



**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

**“Dinámica de la epidemia de la enfermedad de la Mancha Blanca (WSD) en función de la temperatura, carga viral y ruta de transmisión viral”**

**Tesis de Grado**

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

**MAGISTER EN CIENCIAS**

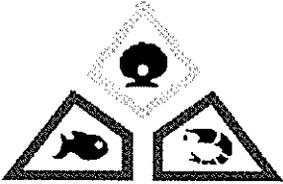
**Presentada por:**

**Oreste Gainza Roche**

**Guayaquil – Ecuador**

**2006**

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:



FUNDACIÓN CENAIM-ESPOL



COOPERACIÓN TÉCNICA BELGA



UNIVERSIDAD DE GANTE  
BÉLGICA



UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE LOVAINA – BÉLGICA

## VITA

Oreste Gainza Roche nació el 27 de enero de 1971 en Caibarien Villa Clara, Cuba. Cursó el técnico medio en la especialidad de Biología Marina en el Instituto de la Pesca Andrés González Lines de la Habana durante los años 1985-1988. A partir de septiembre de esa fecha comenzó a trabajar como tecnólogo en el establecimiento 101 del MIP, Holguín, Cuba. Desde septiembre de 1990 pasó a desempeñarse como Biólogo Marino en el Buró de Captura de la Empresa Nacional Acuícola en Holguín. Desde septiembre de 1995 hasta julio de 2000 estudió en la Facultad de Biología de la Universidad de Oriente donde se graduó como biólogo. Se incorporó a la Empresa PESCAHOL, en la UEB Acuaeste, como especialista en Acuicultura. Ingresó al programa de Maestría en Ciencias con la especialidad en Acuicultura Marina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (Ecuador) en septiembre del año 2003, donde culminó sus estudios en el año 2005.

## 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).

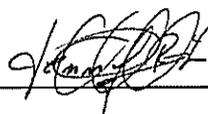


---

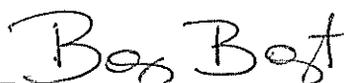
Oreste Gainza Roche

**TRIBUNAL DE TESIS**

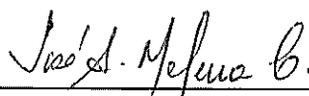
---

**Dr. Marcelo Muñoz Naranjo****Presidente del Tribunal de Tesis**

---

**Dra. Jenny Rodríguez****Directora de Tesis**

---

**Msc. Bonny Bayot****Miembro del Tribunal**

---

**Dr. José Melena****Miembro del Tribunal**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al personal académico y científico del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) por contribuir a mi formación y su impulso a la realización de este trabajo, especialmente a:

Ph.D. José Melena por su asesoría y atención constante.

Licenciada Irma Betancourt.

Tecnóloga Fanny Panchana

Al Doctor Ignacio de Blas, por su colaboración en el diseño de los experimentos.

A la Cooperación Técnica Belga en manos de la Dra. Laurance Massaut por seleccionarme para su programa de maestría.

A Ochun, Yemaya y mi madre que nunca me abandonan.

A mi esposa y mi conejito.

Al comandante en jefe Fidel Castro Ruz, que en su lucha por la dignidad humana construyó la sociedad, que me forjó y preparó.

A Ecuador por acogerme este periodo de tiempo.

## INDICE

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xiii
LISTA DE ANEXOS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xviii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. PRINCIPIOS DE UNA ENFERMEDAD.....	4
2.2. DETERMINANTES DE LA ENFERMEDAD.....	4
2.2.1. Determinantes del agente.....	6
2.2.2. Determinantes del hospedero.....	7
2.2.3. Determinantes ambientales.....	8
2.3. DINAMICA TEMPORAL DE LA INFECCIÓN – ENFERMEDAD.....	8
2.4. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN.....	10
2.5. RUTAS DE TRANSMISIÓN.....	12
2.6. PATÓGENOS DEL CAMARÓN DE CULTIVO.....	13
2.6.1. Virus en los camarones peneidos.....	14
2.7. LA ENFERMEDAD DE LA MANCHA BLANCA.....	16
2.7.1. Determinantes del WSSV.....	16
2.7.1.1. Determinantes del agente.....	16
2.7.1.2. Determinantes del hospedero.....	18
2.7.1.3. Determinantes ambientales.....	20
2.7.2. Mecanismos y rutas de infección del WSSV.....	21

2.7.3. Métodos de diagnóstico.....	22
2.8. MODELOS EPIDÉMICOS.....	25
2.8.1. Modelo epidémico de la Mancha Blanca.....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	30
3.2. CONTROL DE CONDICIÓN SPF.....	31
3.3. OBTENCION DE BIOMASA INFECTADA.....	31
3.4. SOLUCIÓN DE INÓCULO VIRAL MADRE PARA LA INFECCIÓN POR INMERSIÓN.....	33
3.5. PREPARACIÓN DE LA PAPILLA INFECTADA.....	33
3.6. ÁREAS EXPERIMENTALES Y SISTEMAS DE CALEFACCIÓN.....	34
3.7. BIOENSAYO 1. EXPLORACIÓN DE LOS NIVELES DE CARGA VIRAL....	38
3.7.1. Material biológico.....	38
3.7.2. Diseño del experimento.....	39
3.7.3. Desafío con WSSV .....	40
3.8. BIOENSAYO 2. EFECTO DEL DESAFÍO INDIVIDUAL / COLECTIVO SOBRE LA MORTALIDAD POR WSSV.....	40
3.8.1. Material biológico.....	41
3.8.2. Diseño del experimento.....	41
3.8.3. Desafío con WSSV.....	42
3.9. BIOENSAYO 3. TRANSMISIÓN Y PATOGENICIDAD DE WSSV .....	43
3.9.1. Material biológico.....	44
3.9.2. Diseño del experimento.....	44
3.9.3. Diluciones y carga viral del material infeccioso.....	46
3.9.4. Diagnóstico de la infección de WSSV .....	48

