantenidos a 33°C de temperatura por 7 días. Sin embargo, el valor de  $p$  no fue significativa para la relación de temperatura con supervivencia ( $p > 0.05$ ), sólo en estadio D<sub>1-2-3</sub> del grupo de 3 meses. Por otro lado, en el grupo de 4 meses de edad, las supervivencias fueron menores a temperaturas de 33°C comparados con los de 27°C (Tabla 16).

Los valores de los residuos corregidos en la Tabla 18, indican que los animales infectados en el estadio de muda D<sub>1-2-3</sub> a 27°C y a menor edad tiene una menor probabilidad de sobrevivir que lo esperado, siendo posible considerar a la temperatura de 27°C como un factor crítico en este estadio de muda, no ocurriendo así para el resto de estadios pero para los animales de 4 meses de edad no fue posible el cálculo por la pérdida de todo el grupo en ese estadio al comenzar el experimento.

Tabla 16: Tabla de contingencia. Residuos normalizados y significancia estadística de animales infectados a 27 y 33°C . La tabla está estratificada por estadios de muda. Resultados a 15 días p.i.

Edad	Estadio	Estatus	Temperatura	$p$
------	---------	---------	-------------	-----

de muda		27°C		33°C				
		n	%	n	%			
3 meses	AB	Vivo	12	40.0(-0.8)	15	50.0(0.8)	0.436	
		Muerto	18	60.0(0.8)	15	43.3(-0.8)		
	C	Vivo	12	40.0(-0.3)	13	43.3(0.3)	0.793	
		Muerto	18	60.0(0.3)	17	56.7(-0.3)		
	D <sub>0</sub>	Vivo	14	46.7(0.0)	14	46.7(0.0)	1.000	
		Muerto	16	53.3(0.0)	16	53.3(0.0)		
	D <sub>123</sub>	Vivo	8	26.7(-2.1)	16	53.3(2.1)	0.035	
		Muerto	22	73.3(-2.1)	14	46.7(-2.1)		
	4 meses	AB	Vivo	4	13.3(-0.4)	5	16.0(0.4)	0.718
			Muerto	26	86.7(0.4)	25	84.0(-0.4)	
C		Vivo	10	33.3(0.6)	8	26.7(-0.6)	0.573	
		Muerto	20	66.7(-0.6)	22	73.3(0.6)		
D <sub>0</sub>		Vivo	7	23.3(-1.0)	4	13.3(1.0)	0.317	
		Muerto	23	76.7(1.0)	26	86.7(-1.0)		
D <sub>123</sub>		Vivo	6	20.0 --	-	--	--	
		Muerto	24	80.0 --	-	--		

Valores de residuos tipificados de Pearson entre paréntesis;  $p$ : valor asociado a  $\chi^2$

El cálculo de RR no muestran valores significativos (Tabla 17), indicando que, para ambos grupos de edad (3 y 4 meses) la temperatura no tuvo efecto sobre la supervivencia. Sin embargo, al observar el intervalo de confianza para el RR<sub>MH</sub> para ambas edades este valor se comporta como un factor de confusión (con un límite inferior protector y un límite superior de riesgo). Para eliminar este factor de confusión se calculó el estadístico Q<sub>BD</sub> que arrojó un valor no significativo para ambas edades ( $p > 0.05$ ).

Tabla 17: Riesgos relativos para la temperatura (grupo expuesto 27°C) estratificado por estadio de muda en los grupos de edad de 3 y 4 meses

Edad		Valor	IC - 95%	$p$
3 meses	RR	1.194	1.172-1.215	0.894
	RR <sub>MH</sub>	1.194	0.955-1.492	
	Q <sub>BD</sub>			
4 meses	RR	0.955	0.953-0.958	0.751
	RR <sub>MH</sub>	0.945	0.813-1.099	
	Q <sub>BD</sub>			

RR: Riesgo relativo, RR<sub>MH</sub>: Riesgo relativo de Mantel-Haenszel,  
 Q<sub>BD</sub>: Estadístico de Breslow-Day., IC: Intervalo de confianza;  
 $p$ : valor asociado a  $\chi^2$

El cálculo de Log rank para la comparación de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Fig.10) en el grupo de 3 meses de edad, confirma que la temperatura teniendo en cuenta los diferentes estadios de muda no influye en las supervivencias ( $p = 0.1505$ ), a los 15 días p.i.

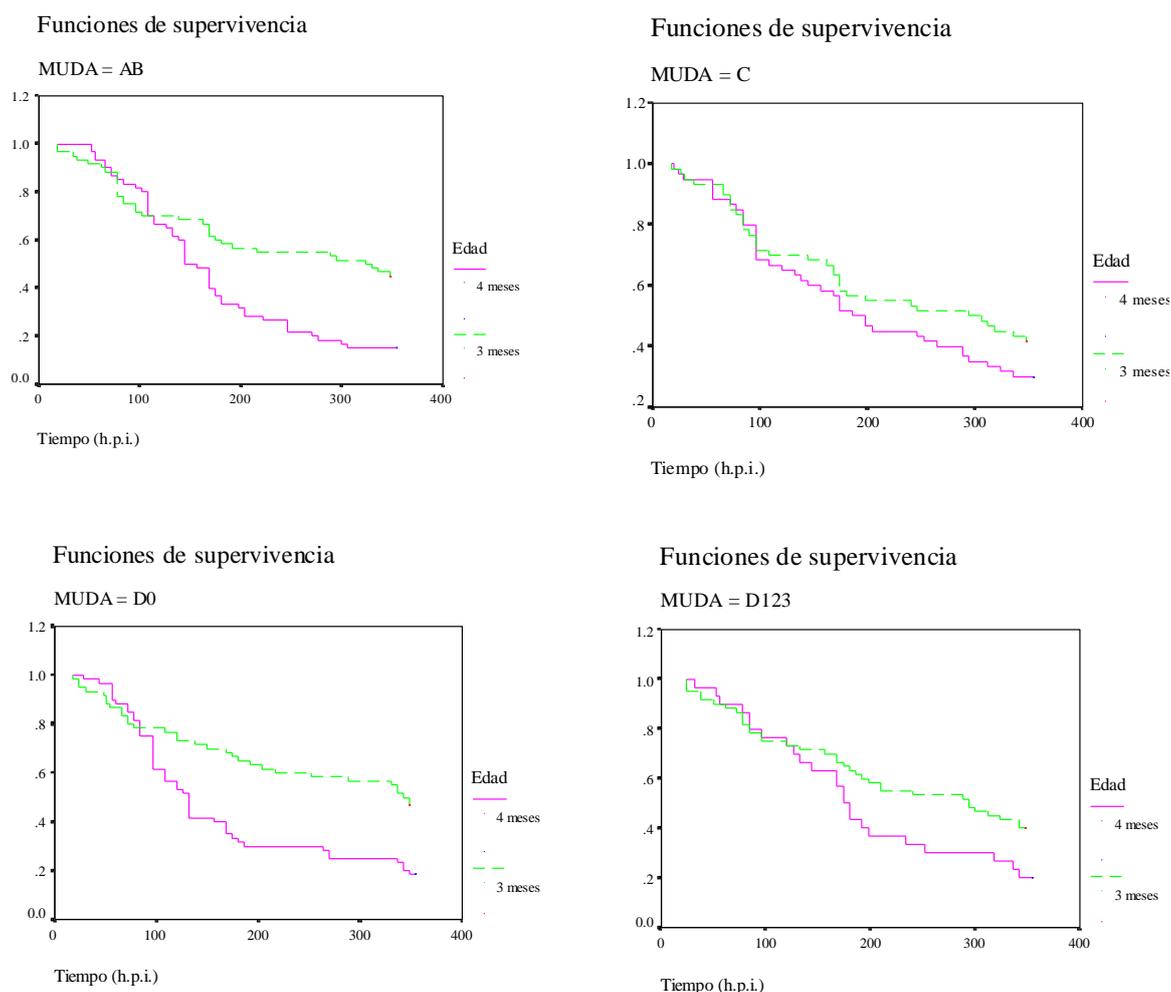


Figura 10: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para animales infectados con WSSV en diferentes estadios de muda (AB, C, D<sub>0</sub>, D<sub>123</sub>) y estratificado por temperatura