3.9.5. Diagnóstico de animales enfermos.....	49
3.9.6. Índice histológico de WSSV .....	49
3.9.7. Análisis de mortalidad.....	50
3.10. ANÁLISIS DE DATOS .....	50
4. RESULTADOS.....	59
4.1. BIOENSAYO 1.....	59
4.2. BIOENSAYO 2.....	60
4.2.1. Desafío individual.....	60
4.2.2. Desafío colectivo.....	61
4.2.3. Análisis conjunto de los desafíos (individual - colectivo).....	62
4.3. BIOENSAYO 3.....	63
4.3.1. Análisis de la transmisión viral.....	63
4.3.2. Análisis de la patogenicidad .....	67
4.3.3. Análisis de la virulencia.....	71
4.3.4. Modelo epidemico de WSD.....	76
4.3.4.1. Estructura del modelo.....	76
4.3.4.2. Resultados de la simulación.....	79
4.3.4.3. Validación del modelo.....	83
5. DISCUSIÓN.....	86
6. CONCLUSIONES .....	97
7. RECOMENDACIONES .....	100
8. BIBLIOGRAFÍA.....	101
9. ANEXOS.....	121

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Triada epidemiológica conformada por los tres determinantes (agente, hospedero y ambiente) de una enfermedad. Ejemplo para el caso de la enfermedad de la Mancha Blanca.....6
- Figura 2. Dinámica de la infecciosidad y enfermedad (Halloran 1998).....9
- Figura 3. Esquema representando los mecanismos de transmisión, rutas de infección y los portales de entrada y salida de los agentes patógenos.....11
- Figura 4. Dinámica simplificada de la enfermedad de la Mancha Blanca (WSD) durante el curso de una epidemia. Los óvalos representan los posibles estados de un animal durante un ciclo de producción en una piscina. Las probabilidades de paso de un estado a otro están representadas por letras griegas ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ )...28
- Figura 5. Modelo conceptual propuesto por Lotz y Soto (2002), representando la dinámica de una epidemia de Mancha Blanca. ....29
- Figura 6. Distribución de las unidades experimentales al interior del set 1 compuestas por frascos de vidrio de 2 L (círculos), los cuales se encontraron distribuidos en 23 bandejas (cuadrados), a razón de 16 frascos/bandeja. ....35
- Figura 7. Distribución de las unidades experimentales (acuarios de 50 L) del set 2 compuestas de acuarios de 50 L de capacidad (Bioensayos 2 y 3). ....36
- Figura 8. Mortalidad acumulada (%) de animales *Penaeus vannamei* desafiados con WSSV por ingestión en forma individual (180 animales sembrados individualmente en frascos de 2 L) y en forma colectiva, con 3 diluciones de tejido de material infectado y SPF no infectado (1:1, 1:5, 1:10) (180 animales

- sembrados a razón de 20 animales por acuario de 20 L y 3 acuarios por cada nivel de dilución). Resultados del Bioensayo 2.....62
- Figura 9. Porcentaje de animales infectados con WSSV (por análisis con iniciadores de Kimura) a los 3 d p.i. en función de la ruta de transmisión viral, temperatura y carga viral de infección. Bioensayo 3.....65
- Figura 10. Porcentaje de animales enfermos con WSD (por análisis de histología) en función de la ruta de transmisión viral, temperatura y carga viral de infección a los 3 d p.i. Bioensayo 3.....67
- Figura 11. Índice Histológico (IH) en los camarones enfermos de WSD en el Bioensayo 3, en función de la temperatura y la carga viral de infección. ....71
- Figura 12. Mortalidad (%) a los 3 d p.i. en función de la ruta de transmisión viral, temperatura y carga viral de infección a los 3 d p.i. Bioensayo 3.....72
- Figura 13. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier con relación a la temperatura. Carga viral de infección =  $1.35 \times 10^8$  réplicas virales/individuo.....75
- Figura 14. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier con relación a la temperatura. Carga viral de infección =  $2.93 \times 10^7$  réplicas virales/individuo.....75
- Figura 15. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier con relación a la temperatura. Carga viral de infección =  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales/individuo.....76
- Figura 16. Esquema del modelo epidémico de WSD desarrollado con los resultados del estudio. Simulación corrida en Stella 8.1.1.....78
- Figura 17. Variación en tiempo de la dinámica de WSD producida por desafíos por ingestión (gráficos en panel izquierdo) y por inmersión (gráficos en panel derecho) a 29 °C. ....80
- Figura 18. Variación en tiempo de la dinámica de WSD producida por desafíos por ingestión (gráficos en panel izquierdo) y por inmersión (gráficos en panel

- derecho) a 31 °C. Datos pronosticados por el modelo desarrollado a partir de los resultados del Bioensayo 3. La simulación fue realizada con Stella Research 8.1.1.....81
- Figura 19. Variación en tiempo de la dinámica de WSD producida por desafíos ingestión (gráficos en panel izquierdo) y por inmersión (gráficos en panel derecho) a 33 °C.....82
- Figura 20. Datos reales mostrando el desarrollo de la epidemia de WSD durante 16 días de post-infección en el tratamiento 27-27-27 °C (promedios de 3 réplicas) (Sonnenholzner *et al.* 2002). Se muestra además los resultados de la simulación corrida a 27 °C con los mencionados datos iniciales.....94
- Figura 21. Datos reales del experimento de Sonnenholzner et al. (2002) mostrando el desarrollo de la epidemia de WSD durante 16 días de post-infección en el tratamiento 27-27-27 °C y predicciones del modelo epidémico de Soto y Lotz (2002) corrida a 27 °C con los mencionados datos iniciales.....96

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Listado de virus que afectan a los camarones peneidos en los sistemas de cultivo (Lightner y Pantoja, 2001).....	15
Tabla 2. Dosis de diluciones de tejidos de material infectado y SPF no infectado y cuantificación de la carga de WSSV (por análisis de PCR a tiempo real en muestras de ADN extraídas de las papillas del desafío) en el Bioensayo 3.....	48
Tabla 3. Peso otorgado a los órganos / tejidos afectados por WSSV en el índice histológico de WSSV.....	49
Tabla 4. Ejemplo para elaborar el índice histológico para WSSV.....	50
Tabla 5. Tabla de contingencia usada para evaluar la concordancia entre las predicciones del modelo y los datos reales .....	58
Tabla 6. Porcentajes de mortalidad acumulada (%) al día 5 p.i. con WSSV y tiempo en morir de <i>Penaeus vannamei</i> desafiados por ingestión (5 diluciones de tejido de material infectado y SPF no infectado: 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 y 1:100) e inmersión (5 diluciones de inóculo viral de WSSV: $1.25 \times 10^{-3}$ , $1.0 \times 10^{-3}$ , $8.0 \times 10^{-4}$ , $3.3 \times 10^{-4}$ y $1.7 \times 10^{-4}$ mL de inóculo viral por mL <sup>-1</sup> de medio de cultivo).....	60
Tabla 7. Porcentajes de mortalidad final acumulada (%) al día 10 p.i. con WSSV de <i>Penaeus vannamei</i> desafiados por ingestión (3 diluciones de tejido de material infectado y SPF no infectado: 1:1, 1:5 y 1:10) en forma individual o colectiva (n = 60 por cada desafío, totalizando 180 camarones por cada tipo de desafío). Resultados del Bioensayo 2.....	61
Tabla 8. Tablas de contingencia entre infección a WSSV (por análisis de PCR con iniciadores de Kimura) a los 3 días p.i. y ruta de infección (ingestión e inmersión), niveles de temperatura (29, 31 y 33 °C) y concentración de WSSV	

( $1.35 \times 10^8$ ,  $2.93 \times 10^7$  y  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales/animal).....64

Tabla 9. Probabilidad de transmisión (Beta,  $\beta$ ) para distintos niveles de temperatura y ruta de transmisión viral. Cada probabilidad es el promedio de los valores obtenidos a las 3 concentraciones de carga viral ( $1.35 \times 10^8$ ,  $2.93 \times 10^7$  y  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales/animal). Bioensayo 3.....65

Tabla 10. Modelo de regresión múltipe que explica la contribución de la temperatura y la ruta de transmisión viral a la variabilidad de la probabilidad de transmisión (Beta,  $\beta$ ) en los datos del Bioensayo 3. ....66

Tabla 11. Tablas de contingencia entre ocurrencia de la enfermedad de Mancha Blanca (determinada a través del análisis de histología por la presencia de al menos 1 órgano afectado) a los 3 días p.i. y ruta de infección (ingestión e inmersión), temperatura (29, 31 y 33 °C) y concentración de WSSV ( $1.35 \times 10^8$ ,  $2.93 \times 10^7$  y  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales/animal). ....69

Tabla 12. Influencia de la temperatura, ruta de transmisión viral sobre la enfermedad a los 3 d p.i. en el Bioensayo 3. Resultados del análisis de regresión logística.....70

Tabla 13. Tablas de contingencia entre mortalidad a los 3 días p.i. y ruta de infección (ingestión e inmersión), niveles de temperatura (29, 31 y 33 °C) y concentración de WSSV ( $1.35 \times 10^8$ ,  $2.93 \times 10^7$  y  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales/animal).....73

Tabla 14. Modelo de regresión logística que explica la contribución de la temperatura, y la carga viral sobre la mortalidad a los 3 d p.i. en el Bioensayo 3. ....74

Tabla 15. Habilidad predictiva del modelo epidémico de WSD para los individuos susceptibles, infectados, enfermos y muertos de los 18 tratamientos del Bioensayo 3.....84

## LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Protocolo CENAIM de mantenimiento de postlarvas de <i>Penaeus vannamei</i> en condición de salud Specific Pathogen Free (SPF).....	121
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
d	Días
E	Enfermos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación
G	Gramos
g	Gravedades
Gl	Grados de libertad
h	Horas
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
I	Infectados
IC	Intervalo de confianza
IH	Indice histológico
IHHNV	Virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (infectious haematopoietic hypodermic necrosis virus)
L	Litro
LD <sub>50</sub>	Dosis letal que mata al 50 % de la población de estudio en un periodo de tiempo dado.
LD <sub>90</sub>	Dosis letal para que mata al 90 % de la población de estudio en un periodo de tiempo dado.
M	Muertos
NHPB	hepatopancreatitis bacterial

OR	Oportunidad de riesgo (Odds ratio)
p.i.	post-infección
plg	pulgada
PCR	Amplificación de ADN empleando la reacción en cadena de la polimerasa
ppm	Partes por millón
RR	Riesgo relativo
RT PCR	Amplificación en tiempo real de ADN empleando la reacción en cadena de la polimerasa
S	Susceptibles
SIR	Modelos epidémicos de animales susceptibles, infectados y removidos
SPF	Specific Pathogen Free (libre de patógenos específicos)
TN	Tampón Tris-HCl, NaCl
TSV	Virus del síndrome de Taura (Taura syndrome virus)
UV	Ultravioleta
WSD	Enfermedad de la Mancha Blanca (white spot disease)
WSSV	Virus del síndrome de la Mancha Blanca (white spot syndrome virus)
YHV	Virus de la Cabeza Amarilla (yellow head virus)

## RESUMEN

En el presente trabajo se planteó estudiar la variabilidad del número de animales susceptibles (no infectados), infectados, enfermos y muertos en una población de camarones juveniles *Penaeus vannamei* afectada con la enfermedad de la Mancha Blanca (WSD), en función de la temperatura, carga viral y ruta de transmisión viral. Se realizaron tres bioensayos desafiando los animales (0.3 – 1.2 g) con el virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).