#### 4.2.2.3. Muda como factor de riesgo

##### Análisis estratificado por temperatura

Los valores de  $p$  en la Tabla 18, muestran que el estadio de muda en la infección no influye en la supervivencia a temperatura, aún siendo la supervivencia mayor en 33°C para el grupo de edad de tres meses, los valores de los residuos tipificados respaldan este resultado; sin embargo al observar que el estadio de intermuda (C) tiene un comportamiento diferente a los periodos de muda (AB, D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub>) de la misma forma que a los 7 días p.i. se creó una nueva variable agrupando los animales en estadios de muda AB, D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub> y calculando los residuos tipificados para la nueva variable que nos dicen que los estadios de muda (AB, D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub>) tienen menor probabilidad de sobrevivir que lo esperado frente al estadio de intermuda (Tabla 19).

Tabla 18: Tabla de contingencia en función de la muda en el momento de la infección, estratificado por temperatura y edad. Resultados a 15 días p.i.

Edad	Temperatura °C	Estatus	Estadíos de Muda								<i>p</i>	
			AB		C		D <sub>0</sub>		D <sub>123</sub>			
			n	%	n	%	n	%	n	%		
3 meses	27	Vivo	12	40.0(0.2)	12	40.0(0.2)	14	46.7(1.1)	8	26.7(-1.5)	0.444	
		Muerto	18	60.0(-0.2)	18	60.0(-0.2)	16	53.3(-1.1)	22	73.3(1.5)		
	33	Vivo	15	50.0(0.2)	13	43.3(-0.6)	14	46.7(-0.2)	16	53.3(0.6)		0.881
		Muerto	15	50.0(-0.2)	17	56.7(0.6)	16	53.3(0.2)	14	46.7(-0.6)		
4 meses	27	Vivo	4	13.3(-1.4)	10	33.3(1.6)	7	23.3(0.1)	6	20.0(-0.4)	0.310	
		Muerto	26	86.7(-1.4)	20	66.7(-1.6)	23	76.6(-0.1)	24	80.0(0.4)		
	33	Vivo	5	16.7(-0.4)	8	26.7(1.3)	4	13.3(-1.0)	-	--		0.390
		Muerto	25	83.3(0.4)	22	73.3(-1.3)	26	86.7(0.1)	-	--		

Valores de residuos normalizados de Pearson entre paréntesis; *p*: valor asociado a  $\chi^2$

Tabla 19: Porcentaje de supervivencia, residuos normalizados y significancia estadística para los animales en estadio de muda (AB, D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub>) agrupados y estratificados según la edad.

Edad	Grupo de Muda			<i>p</i>
	Muda	C		
	(AB, D <sub>0</sub> y D <sub>1-2-3</sub> )			
3 m	43.9% (0.3)	41.7% (-0.3)		0.764
4 m	17.3% (-2.0)	30.0% (2.0)		0.042

Valores de residuos normalizados de Pearson entre paréntesis;

*p*: valor asociado a  $\chi^2$

En el cálculo de RR, indica que los animales en los estadios de muda AB, D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub> infectados con WSSV representan un factor de riesgo mayor que si son infectados en estadios de intermuda (C) indiferentemente de la edad o la temperatura (*p* = 0.426).

Tabla 20: Riesgos relativos de mortalidad para el grupo de muda estratificado por edad, siendo el grupo expuesto los animales infectados en los estadios de muda AB, D<sub>0</sub>, D<sub>1-2-3</sub> y el grupo no expuesto animales infectados en intermuda C.

	Valor	IC - 95%	<i>p</i>
RR	1.063	1.060-1.065	
RR <sub>MH</sub>	1.194	0.935-1.246	
Q <sub>BD</sub>			0.060

RR: Riesgo relativo, RR<sub>MH</sub>: Riesgo relativo de Mantel-Haenszel, Q<sub>BD</sub>: Estadístico de Breslow-Day.,

IC: Intervalo de confianza; *p*: valor asociado a  $\chi^2$

#### 4.2.3. Análisis Multivariado

##### Modelo de regresión logística de Cox

Al incluir el estadio de muda, temperatura y edad como variables explicatorias de la variabilidad de la supervivencia, la regresión logística de Cox muestra asociación significativa sólo para la variable edad con valores de *p* < 0.001, (Tabla 21). El RR calculado como Exp ( $\beta$ ) indican que exponer a animales al WSSV en temperaturas de agua de 27°C representa un factor de riesgo, así como exponerlo a virus en estadios de muda específicos; sin embargo estos valores no fueron significativos. Por otro lado la variable edad se muestra como un factor protector indicando que los animales de menor edad expuestos al WSSV presentan más de probabilidad de sobrevivir (1/0.572) que aquellos expuestos en mayor edad.

Tabla 21: Modelo de regresión logística de Cox. que explica la contribución de las variables temperatura, muda y edad sobre la variabilidad de la supervivencia. A los 15 días p.i. Los niveles de referencia son temperatura de 33°C, edad de 4 meses y estadio de muda D<sub>123</sub>.

	$\beta$	ET	$p$	Exp ( $\beta$ )	95% IC para Exp ( $\beta$ )	
					Limite Inferior	Limite Superior
TEMPERATURA	0.051	0.118	0.665	1.053	0.835	1.327
MUDA			0.706			
AB	0.066	0.171	0.699	1.069	0.764	1.496
C	-0.110	0.175	0.527	0.895	0.636	1.261
D <sub>0</sub>	0.034	0.173	0.842	1.035	0.737	1.453
EDAD	-0.559	0.119	0.000	0.572	0.453	0.722

$\beta$ : Coeficiente de la ecuación; Et: error estándar de  $\beta$ ; gl: grados de libertad; Exp ( $\beta$ ): valor del riesgo relativo;  $p$ : valor asociado a  $\chi^2$

## 5. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue establecer la influencia de distintos factores fisiológicos (edad y estadio de muda ) y de manejo (temperatura) sobre la susceptibilidad a la infección por WSSV.

En ensayos con infecciones virales o desafíos, un factor importante a considerar en el momento de analizar los resultados es la eficiencia de la infección. Es importante poder asegurar que la infección ha sido adecuada para atribuir la mortalidad de los animales a la exposición al virus. Existen varios métodos para desafiar de manera experimental a crustáceos en laboratorio como: inyección de un extracto de tejido infectado (Tapay *et al.*, 1997), inmersión en agua conteniendo extracto viral (Chou *et al.*, 1995) e ingestión de tejido infectado (Lightner y Redman, 1998). El método de infección por ingestión es el más usado por que recrea las vías de transmisión natural del virus durante los brotes (Lotz y Soto, 2002).