El Bioensayo 1, fue diseñado para obtener a través de infecciones individuales, niveles letales ( $LD_{50}$  y  $LD_{90}$ ) de concentración de WSSV. Sin importar la ruta de transmisión (ingestión o inmersión) o concentración de carga viral (5 concentraciones de material infectado), los individuos que fueron desafiados en forma aislada presentaron muy bajas mortalidades ( $< 16.7\%$ ). Por lo tanto, no fue posible obtener las dosis letales de WSSV.

En el Bioensayo 2, al comparar la mortalidad, en desafíos por ingestión, entre individuos aislados e individuos desafiados colectivamente, se observó que consistentemente con los resultados del Bioensayo 1, los individuos desafiados en forma aislada presentaron una baja mortalidad ( $< 5\%$ ). Mientras que, la mortalidad en los individuos desafiados colectivamente fue superior (hasta el  $100\%$ ) y estuvo relacionada con la carga viral. Los resultados de ambos bioensayos sugieren que los animales pueden controlar la enfermedad si ellos no son re infectados. Mientras que, la agrupación de individuos aumentaría las posibilidades de transmisión secundaria e incrementaría los niveles de infección.

En el Bioensayo 3 fue diseñado para estudiar la relación de la carga viral, ruta de transmisión y temperatura sobre la transmisión, patogenicidad y virulencia. A través del análisis de PCR (transmisión) e histología (patogenicidad), se encontró que la infección y la enfermedad de juveniles Specific Pathogen-Free (SPF) estuvieron relacionadas con la ruta de transmisión viral y la temperatura, siendo significativamente más efectivas por inmersión que por ingestión. Con respecto a la temperatura, se observó significativamente mayores prevalencias en los individuos desafiados a 29 °C. En tanto que, se encontró mayores ocurrencias de infección y de enfermedad a 33 que a 31 °C. Sin embargo, el índice histológico, que combinó la ocurrencia y el grado de enfermedad en una sola variable, mostró una tendencia lineal decreciente relacionada a la temperatura. Así, en términos de severidad, los animales desafiados a 33 °C estuvieron menos enfermos que los desafiados a 29 o 31 °C. Por otro lado, se encontró similares porcentajes de infección y de enfermedad usando diferentes concentraciones de carga viral, sugiriendo que la mínima carga viral efectiva que se usó, fue suficiente para producir la infección y el desarrollo de la enfermedad. La mortalidad estuvo directamente relacionada con los niveles de carga viral e inversamente relacionado con la temperatura. Las mayores mortalidades se encontraron a 29 °C, en tanto la mortalidad a 33 °C fue inexistente a todas las concentraciones empleadas.

Los resultados obtenidos en el Bioensayo 3 permitieron determinar las probabilidades de transmisión, patencia y mortalidad. Esta información sirvió para desarrollar un modelo dinámico de la epidemia de WSD, el cuál al ser evaluado, presentó valores predictivos satisfactorios. El modelo propuesto resulta en una contribución al modelo epidémico de la enfermedad de la Mancha Blanca, al asumir que sus principales parámetros (susceptibilidad, patogenicidad y virulencia) no son constantes, sino dependientes de las

variables previamente estudiadas. Se pretende además, que el modelo propuesto sirva en el futuro como un prototipo para el desarrollo de modelos teóricos para otras enfermedades infecciosas en camarones *P. vannamei*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción camaronera, en todas sus fases de cultivo, es atractiva para la inversión económica debido a los altos niveles de ganancias y a la creciente demanda del mercado internacional. Esto se ha visto reflejado en el crecimiento acelerado durante las últimas tres décadas de la producción de camarones peneidos de cultivo (FAO, 2003). En la década de los 80, la producción mundial experimentó un especial crecimiento, debido principalmente al incremento del área de cultivo. Sin embargo, a partir de los 90, la producción se vio afectada por problemas graves relacionados con brotes de enfermedades infecciosas, lo que junto a la disminución de los precios en los mercados internacionales ha conllevado a serias pérdidas económicas (Chamberlain, 2001).

La enfermedad de la Mancha Blanca (WSD, por sus siglas en inglés), producida por el virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV, por sus siglas en inglés), es considerada como una de las enfermedades virales de mayor patogenicidad en los camarones peneidos (Lo *et al.*, 1996). Desde 1999, el WSSV ha afectado los niveles productivos del camarón blanco *Penaeus vannamei* en varios países del hemisferio occidental (Jory y Dixon 1999). En Ecuador, la producción decreció de un promedio anual de 1900 lb ha<sup>-1</sup> en 1998 a menos de 600 lb ha<sup>-1</sup> entre el 2000 y 2001, con niveles de supervivencia promedios entre 0 y 20 % (CORPEI, 2001). Actualmente, en Ecuador las mortalidades ocasionadas por el WSSV han decrecido, en parte debido a las prácticas de manejo emprendidas por los productores. No obstante, todavía ocurren brotes de Mancha Blanca, incluso en los meses cálidos, que repercuten negativamente en la producción final. En general, existen muchos vacíos de conocimiento relacionados con el efecto de los determinantes básicos sobre la dinámica de una epidemia de WSD. En tal sentido, una de las metodologías que la

epidemiología humana y veterinaria utiliza para profundizar en el entendimiento de la dinámica de las epidemias y para predecir su ocurrencia en diferentes circunstancias, es el desarrollo de modelos teóricos.

Como una contribución al conocimiento sobre la dinámica de la enfermedad de la Mancha Blanca, en esta tesis se plantea como objetivo general estudiar la variabilidad en el tiempo de los componentes de una población de camarones *P. vannamei* afectada por la enfermedad: animales susceptibles ó no infectados, infectados, enfermos y muertos, en función de tres determinantes básicos de WSD: temperatura, ruta de transmisión viral y carga viral. Como objetivos específicos se planteó: i) estudiar el efecto de las variables de estudio sobre los parámetros de transmisión, patogenicidad y virulencia de WSSV, ii) determinar la ruta de transmisión viral que produce un mayor porcentaje de animales infectados, y iii) determinar la combinación de temperatura y carga viral que produce un mayor porcentaje de animales enfermos. La metodología usada para cumplir los objetivos fue el desarrollo de un modelo teórico de la epidemia de Mancha Blanca en función de los tres determinantes previamente mencionados. Es importante resaltar que, el modelo propuesto es una simplificación de la enfermedad, ya que debido a la naturaleza multifactorial de la WSD, es un hecho que muchas otras variables están asociadas con la dinámica de la epidemia. Sin embargo, se ha privilegiado utilizar las tres variables en mención a otras tales como, edad del animal, resistencia genética, estrés, u otros, por la mayor facilidad de manipulación y porque la literatura muestra que son claves para la dinámica de la epidemia. Así, al momento se conoce que, la temperatura es el determinante más importante de la enfermedad. Por ejemplo, determinadas zonas productivas latinoamericanas, tales como la zona camaronera del Caribe Colombiano, no han sido gravemente afectadas por el virus, lo que ha sido relacionado con temperaturas

de cultivo entre 28 y 29 °C. Además, estudios realizados en el CENAIM han demostrado que animales infectados pueden sobrevivir al virus, si son cultivados a temperaturas de 33 °C (Sonnenholzner *et al.*, 2002), mostrando que la temperatura juega un papel predominante en la disminución del impacto de la enfermedad (Vidal *et al.*, 2001). Otros estudios, realizados en el CENAIM, sugieren que la transmisión viral por inmersión es una importante ruta de transmisión horizontal, la que inclusive podría producir mayores niveles de infección que la transmisión por ingestión (Blake 2004), explicando en parte, la alta prevalencia del virus en los camarones ecuatorianos. De acuerdo a Durand y Lightner (2002), la carga viral de los tejidos de camarón infectado es uno de los más importantes factores en la progresión y transmisión de la enfermedad. Mientras que otros autores coinciden en que se obtienen diferencias significativas en la mortalidad de acuerdo a la concentración de carga viral y que además distintas rutas de transmisión viral producen diferentes niveles de mortalidad en animales desafiados con WSSV (Wu *et al.*, 2001 y Prior *et al.*, 2003).

El modelo desarrollado en esta tesis constituye el segundo modelo epidémico de WSD para camarones *P. vannamei*, luego del propuesto por Lotz y Soto (2002), donde los autores definen a los parámetros de transmisión, patogenicidad y mortalidad como constantes fijas y dependientes únicamente del tamaño de la población. Por tanto, el modelo propuesto resulta en una contribución significativa al modelo epidémico de Mancha Blanca, al asumir que tales parámetros no son constantes, sino dependientes de las variables previamente estudiadas. Se pretende además, que el desarrollo de este modelo sirva en el futuro como un prototipo para el desarrollo de modelos teóricos para otras enfermedades infecciosas en camarones *P. vannamei*.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. PRINCIPIOS DE UNA ENFERMEDAD

El término *enfermedad* se refiere a una alteración del estado normal de salud, cuantificable en términos de la reducción de la supervivencia o crecimiento (Kinne 1980).

En el caso de *enfermedades infecciosas*, un organismo o agente patógeno (virus, rickettsias, bacterias, hongos, protozoarios o anélidos) infecta otro organismo (*hospedero*). La *infección* constituye la entrada, desarrollo y multiplicación del agente dentro del organismo del hospedero. Según de Blas *et al.* (*in press*), la evolución temporal de una enfermedad determina ciertos patrones conocidos como: enfermedades *endémicas* (la enfermedad ocurre en forma constante con un equilibrio entre el agente y el hospedero), *hiperendémica* (la enfermedad ocurre en forma endémica pero afectando a un elevado porcentaje de la población), *epidémica* (aumento abrupto de la enfermedad, con desequilibrio a favor del agente), *pandémica* (epidemia de gran propagación geográfica), *mixta* (patrones epidémicos y endémicos), *esporádica* (brotes irregulares de una enfermedad) ó *anadémica* (originada por un único foco común).