En este estudio se utilizó el método de inmersión debido a que un factor de experimentación fue la infección en diferentes estadios de muda. En los camarones peneidos hay un ayuno fisiológico en la preparación para la muda y sólo se alimentan de forma normal en estadio de intermuda (Shin y Chin, 1994; Cadenas, 2000). Por esta razón el método de ingestión no era el más adecuado para exponer a los camarones en diferentes estadios de muda al WSSV y determinar que estadio se presenta como un factor de riesgo. Una desventaja de este método con respecto a los demás es que no es un método de infección eficaz (mortalidades menores de 24% vs 64% por ingestión de tejido infectado) (Wu *et al.*, 2001), sin embargo era el más adecuado en este caso. Los resultados de prevalencia (no mostrados en esta tesis) y supervivencia de los animales infectados versus el control (al séptimo día y al final del experimento) comprueban que el desafío fue efectivo, debido a que los animales desafiados murieron en un porcentaje significativamente mayor que los no desafiados (control). Por ende los resultados expuestos corresponden a efectos directos del desafío.

En este estudio se realizaron infecciones con WSSV a juveniles de *P. vannamei* de 3 y 4 meses de edad. Los resultados muestran que al considerar la edad como un factor de riesgo, las mayores supervivencias se presentaron en el grupo de animales de 3 meses, tanto a los 7 días post infección como a los 15 días (fin del experimento), independientemente del estadio de muda y la temperatura a la que fueron desafiados con el virus de la Mancha Blanca, apoyando la hipótesis de que el tamaño (si se considera que animales más grandes tienen más edad) juega un papel importante en el proceso infeccioso. Este resultado corrobora otros experimentos de desafío con WSSV, en los que se comparó las supervivencias a diferentes edades. Venegas *et al.* (1999) demostró que la virulencia del WSSV en *P. japonicus* no era detectable antes de PL10, y que las mortalidades de PL20 eran más bajas que en PL30. Kasornchandra *et al.* (1998) encontraron que el WSSV se manifiesta en juveniles de camarón de todas las edades y tallas, siendo las edades de mayor susceptibilidad entre 1 ó 2 meses después de la siembra en estanques. De la misma manera, F. Pérez, Fundación CENAIM-ESPOL, Ecuador, comunicación personal, observó mortalidades masivas en PL30 mucho más altas que en PL20 de *P. vannamei*. Estos estudios soportan la idea de una mayor resistencia al WSSV en estadios tempranos indicando que la susceptibilidad al virus depende de la "talla". Peng *et al.* (1998) reportó que especímenes adultos de *P. monodon* infectados

ligeramente con WSSV son capaces de sobrevivir indefinidamente. Withyachumnarkul *et al.* 2003, examinaron muestras de reproductores y PL silvestres positivos a WSSV por PCR recolectados en 3 años de estudio, encontrando una prevalencia de la enfermedad de  $5.1 \pm 4.9$  % para reproductores y  $4.8 \pm 3.0$  % para PL pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Al analizar la susceptibilidad al WSSV en diferentes fases del ciclo de vida del camarón, las observaciones y resultados de los estudios disponibles parecerían ser contradictorios. Se menciona que el WSSV es capaz de infectar estadios tempranos (larvas y postlarvas) pero las mortalidades y prevalencias presentadas son bajas. En fases como juveniles y preadultos los animales son propensos a morir al ser infectados presentándose los problemas en camaroneras. Finalmente animales adultos (reproductores) no mueren al ser desafiados con WSSV en los que debería esperarse una menor supervivencia, esto indicaría que aunque no se han reportado mortalidades por WSSV en camarones adultos (reproductores). Bajo este esquema de susceptibilidad es evidente que existe una fase de menor resistencia al virus en animales juveniles. La explicación de este hecho no es clara. Podría decirse que en animales adultos el sistema inmune es maduro con respecto a juveniles (J. Rodríguez, Fundación CENAIM-ESPOL, Ecuador, comunicación personal) y por ende tiene una mayor capacidad para hacerle frente a infecciones de diferente tipo. Sin embargo, animales de etapas muy tempranas son poco susceptibles; la razón por la que las larvas infectadas no desarrollan la enfermedad debería ser investigada. Algunos investigadores como Yoganandhan *et al.* (2003) sugieren que el virus es incapaz de replicarse o tarda en replicarse lo suficientemente rápido en estadios tempranos como para llegar a desarrollarse la enfermedad.

Por otra parte, teniendo en cuenta que los crustáceos necesitan mudar para crecer, se podría explicar los resultados de edad en términos de muda. Si la presencia de una cutícula o exoesqueleto calcificado en crustáceos impone una barrera frente a infecciones (Kinne, 1980; Sugumaran, 1996), mientras esta cutícula esté presente, existe cierta protección frente al ingreso de WSSV. El único momento en el que esta barrera deja de ser una protección es al momento de la muda representando un momento propicio para que virus, bacterias o patógenos en general ingresen al organismo de una manera directa. Los animales pequeños tienden a mudar con mayor frecuencia que los animales grandes (Passano, 1961; Cadenas, 2000). Por tanto en animales pequeños, el virus tendría menor tiempo de entrar debido a lo rápido que suceden las mudas y su posterior calcificación (O' Brien *et al.*, 1993). Engelhard y Volkman, (1995) citados en Beckage (1996) observaron que en insectos el baculovirus aprovecha para infectar al animal inmediatamente después de la ecdisis, periodo durante el cual se transporta por el conducto traqueal (normalmente cubierto de cutícula) ingresando por el intestino medio (que no tiene cutícula) y llegando al hemocele desde el cual infecta al resto de órganos a través de la hemolinfa.

En términos de estado inmune durante la muda, las células efectoras del sistema inmune (hemocitos) migran a la superficie para proteger al epitelio cuticular que al desprenderse puede ser una puerta de entrada para cualquier patógeno (Hose *et al.*, 1992). Esta migración periférica hace que el porcentaje de hemocitos en los órganos restantes (intestino medio, hemocele, hepatopáncreas, etc) bajen por lo que se dice que el sistema

inmune está deprimido en términos generales (Le Moullac *et al.*, 1997; Echeverría *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta la similitud de la fisiología entre insectos y crustáceos, es posible considerar la muda como una “ventana temporal” que el virus aprovecha para ingresar atravesando el intestino, llegando al hemocele y de allí diseminarse a diferentes órganos, en los cuales el sistema inmune estaría “distráido” pues está dirigiendo su acción hacia el epitelio cuticular que al desprenderse se ha convertido en una puerta de entrada a cualquier patógeno (Beckage, 1996). La probabilidad de que esto ocurra sería menor cuando las mudas son más rápidas lo que no le daría oportunidad al virus de encontrar fácilmente estas vías de acceso.