### 2.2. DETERMINANTES DE LA ENFERMEDAD

La presencia del agente patógeno es una *causa necesaria*, pero no *suficiente* para que ocurra una enfermedad infecciosa. Además del agente etiológico se conocen otros dos determinantes de una enfermedad. Por un lado, están las condiciones de susceptibilidad (fisiológicas y genéticas) del hospedero, y por otro lado, las características del ambiente (ambiente físico y manejo). Este último es muy importante en la acuicultura, ya que la

intensificación, práctica común en los sistemas de producción animal, origina complejas interacciones entre los determinantes de la enfermedad. En tales condiciones, aún un pequeño cambio en algunos de estos factores puede provocar suficiente estrés para causar la expresión de la enfermedad. Los tres determinantes conforman lo que se ha denominado la *triada epidemiológica* (Martín *et al.*, 1988). Según el concepto de la triada, la enfermedad ocurre cuando se presenta una combinación de los tres determinantes (Figura 1). Por ejemplo, en el caso de la Mancha Blanca (WSD), la enfermedad es causada por condiciones propicias del camarón, el agente (WSSV) y el ambiente presente en las piscinas de cultivo (Figura 1). Dependiendo de la gravedad de la enfermedad se registrarán distintos niveles de *morbilidad*, ó probabilidad de que los individuos de una población adquieran la enfermedad en un momento (el término morbilidad es referido como incidencia) o periodo de tiempo, en éste caso, el término corresponde exactamente a la prevalencia de la enfermedad. *Mortalidad* se refiere a la probabilidad de que los individuos de la población mueran como consecuencia de una determinada enfermedad en un periodo de tiempo, que impactará en mayor o menor grado en la producción.

En las *enfermedades simples*, el agente infeccioso es el determinante principal y los determinantes ligados al hospedero y al ambiente son de menor importancia. En las *enfermedades complejas*, predomina una naturaleza multifactorial con interacciones entre el agente, el hospedero y el ambiente (Thrusfield 1995).

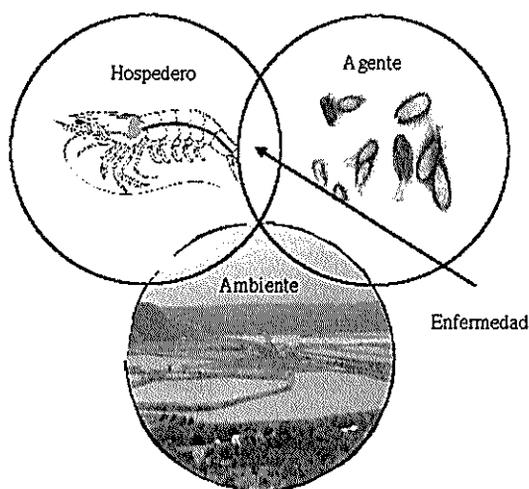


Figura 1. Triada epidemiológica conformada por los tres determinantes (agente, hospedero y ambiente) de una enfermedad. Ejemplo para el caso de la enfermedad de la Mancha Blanca.

### 2.2.1. Determinantes del agente

Los agentes patógenos poseen ciertas características que determinan una enfermedad. Así, la *contagiosidad* o habilidad del agente para propagarse en una población está directamente relacionada con la *incidencia* o *tasa de ataque* (nuevos enfermos o infectados con respecto al total de individuos susceptibles) (Thrusfield 1995; de Blas *et al.*, *in press*). La *infecciosidad*, es la capacidad de un agente patógeno de introducirse, multiplicarse y transmitirse en los tejidos del hospedero, lo que está directamente relacionado con la *dosis de infección*, o *nivel umbral de carga infecciosa* que debe superarse para que se produzca una *infección efectiva*. La infección puede ser *inaparente* (infección sin síntomas o signos clínicos) o *aparente* (cuando se observan signos clínicos). Esta última puede ocurrir en distintas intensidades: leve, moderada, aguda, crónica o grave (de Blas *et al.*, *in press*). La *patogenicidad* es la capacidad de un agente patógeno de multiplicarse en el organismo y desarrollar la enfermedad y es estimada por el número de individuos infectados que enferman (de Blas *et al.*, *in press*). La *virulencia*

es el potencial de un agente para producir cuadros agudos y/o graves (de Blas *et al.*, *in press*) y puede ser estimada a partir de la *letalidad* (calculada como el número de animales enfermos que mueren), donde las *dosis de niveles letales de concentración viral* ( $LD_{50}$  y  $LD_{90}$ ), que matan al 50 y 90 % de la población, son los parámetros utilizados para su estimación. La *estabilidad* corresponde al tiempo durante el cual el agente puede mantener su infecciosidad fuera del hospedero. Mientras que, la *antigenicidad* es la capacidad del agente para producir una respuesta defensiva (inmune) en el hospedero (de Blas *et al.*, *in press*; Thrusfield 1995).

### 2.2.2. Determinantes del hospedero

Las características del hospedero tales como: especie, raza, sexo, edad, tamaño, anatomía, estado fisiológico, características genéticas y capacidad reproductiva constituyen los *determinantes intrínsecos* del individuo. Estos están relacionados con la *susceptibilidad*, que es la sensibilidad del individuo a infectarse tras la exposición al agente patógeno. La susceptibilidad está fuertemente condicionada por el estado inmunitario del individuo, pudiendo variar con las especies y el estadio de vida del hospedero (Thrusfield 1995; Wang *et al.*, 1999). Por otro lado, la *receptividad*, que es la posibilidad de que un hospedero permita la entrada y multiplicación de un agente patógeno en sus tejidos, también está relacionada fundamentalmente con las características intrínsecas de los individuos (de Blas *et al.*, *in press*). Según el *teorema del umbral mínimo*, debe existir una determinada proporción de animales susceptibles, denominada, *listón de Kendall*, para que ocurra la enfermedad (de Blas *et al.*, *in press*).