Con respecto a los resultados obtenidos con temperatura, en el presente estudio, no hubo diferencias significativas, a los 7 y 15 días de experimento (sin considerar estadio de muda y edad) aún cuando la temperatura de 33°C presentó las mayores supervivencias (Kaplan Meier) comparada con la de 27 °C, por ende se ha propuesto que a temperaturas más elevadas exista mayor resistencia a las infecciones por WSSV. Se ha evidenciado que temperaturas de 31-33°C tienen un efecto protector sobre el impacto del WSSV en el camarón (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002b). Vidal *et al.* (2001) observaron diferencias en supervivencia de camarones cultivados en las costas del océano Pacífico (aguas frías) versus aquellos de las costas del Caribe (aguas calientes). En Ecuador las mayores supervivencias se reportaron en temporadas de invierno donde las temperaturas del agua fluctúan entre 28 y 31°C (Sonnenholzner *et al.*, 2002b); así mismo desafíos experimentales a camarones con WSSV en campo y laboratorio corroboran estas observaciones (Sonnenholzner *et al.*, 2002a, 2002b, 2002c).

Aparentemente nuestros resultados no apoyarían la hipótesis de hipertermia como mecanismo de protección contra el WSSV, debido a que la supervivencia de los animales desafiados a 33°C no fue significativamente diferente a la obtenida en los animales desafiados a 27°C. Análisis de PCR de los animales sugieren que el estrés de la manipulación, aclimatación y transporte antes de la infección tuvo un impacto en la prevalencia aumentando la probabilidad de encontrar animales positivos a WSSV en 5.5 veces más que si no hubieran sido expuestos a ese estrés ( $p = 0.001$ ) (M. Pacheco, Fundación CENAIM-ESPOL, Ecuador. comunicación personal). Ha sido ampliamente referenciado, que animales estresados pierden energía para mantener una defensa efectiva (reducción del vigor inmune), aumentando la susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Holmes, 1996; Scott, 1988; Le Moullac y Haffener, 2000; Lafferty y Holt, 2003), bajo estas premisas es posible explicar las elevadas mortalidades a los 7 días p.i observadas en el grupo mantenido a 33°C (3m = 46% y 4m = 77.4%).

Por otro lado aunque los valores de supervivencia no fueron significativamente diferentes entre ambas temperaturas, M. Pacheco, Fundación CENAIM-ESPOL, Ecuador, comunicación personal, encontró mediante regresión logística binaria que la probabilidad de encontrar animales positivos a WSSV aumenta en 3.8 veces más en el grupo desafiado y mantenido a 27°C comparado con el grupo desafiado y mantenido a 33°C ( $p = 0.018$ ) durante los 7 primeros días de experimentación. Así mismo se encontró que en el grupo de 3 meses mantenido a 27°C los porcentajes de prevalencia aumentaron de 11.25% (12 h.p.i) hasta 60.53% (7 días p.i.), y para la temperatura de 33°C el aumento en la prevalencia fue de 0% (12 h.p.i) a 6.1% (7 días p.i.). Para el grupo de 4 meses el

aumento de prevalencia se observó sólo a temperatura de 27°C siendo de 10% (12 h.p.i) y de 23 % (7 días p.i.) en tanto que a 33°C los porcentajes fueron de 3.75% (12 h.p.i) y de 2.27% (7 días p.i.) Aún cuando el aumento en el porcentaje de las prevalencias fueron menores en el grupo de 4 meses en ambas temperaturas este grupo presentó mayores mortalidades. Esto indicaría que aún cuando las mortalidades se vieron potenciadas con el factor de estrés al que se sometió a los animales antes de comenzar el experimento, la temperatura de 33°C se comporta como un factor protector frente a desafíos por WSSV y mantiene los niveles de prevalencia bajos días posteriores a la infección.

Los valores de supervivencia a los 7 días p.i. y 15 días p.i. no fueron estadísticamente diferentes ( $p = 0.731$  para 3 m y  $p = 0.380$  para 4m), teniendo en cuenta que el grupo de 33°C sufrió un doble estrés (corte de pleópodos y reducción de temperatura a 27°C a los 7 días p.i.) a diferencia del grupo de 27°C que sufrió sólo el estrés del corte de pleópodos pues se mantuvo a la misma temperatura hasta el final del experimento, esto podría explicar las mortalidades observadas a 33°C a los 15 días. El corte de pleópodos implica pérdida de hemolinfa y hemocitos en el tejido cicatricial (Tsing *et al.*, 1989) lo que se traduciría en una distracción del sistema inmune. Peng *et al.* (1998) reportan que adicionando un estresor como el corte de un periópodo a camarones adultos de *P. monodon* ligeramente infectados por WSSV el virus se multiplica rápidamente haciendo que la enfermedad progrese de un estado pre-latente a un estado latente, sugiriendo que los mecanismos de defensa del cuerpo del camarón no pueden soportar la multiplicación de WSSV bajo condiciones de estrés. Es posible que el doble estrés en el grupo de 33°C haya potenciado la infección del virus causando mayores mortalidades de las esperadas.

A pesar de no observar diferencias significativas entre las dos temperaturas en los análisis globales, al realizar un análisis estratificado del efecto de la temperatura se obtuvo que la interacción de temperatura y edad inciden en la supervivencia (Tabla 12). Se observó que en el grupo de animales de 3 meses, la supervivencia fue menor en los camarones infectados y mantenidos a 27°C hasta el final del experimento, sugiriendo que los camarones mantenidos a temperaturas más altas (33°C en este caso) están más capacitados para hacer frente a enfermedades.

En el presente trabajo, los resultados mostraron que el estadio de muda por “si sólo” no fue una variable significativa en la explicación directa de la supervivencia. Los animales de 3 meses de edad presentaron mayor supervivencia en todos los estadios de muda comparándolos con los animales de 4 meses (a los 7 y 15 días del experimento); sin embargo relacionando la edad y temperatura como variable explicatoria de la supervivencia, los animales que presentaron más probabilidades de sobrevivir fueron aquellos desafiados en el estadio de intermuda (C) para ambas temperaturas en contraste con el resto de estadios (AB, D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub>) que se presentaron como un factor de riesgo frente a la infección.

Una de las características de los camarones que mueren por WSSV es que son blandos al tacto (post muda) sugiriendo algún tipo de relación entre el WSSV y el proceso de muda. Es posible que el ciclo de muda por sí solo no este asociado con la susceptibilidad al WSSV, pero las condiciones inmunes del animal durante esta fase afectarían su capacidad de defensa. Se ha reportado que la fórmula hemocitaria de los crustáceos cambia durante el ciclo de muda. Tsing *et al.* (1989) realizaron una caracterización morfológica y citoquímica de los hemocitos de peneidos en función del estadio de muda encontrando

que al inicio del ciclo A-B<sub>1</sub> el número es alto, disminuyendo significativamente a un mínimo en B<sub>2</sub>, incrementándose en C y manteniéndose estable en D<sub>2</sub>, incrementándose de nuevo hasta alcanzar un máximo en D<sub>3</sub>-D<sub>4</sub>; así durante la muda el número de hemocitos es alto, el camarón prolifera hemocitos proporcionalmente al grado de infección por WSSV y estas se infiltrarían en los tejidos afectados (Montesdeoca *et al.*, 2002).

La probabilidad de que el estadio de intermuda se presente como un factor protectoro frente a infecciones por WSSV, en contraste con los estadios de premuda y post-muda que se presentan como un factor de riesgo, podría explicarse debido a que en post muda (AB) el animal pierde su vieja cutícula y la nueva no alcanza su madurez inmediatamente (Sugumaran, 1996), por tanto se encuentra vulnerable a infecciones durante esta fase. Adicionalmente, durante este período se presentan variaciones fisiológicas y de comportamiento que influyen sobre el sistema inmune. Por otro lado, los estadios D<sub>0</sub>, D<sub>1-2-3</sub> se caracterizan por la absorción de agua y por absorber sustancias de la cutícula vieja (Cheng *et al.* 2002), esta característica indica que la membrana del epitelio cuticular se torna en general más permeable. Así mismo en las fases de pre-muda (estadio D<sub>2</sub>) inicia la mitosis celular (Freeman, 1993) y es en esta fase que la alimentación se detiene, por lo que el animal comienza a utilizar sus reservas para subsistir (Kou y Lin 1996; Vega Villasante *et al.*, 1999). Los hemocitos circulantes en esta etapa migran a la superficie para proteger la epidermis cuticular, pues el animal se prepara para desprenderse de su exoesqueleto quedando expuesto al ambiente y a cualquier microorganismo que en el se encuentre (Le Moullac *et al.*, 1997). La muda en general es un proceso de gran demanda energética y de desgaste para el animal. El sistema inmune se encuentra “distráido” en el epitelio, dejando muchos órganos sin protección. Sería lógico pensar que una infección a través del epitelio cuticular sería detenida por el sistema inmune que se encuentra alerta en ese tejido. Sin embargo, es posible que el virus encuentre otras vías de ingreso como glándula antenal o intestino medio (que no poseen cutícula), facilitando el ingreso y posterior diseminación por diferentes órganos internos a través de la hemolinfa. Desafortunadamente esta hipótesis no puede probarse en este estudio debido a que no se realizaron análisis histológicos de los animales muertos que podrían darnos una idea de las vías de infección del virus en los camarones infectados en post muda y premuda.

Por otro lado, los animales en fase de intermuda (C) se caracterizan por la dureza de su exoesqueleto, lo que disminuye la posibilidad de que cualquier organismo patógeno atraviese esta barrera protectora (Kinne, 1980). Los efectores inmunitarios en esta fase se distribuyen de manera homogénea por todos los tejidos del camarón por lo que la carga viral que logra entrar en contacto con animales es menor con respecto a otros estadios.

Los resultados en términos de prevalencia de M. Pacheco, Fundación CENAIM-ESPOL, Ecuador, comunicación personal, indican que a los 7 días p.i., la mayor prevalencia del virus se encontró en los animales desafiados en estadio D<sub>0</sub>; en contraste, los animales infectados en estadios D<sub>1-2-3</sub> presentaron mayor número de muertes tanto a los 7 días como al término del experimento. El proceso de infección de camarones con el WSSV puede dividirse en un estado inicial (período latente corto y asintomático) durante el cual el virus se multiplica causando eventualmente una infección aguda sintomática que después progresa hasta la muerte del animal; sin embargo también puede presentarse de manera crónica en los supervivientes y en el última instancia los animales pueden recuperarse completamente (Lotz, y Soto, 2002); es posible que en este caso conceptos de susceptibilidad y resistencia puedan explicar este comportamiento, sugiriendo que animales de D<sub>0</sub> tengan mayor prevalencia por que se presentan en ese estadio más

susceptibles a la infección del virus pero a la vez más resistentes a la enfermedad por que no mueren en grandes cantidades (fase inicial de la infección que supera la fase aguda y llega a la fase crónica); sin embargo los animales en  $D_{1-2-3}$  son menos resistentes a la enfermedad producida por el virus el cual es capaz de desarrollarse a concentraciones virales menores que en  $D_0$  (fase inicial de la infección que no supera la fase aguda y causa la muerte).

Finalmente, podemos sugerir que la edad juega un papel importante en la susceptibilidad a las infecciones por el virus del WSSV, siendo los animales de menor edad más resistentes a la enfermedad, por el hecho de que estos mudan con más frecuencia exponiéndose en menor tiempo al virus que los animales grandes cuyo tiempo de exposición sería mayor mientras estan blandos. La temperatura de 33°C mejora la respuesta inmune de los juveniles de *P. vannamei* expuestos al virus de WSSV y el estadio de intermuda (C) se presenta como un factor de protección frente a infecciones por el método de inmersión por presentarse la cutícula como una barrera eficiente contra este patógeno.

## 6. CONCLUSIONES

La edad es un factor importante en la susceptibilidad de los camarones al ser desafiados por el virus del WSSV, siendo más resistentes los animales de 3 meses comparados con los de 4 meses.

La temperatura de 33°C modifica el riesgo de morir por WSSV reduciéndolo dependiendo del estadio de muda y de la edad.

El estadio de intermuda (C) presenta menor riesgo de morir al ser desafiado por inmersión al WSSV, en tanto que los estadios AB, D<sub>0</sub> y D<sub>1-2-3</sub> son menos resistentes.

Los camarones en estadio de muda D<sub>0</sub> son más susceptibles a infectarse por WSSV en desafíos por el método de inmersión.

El corte de pleópodos al séptimo día p.i. sumado al descenso de temperatura de 33 a 27°C pudo haber sido el causante de mayor mortalidad que la esperada en los tratamientos mantenidos a 33°C.

## 7. RECOMENDACIONES

En este estudio no fue posible dilucidar si el virus del WSS modifica el ciclo de muda, el grupo control tuvo la finalidad sólo de verificar la eficiencia del método de infección, por lo que estuvo conformado por una mezcla de camarones en diferentes estadios de muda. Para estudios posteriores sería recomendable que el número de animales del control en los diferentes estadios sea igual al número de camarones usado para cada tratamiento y así poder hacer una comparación de la frecuencia de muda en animales desafiados versus los no desafiados.

El manejo de la temperatura es una variable adecuada para hacer frente a infecciones del WSSV en camarones peneidos, por lo que el uso de invernaderos es recomendable.

Sería recomendable la transferencia de animales a tanques de engorde en estadio de muda C, por presentarse como un factor de protección frente a infecciones con WSSV.