### 2.2.3. Determinantes ambientales

Los *determinantes ambientales* o *extrínsecos* son las características del medio que pueden actuar como causa, generalmente como inductores de *estrés* (respuesta no específica del organismo ante cualquier demanda que se le imponga, Selye 1936), ó como medio de transporte de los agentes causales (de Blas *et al.*, *in press*). Los determinantes ambientales incluyen la localidad, el clima, la nutrición, factores sociales o de comportamiento (territorialidad, gregarismo, etc) y las prácticas de manejo. Por ejemplo, se ha probado en camarones, que la alta densidad y determinadas condiciones ambientales de cultivo son factores estresantes y predisponen al animal a las enfermedades infecciosas (Lightner y Redman 1998). La temperatura del agua es probablemente la variable ambiental más importante en la mayoría de las especies, dado que afecta directamente al metabolismo animal. Así, la temperatura influye sobre el consumo de oxígeno, crecimiento, muda, supervivencia, y en general en el desarrollo de las enfermedades en peneidos (Chen *et al.*, 1995; Hennig y Andreatta 1998).

### 2.3. DINAMICA TEMPORAL DE LA INFECCIÓN – ENFERMEDAD

Según Halloran (1998), en toda enfermedad infecciosa, las *líneas temporales de la infecciosidad* (Figura 2) incluyen: i) el *periodo de latencia*, que es el intervalo de tiempo entre la infección y el desarrollo de la infectividad; ii) el *periodo de infectividad o infectante* del hospedero, que es el periodo de tiempo durante el cual el hospedero puede infectar a otros hospederos y; iii) periodo *no infeccioso o no infectante*, al que se llega por recuperación de la infección, por el desarrollo de inmunidad o por la muerte. Mientras que, las *líneas temporales de la enfermedad* (Figura 2) incluyen: i) el *periodo de incubación* o periodo de tiempo desde la infección hasta la presentación de signos

clínicos de la enfermedad; ii) el *periodo sintomático o de enfermedad*, que es el periodo durante el cual se presentan los signos clínicos característicos de la enfermedad y; iii) *periodo de no enfermedad*, cuando eventualmente el hospedero deja el estado sintomático por recuperación de los síntomas o por la muerte (Figura 2). Si el hospedero se recupera de los síntomas pero mantiene su capacidad de infectar otros hospederos se convierte en un *portador infeccioso*.

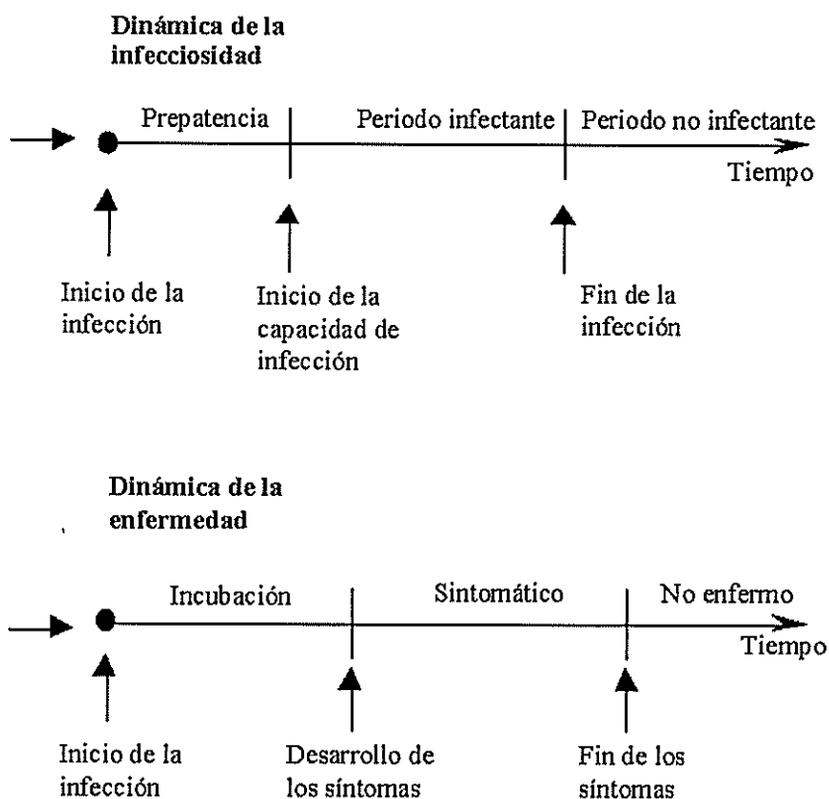


Figura 2. Dinámica de la infecciosidad y enfermedad (Halloran 1998)

La configuración de las líneas temporales de la infecciosidad, la enfermedad y su relación entre una y otra, son específicas para cada agente y tienen implicaciones determinantes para implementar medidas de control y prevención de una enfermedad (Halloran 1998). Por ejemplo, en el caso de humanos, la varicela, producida por el

herpesvirus de la varicela-zoster, tiene un periodo latente más corto que el de incubación. La transmisión ocurre principalmente previo al desarrollo de los síntomas, por lo que, en términos de disminuir la transmisión de la enfermedad, no tiene mucho sentido no enviar a los niños a la escuela cuando se comienzan a manifestar los síntomas. Por el contrario, la malaria tiene un periodo de incubación de 14 días, tras el que se inicia el periodo infectivo, que dura aproximadamente 10 días. En este caso, los esfuerzos para reducir la transmisión, una vez detectados los síntomas, son importantes para evitar un brote de la enfermedad. Al respecto, existen tres tipos de *medidas de prevención y control de enfermedades*: primarias, secundarias y terciarias. Las *medidas primarias* son actividades de prevención de la enfermedad, realizadas durante el periodo latente y van dirigidas a prevenir la exposición a factores causales. Las *medidas secundarias* son ejecutadas entre la detección del patógeno y la ocurrencia de la enfermedad clínica. Mientras que las *medidas terciarias* (de terapia o de control) son ejecutadas una vez que se ha producido la enfermedad clínica. Puesto que es más económico prevenir que curar, el énfasis en el control sanitario debe ser dado a la implementación de medidas primarias y secundarias.