Se podría realizar estudios para dilucidar si la pérdida de cutícula o la distracción del sistema inmune, son factores de riesgo en el ciclo de muda.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Agresti, A. 1996. An Introduction to Categorical Data Analysis. John & sons, Inc. New York. EE.UU.
- Aguirre Guzmán, G., y F. Ascencio Valle. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Resent Research in Developmental Microbiology* 4:333-348.
- Alday, V. 2000a. Factores que detonan una epidemia. El virus de la Mancha Blanca no es nuevo en Ecuador. *El Mundo acuícola* 6(1):8-10.
- Alday, V. 2000b. El virus de la cabeza amarilla. Información general, técnicas de diagnóstico y prevención. *El Mundo acuícola* 5(1):3-4.
- Bachere, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191:3-1.1
- Bayot, B. 2003. Epidemiologic study of shrimp diseases in ponds cultured with *Penaeus vannamei* and relationship with some environmental and management variables (Ecuador). Masters thesis Katholieke Universiteit Leuven. Belgium. 1-75.
- Beckage, N.E. 1996. Interactions of viruses with invertebrate cells. Paginas 375-399. *En: K. Sordehall, S. Iwanaga, G.R. Vasta. New Directions in Invertebrate Immunology. SOS Publications, Massachusetts, EE.UU.*
- Cadenas, E. 2000. Relación entre el ciclo de muda y la actividad de las enzima digestivas y su efecto en la tasa de alimentación y el crecimiento del juvenil *Penaeus vannamei*. Tesis para optar el grado de Ingeniero Acuicultor, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Calderón, J., B. Bayot, I. Betancourt, y V. Alday. 1999. Monitoreo del WSSV en el Ecuador. *El Mundo Acuícola* 5(2):11-14.
- Calderón, J., B. Bayot, S. Sonnenhozner, M.H. Cornejo, J. Melena, y F. Panchana. 2000. II Monitoreo del virus de la Mancha Blanca (WSSV) en Ecuador. *El Mundo Acuícola*. 8(1):20-24.
- Cámara Nacional de Acuicultura (CNA). 2000. Las cifras de la crisis. *Acuicultura del Ecuador* 40:30-39.
- Cámara Nacional de Acuicultura (CNA). 2003. Estadísticas. Impacto específico de la Mancha Blanca en la Exportación. [http://www.cnaecuador.com/estadisticas/impacto\\_ws](http://www.cnaecuador.com/estadisticas/impacto_ws).
- Cámara de Productores de Camarón (CPC). 1993. Libro Blanco de Camarón. II Edición. Ecuador.
- Corbel, V., Z. Zuprizal, Z. Shi, C. Huang, J. Sumartono, M. Arcier, y J.R. Bonami. 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Fish Diseases* 24:377-382.
- Corsin, F., J.F. Turnbull, N.V. Hao, C.V. Mohan, T.T. Phi, L.H. Phuoc, N.T. Tinh, y K.L. Morgan. 2001. Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese rice-shrimp farming system. *Diseases of Aquatic Organisms* 47:1-12.
- Cowley, P.S., P.J. Walker, A. Jeff, C.M. Dimmock, C. Wongteerasupaya, y V. Boonsaeng. 1999. Yellow head virus from Thailand and gill associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. *Diseases of Aquatic Organisms* 36:153-157.
- Chan, S.M., S.M. Rankin, y L.L. Keeley. 1998. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: Setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *Biological Bulletin* 175:185-192.
- Chang, C.F., M.S. Su, H.Y. Chen, C.F. Lo, G.H. Kou, y I.C. Liao. 1996. Effect of

- dietary  $\beta$ -1,3 glucans on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 36:163-168.
- Chang, P.S., H.C. Chen, y Y.C. Wang. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture* 164:233-242.
- Chang, P.S., Y.C. Wang, C.F. Lo, G.H. Kou, y S.N. Chen. 1992. Purification and biochemical characteristics of occlusion Body of *Penaeus monodon*- Type Baculovirus (MBV). *Gyobyo Kenkyu* 27(3):127-130.
- Chang, Y.S., C. F. Lo, S.E. Peng, K.F. Liu, C.H. Wang, y G.H. Kou. 2002. White spot syndrome virus (WSSV) PCR-positive *Artemia* cysts yield PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae. *Disease of Aquatic Organisms* 49:1-10.
- Chavarría, J. 2003. Desarrollo de un sistema de alerta climática para acuicultura - Parte I: Las evidencias de la relación clima – producción. Boletín informativo No. 81, Fundación CENAIME-ESPOL, Guayaquil, Ecuador.
- Chen, J.C, M.N. Lin, Y.Y. Ting, y J.N Lin. 1995. Survival haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinity and temperature levels. *Comparative Biochemistry and Physiology* 110:253-258.
- Cheng, W., C.H. Liu, D.F. Yan, y J.C. Chen. 2002. Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stage. *Aquaculture* 211:325-339.
- Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang, y C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:165-173.
- Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. F. Lo, y G.H. Kou, 1998. Studies of transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via water-borne contact and oral ingestion. *Aquaculture* 164:263-276.
- De Blas, I. 2001 Manual de Epidemiología. Centro de Servicios para la Acuicultura, Guayaquil, Ecuador.
- De la Peña, L., T. Tamaki, K. Momoyama, T. Nakai y K. Muroga. 1993. Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 115:1-12.
- Durand, S.V., y D.V. Lightner. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases* 25:381-389.
- Durand, S.V., D.V. Lightner, R.M. Redman, y J.R. Bonami. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* 29:205-211.
- Echeverría, F., V. Otero, F. Cornejo, M. Montesdeoca, y J. Rodríguez. 2001. WSSV y ciclo de muda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *El Mundo Acuícola* 8 (1):43-46
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2000. Aquaculture production 1984 – 1990. Fisheries Circular 185, Review 4, Roma, Italia.
- Freeman, J.A. 1993. The Crustacean epidermis during larval development. Paginas 193-215. *En*: M.N. Horst, y J.A. Freeman (editores). *The Crustacean Integument. Morphology and Biochemistry*. CRC Press, Londres Inglaterra.
- Hasson, K.W., D.L. Lightner, B.T. Poulos, R.M. Redman, B.L. White, J.A. Brock, y J.R. Bonami. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei* : demonstration of a viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:115-126.

- Hennig, O.L., y E.R. Andreatta. 1998. Effect of temperature in an intensive nursery system for *Penaeus paulensis* (Perez Farfante, 1967). *Aquaculture Research* 164: 1-4.
- Hewitt, D.R., y P.F. Duncan. 2001. Effect of high water temperature on the survival, moulting and food consumption of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate, 1888). *Aquaculture Research* 32:305-313.
- Hill, B. 2002. National and international impacts of white spot disease of shrimp. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 22(2):58-65.
- Holmes, J.C. 1996. Parasites as threats to biodiversity in shrinking ecosystems. *Biodiversite Conservation* 5:975-983.
- Hose, J. E., G. G. Martin, S. Tiu, y N. McKrell. 1992. Patterns of hemocyte production and release throughout the molt cycle in the penaeid shrimp *Sicyona ingentis*. *Biological Bulletin* 183:185-199.
- Huang, J., X. Song, J. Yu, y C. Yang. 1995. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp. *Marine Fisheries Research* 16:1-10.
- Huberman, A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture* 191:191-208.
- IFREMER 1999. Shrimp aquaculture: characterisation of immune effectors for further application to disease prophylaxis and selection of disease resistant shrimp. *Bulletin de IFREMER* 11(12):4-6.
- Inouye, K., S. N. Miwa, H. Oseko, T. Nakano, K. Kimura, M. Monoyama, y H. Hiraoka. 1994. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathology* 29: 149-158.
- Jiang, D.H., A.L. Lawrence, W.H. Neill, y H. Gong. 2000. Effects of temperature and salinity on nitrogenous excretion by *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 253:193-209.
- Jiménez, R. 1992. Síndrome de Taura. *Acuacultura del Ecuador* 1:1-16.
- Jory, D., y H. Dixon. 1999. Shrimp white spot virus in the western hemisphere. *Aquaculture Magazine* 25 (3):83-88.
- Kasornchandra, J., S. Boonyaratpalin, y T. Itami. 1998. Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia. Microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164:243-251.
- Kautsky, N., P. Rönnbäck, M. Tedengren, y M. Troell. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191:145-161.
- Kinne, O. 1980. *Diseases of Marine Animals. General Aspects, Protozoa to Gastropoda.* John Wiley and sons, New York, EE.UU.
- Kou, C.M., y W.W. Lin. 1996. Changes in morphological characteristic and ecdysteroids during the molting cycle of tigre shrimp, *P. monodon* (Fabricius). *Zoological Studies* 35 (2):118-127.
- Kou, G.H., S.E. Peng, Y.L. Chiu, y C.F. Lo. 1998. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. Páginas 267-271 *En* T.W. Flegel (editor) *Advances in Shrimp Biotechnology.* National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Tailandia.
- Lacoste, A., F. Jalabert, K. Shelagh, A. Cueff, y S. Poulet. 2001. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to vibrio splendidus. *Applied and Enviromental Microbiology* (67)5: 2304-2309.

- Lafferty, K.D., y R.D. Hold. 2003. How should environmental stress affect the population dynamics of diseases? *Ecology Letters* 6:654-664.
- Le Moullac, G., y P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture* 191:121-131.
- Le Moullac, G., M. Le Groumellec, D. Ansquer., S. Froissard, y P. Levy 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle protection against vibriosis. *Fish and Shellfish Immunology* 7:227-234.
- Leung, P.S., L.T. Tram, A.W. Fast. 2000. A logistic regresión of risk factors for disease occurrence on Asian shrimp farms. *Diseases of Aquatic Organisms* 41:65-76.
- Lightner, D.V. 1996. Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathology* 31:39-45.
- Lightner, D.V., y R.M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164, 201-220.
- Lightner, D.V., y P. Chen. 2000. Necrosis hipodérmica hematopoyética infecciosa. <http://www.oie.int>.
- Lightner, D.V., R.M. Redman, K.W. Hasson, y C.R. Pantoja. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei* Crustacea: Decapoda: gross signs, histopathology and ultrastructure. *Diseases of Aquatic Organisms* 1:53-59.
- Lo, C.F., C.H. Ho, C.H. Chen, K.F. Liu, Y.L. Chiu, P.Y. Yeh, S.E. Peng, H.C. Hsu, H.C. Liu, C.F. Chang, M.S. Su, C.H. Wang, y G.H. Kou. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms* 30 (1):53-72.
- Lo, C.F., Y.S. Chang, C.T. Cheng, y G.H. Kou. 1998. PCR monitorig of cultured shrimp for white spot syndrome virus (WSSV) infection in growout ponds Páginas 281-286. *En*: T.W. Flegel (editor). *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic and Biotechnology, Bangkok, Tailandia.
- Lotz, J.M., y M.A. Soto. 2002. Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50:199-209.
- Mohan, C.V., K.M. Shankar, S. Kulkarni, y P.M. Sudha. 1998. Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Diseases of Aquatic Organisms* 34:9-12.
- Molinero, L.M. 2001. Modelos de regresión de Cox para el tiempo de supervivencia. Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión. <http://www.seh-lelha.org/rlogist1.htm>.
- Montesdeoca, M., Y. Amano, F. Echevarría, I. Betancourt, F. Panchana, M. Sotomayor y J. Rodríguez. 2002. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de la enfermedad en los estanques. *El Mundo Acuícola* 8:38-42.
- Nogales, C., L. Santos. 1995. Cultivo de camaron en estanques. Páginas 63-71. *En* H. Rodríguez, G. Polo, y O. Mora. *Fundamentos de Acuicultura Marina*. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Bogota, Colombia.
- O'Brien, J.J., S.S. Kumari, y D.M. Skinner. 1993. Differential localization of specific proteins in the exoskeleton of the Bermuda land crab. Páginas 80-96. *En*: M.N. Horst, y J.A. Freeman (editores). *The Crustacean Integument. Morphology and Biochemistry*. CRC Press, Londres, Inglaterra.
- Ortega, C., J.L. Muzquiz, I. De Blas, A.B. Fernández, e I. Ruiz. 1998. Estudio epidemiológico de factores de riesgo en acuicultura. *AquaTIC* 4:1-8

- Otta, S.K., G. Shudha, J.B. Chakraborty, I. Karunasagar y I. Karunasagar. 1999. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. *Diseases of Aquatic Organisms* 38:67-70.
- Passano, L.M. 1961. Molting and its control. Páginas 473 –530 *En*: H. Talbot, (editor) *The Physiology of Crustacea. Metabolism and Growth*. Waterman Academic Press, San Francisco, EE.UU.
- Peng, S.E., C.F. Lo, K.F. Liu, y G.H. Kou. 1998. The transition from pre-patent to patent infection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Panaeus monodon* triggered by periopod excision. *Fish Pathology* 33 (4):395-400.
- Pérez, F., L. Gómez, V. Otero, F. Volckaert, y J. Calderón. 2002. Supervivencia diferencial de familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas con el virus de la Mancha Blanca. *El Mundo Acuícola* 8 (1):25-28.
- Ponce, J., C. A. Martínez, y L.G. Gorss. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157 (12):107-115.
- Pramod Kiran, R.B., K.V. Rajendran, S.J. Jung, y M.J. Oh. 2002. Experimental susceptibility of different life-stages of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), to white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Fish Diseases* 25:201-207.
- Rajan, P.R., P. Ramasamy, V. Purushothaman, y G.P. Brennan. 2000. White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 184:31-44.
- Rajendran, K.V., K.K. Vijayan, T.C. Santiago, y R.M. Krol. 1999. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. *Journal of Fish Diseases* 22:183-191.
- Regueira, E. 2001. Patrones espaciales y temporales de la producción camaronera en el Golfo de Guayaquil. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Robertson, L., W. Bray., J.L. Trujillo y A. Lawrence. 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *Journal of the World Aquaculture Society* 18 (3):180-185.
- Rodríguez, J., y S. Sonnenholzner. 2001. Bioensayos de desafío al virus de la “Mancha Blanca” en camarones juveniles *Penaeus vannamei* bajo diferentes temperaturas del agua. *Boletín Informativo* N° 30, Fundación CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador.
- Rodríguez, J., B. Bayot, Y. Amano, F. Panchana, I. de Blas, V. Alday, y J. Calderón. 2003a. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *Journal of Fish Diseases* 26:439-450.
- Rodríguez, J., F. Echeverría, C. Molina, S. Sonnenholzner, A. Arias, J. Apolo y J. Calderón. 2003b. Efecto combinado de una precría en hipertermia e inmunoestimulación. Una alternativa para incrementar la producción de cultivos semi-intensivos en condiciones de WSSV. *El Mundo Acuícola* 9(1):9-11.
- Saez, M., y M.A. Barceñó. 2002. Curso introductorio de análisis de datos longitudinales. Metodología y aplicaciones en salud pública. GRECS, Zaragoza, España.

- Sahul Hameed, A.S., M. AnilKumar, M. L. Stephen Raj, y J. Kunthala. 1998. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture* 160:31-45.
- Scott. M.E. 1988. The impact of infection and disease on animal populations : implications for conservation biology. *Conservation Biology* 2:40-56.
- Sequeira, T., M. Arala, M. Vilanova, A. Lobo-Da-Cunha, y L. Baldaia. 1995. Flow cytometric analysis of molt-related changes in haemocytes types in male and female *Penaeus japonicus*. *Biological Bulletin*. 189:376-380.
- Shankar, K.M., y C.V. Mohan. 1998. Epidemiological aspects of shrimp viral disease in India - A review. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 13 (1): 43-49.
- Shi, Z., C. Huang, J. Zhang, D. Chen, y J.R. Bonami. 2000. White spot syndrome virus (WSSV) experimental infection of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Fish Diseases* 23:285-288.
- Shin, Y.K., y P. Chin. 1994. Physiological changes in relation to molt cycle of *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Journal of the Korean Fisheries Society*. 27:380-389.
- Söderhäll, K., L. Cerenius, y M.W. Johansson. 1996. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. Paginas 229-253 *En: K. Söderhäll, S. Iwanaga, y G. Vasta. (editors) New directions in Invertebrate Immunology. SOS. Publications. Massachusetts, EE.UU.*
- Sonnenholzner, S. 2001. Segundo experimento de manejo en camaronera para enfrentar el problema del virus de la Mancha Blanca. *El Mundo Acuícola. CENAIME-ESPOL* 7(1):60-61.
- Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, y J. Calderón. 2002a. Temperature and WSSV: Promising shrimp culture technique in Ecuador. *Aquaculture Research News from Ecuador. CENAIME*.
- Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría, y J. Calderón. 2002b. Supervivencia y respuesta inmune de camarones juveniles *Penaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. *El Mundo Acuícola* 8 (1):50-55.
- Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, y J. Calderón. 2002c. Cultivos experimentales de camarón en invernaderos. *El Mundo Acuícola* 8(2):4-10.
- Sudha, P.M., C.V. Mohan, K.M. Shankar, A. Hegde. 1998. Relationship between white spot síndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture* 167:95-101.
- Sugumaran, M. 1996. Roles of the insect cuticle in host defense reactions. Paginas 355-374. *En: K. Sordehall, S. Iwanaga, y G.R. Vasta (editores). New Directions in Invertebrate Immunology. SOS publications. Massachusetts, EE.UU.*
- Suzuki, N., I. Mizumoto, T. Itami, Y. Takahashi, R. Tanaka, H. Hatate, T. Nomoto, y A. Kozawa. 2000. Virucidal effect of singlet oxygen on penaeid white spot syndrome virus. *Fisheries Science* 66:166-168.
- Tapay, L.M., Y. Lu, R.B. Gose, E.C. Nadala, J.A. Brock, Y P.C. Loh. 1997. Development of an in vitro quantal assay in primary cell cultures for a non-occluded baculo-like virus of penaeid shrimp. *Journal of Virological Methods* 64:37-41.
- Thakur, P.C., F. Corsin, J.F. Turnbull, K.M. Shankar, N.V. Hao, P.A. Padiyar, M. Madhusudhan, K.L. Morgan, y C.V. Mohan. 2002. Estimation of prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) by polimerase chain reaction in *Penaeus monodon* post-larvae at time of stocking in shrimp farms of Karnataka, India: a population-base study. *Diseases Aquatic Organisms* 49:235-243.

- Thrusfield, M. 1995. *Veterinary Epidemiology*. Second Edition. Blackwell Science, Edinburgh, Escocia.
- Thrusfield, M., C. Ortega, I. de Blas, J.P. Noordhuizen, y K. Frankena. 2001. Win Episcopo 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *The Veterinary Record* 148:567-572.
- Tsai, M.F., G.H. Kuo, H.C. Liu, K.F. Liu, C.F. Chang, S.E. Peng, H.C. Hsu, C.H. Wang, C.F. Lo. 1999. Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Diseases of Aquatic Organism* 38:107-114.
- Tsing, A., J.M. Arciere, y M. Berlín. 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps morphology, cytochemistry and hemograms. *Journal of Invertebrate Pathology* 53:64-67.
- Van de Braak, C.B., M.H. Botterblom, E.A. Huisman, J.H. Rombout, y W.P. van der Knaap. 2002. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organism* 51:149-155.
- Van Hulten, M. C., M.F. Tsai, C.A. Schipper, C.F. Lo, G.H. Kou, y J.M. Vlak. 2000. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeated regions. *Journal of General Virology* 81:307-316.
- Van Hulten, M.C., J. Witteveldt, S. Perters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst, y J.M. Vlak. 2001a. The white spot syndrome virus DNA genome Sequence. *Virology* 286:7-22.
- Van Hulten, M.C., J. Witteveldt, M. Snippe, y J.M. Vlak. 2001b. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology* 285:228-233.
- Van Wormhoudt, A., y C. Bellon Humbert. 1996. Bases biológicas del cultivo de crustáceos: Muda. Páginas 237-249. *En* G. Barnabé (editor). *Bases Biológicas y Ecológicas de la Acuicultura*. Editorial Acribia, New York, EE.UU.
- Vega Villasante, F.H., I. Fernández, R.M. Preciado, M. Oliva, y H. Nolasco. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages the arched awiming *Callinectes arcuatus* (Crustacea, Decapoda) *En*: *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium International de Nutrición Acuícola*. Yucatán, México.
- Vega Villasante, F.H., H. Nolasco Soria, R. Civera Cerecedo, R. González Valdés, y M. Oliva Suárez. 2000. Alternativa para la alimentación del camarón en cultivo: el manejo de la muda. Páginas 313-320. *En* *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium International de Nutrición Acuícola*. Yucatán, México.
- Venegas, C.A., L. Nonaka, K. Mushiake, T. Nishizawa, y K. Muroga. 1999. Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn at different development stages. *Fish Pathology* 170:179-194.
- Vidal, O.M, C. B. Granja, F. Aranguren, J.A. Brock y M. Salazar. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *Journal of the World Aquaculture Society* 32(4): 364-372.
- Walker, P., y R. Subasinghe. 2000. DNA-based molecular diagnostic techniques: research needs for standarization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. *FAO Aquaculture Newsletter* 24:15-19.

- Wang C.Y., C.F. Lo, P.S. Chang, y G.H. Kou. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164:221-231.
- Wang Y.C., C. Lo, J. Leu, C. Chou, C. Yeh, H. Chou, M. Tung, C. Chag, M. Su, G. Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:239-242.
- Wang, Y.G., M.D. Hassan, M. Shariff, S.M. Zamri, y X. Chen. 1999. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Diseases of Aquatic Organisms* 39:1-11.
- Wang, Y.T., W. Liu, J.N. Seah, C.S. Lam, J.H. Xiang, V. Korzh, y J. Kwang. 2002. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52:249-259.
- Withyachumnarnkul, B.1999. Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or-negative for white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 39:21-27.
- Withyachumnarnkul, B., V. Boosaeng, R. Chomsoong, T.W. Flegel, S. Muangsin, y G.L. Nash. 2003. Seasonal variation in white spot syndrome virus-positive samples in broodstock and post-larvae of larvae of *Penaeus monodon* in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms* 53:167-171.
- Wongteerasupaya, C., J.E. Vickers, S. Sriurairatana, G.L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boosaeng, S. Paniym, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, y T.W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal arigin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 21:69-77.
- Wu, J.L., A. Namikoshi, T. Nishizawa, K. Mushiake, K. Teruya, K. Muroga. 2001. *Diseases of Aquatic Organisms* 47:129-135.
- Wu, J.L., T. Nishioka, K. Mori, T. Nishizawa, y K. Muroga. 2002. A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology* 13:391-403.
- Wyban, J., W.A. Walsh, y D.M. Gadin. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 138 (1-4):267-279.
- Yoganandhan, K., R.B. Narayanan, y A.S Sahul Hameed. 2003. Larvae and early post-larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius) experimentally infected with white spot syndrome virus (WSSV) show no significant mortality. *Journal of Fish Diseases* 26:385-391.
- Zhang, X. C Huang, X. Xu, y C. L. Hew. 2001. Transcription and identification of an envelope protein gene (p22) from shrimp white spot syndrome virus. *Journal of General Virology*. [www.socgenmicrobiol.org/.../Figs/F4\\_pg.htm](http://www.socgenmicrobiol.org/.../Figs/F4_pg.htm)