#### 2.4. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

Los *mecanismos de transmisión* constituyen las formas en que el agente patógeno se pone en contacto con el *portal de entrada* de los individuos susceptibles, lo que está muy relacionado con el *portal de salida* de los infectados (Figura 3). Los portales corresponden a los sitios, a través de los cuales el agente infeccioso logra entrar al hospedero y, a través de los cuales sale al medio (Thrusfield 1995).

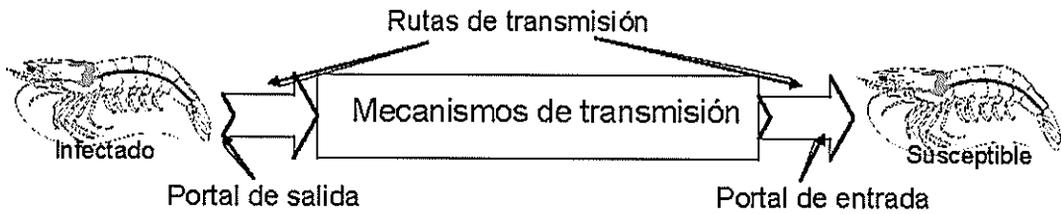


Figura 3. Esquema representando los mecanismos de transmisión, rutas de infección y los portales de entrada y salida de los agentes patógenos.

Los mecanismos de transmisión se clasifican en transmisión horizontal y vertical:

*Transmisión horizontal:* Es la que se produce entre dos segmentos de una población. A su vez, puede ser clasificada como i) *transmisión directa*, correspondiente al caso de las *enfermedades contagiosas*, donde el hospedero contrae la infección por contacto físico directo con el infectado (por ejemplo, a través del canibalismo) o por las secreciones y excreciones infectadas (vómitos, heces) y; ii) *transmisión indirecta*, correspondiente a las *enfermedades transmisibles*, donde la transmisión es producida por un vehículo animado o inanimado intermediario, que a su vez es clasificado como: *fomites* (vehículos inanimados, por ejemplo un carro, calzado, instrumentos, etc.), *reservorios* (vehículos animados, especialmente animales refractarios a la enfermedad, en los que el agente es localizado en el pico, aparato digestivo, patas, etc.) y *vectores*, que hace referencia a todos los seres vivos, pero especialmente utilizado para los invertebrados, donde además el vector puede ser *pasivo* (el agente no se multiplica dentro del vector) o *biológico* (el agente evoluciona al interior del vector).

*Transmisión vertical:* Es la transmisión producida por los individuos de una generación a su descendencia y puede ser de dos tipos: i) *hereditaria*, donde el agente patógeno es

aportado directamente en el genoma de los progenitores y ii) *congénita*, donde la transmisión se produce en fases próximas al nacimiento, pudiendo ser principalmente *germinativa* (infección en capas superficiales del ovario o del óvulo), *embrionaria* (el embrión de los mamíferos es infectado) y *trasplacentaria* (infección del embrión a través de la placenta).

## 2.5. RUTAS DE TRANSMISIÓN

Las rutas de transmisión son las vías de entradas y salida del agente patógeno (Figura 3), pudiendo ser: i) *oral*: cuando el agente patógeno entra al hospedero por vía oral en forma directa o indirecta (a través del agua y de los alimentos ingeridos), ii) *respiratoria*: por inhalación de material orgánico (transmisión aereógena) y iii) *superficies corporales*: cuando el agente entra en contacto con los epitelios del hospedero a través de distintas vías tales como, *percutánea* (el agente se introduce y se elimina directamente a través de la piel), *inoculación* (el agente se introduce a través de heridas) y *urogenital* (el agente penetra a través del aparato urinario o genital, iv) *iatrogénica*: la infección se produce accidentalmente por una práctica médica y iv) *a larga distancia*: ligada a los intercambios comerciales, al transporte de individuos y a la propagación de agentes patógenos a través del viento.

## 2.6. PATÓGENOS DEL CAMARÓN DE CULTIVO

La expansión mundial de la industria del cultivo de camarón ha provocado el incremento de las enfermedades en los sistemas de producción, afectando tanto la supervivencia como el crecimiento de los animales durante los ciclos de producción. Desde hace algunos años, las enfermedades son consideradas el mayor limitante para el desarrollo de la industria (Subasinghe 1997). Las enfermedades de camarón cultivado pueden ser infecciosas o no infecciosas (Lightner y Redman 1998). Como se mencionó previamente, las enfermedades infecciosas son provocadas por un agente patógeno; mientras que, las enfermedades no infecciosas son originadas por factores abióticos, tales como, químicos tóxicos, ambiente desfavorable, desbalances nutricionales o factores genéticos. Las enfermedades infecciosas, especialmente las de origen bacterial y viral, han provocado los principales problemas en el cultivo del camarón, ocasionando las pérdidas económicas más graves. En el caso de las enfermedades virales, su manejo se ve dificultado porque el camarón carece de un sistema inmune antígeno-anticuerpo. Por consiguiente, las vacunas, que tradicionalmente se utilizan en otras especies, no son aplicables. Al momento, se conocen más de 30 enfermedades de etiología viral que afectan a los crustáceos, incluyendo a los peneidos (Sangamaheswaran y Jeyaseelan, 2001).

La epidemia mundial causada por el WSSV provocó la peor crisis de la industria camaronera mundial, causando la quiebra económica de productores en todo el mundo (Jory y Dixon 1999). La pandemia marcó un período crítico sin precedentes en la industria camaronera, provocando derrumbamientos espectaculares de las industrias acuícolas en varios países, tales como, China, Tailandia, Indonesia, Taiwán y Ecuador (Chamberlain, 2001).

A pesar de que en los pasados 20 años se ha realizado un progreso considerable en describir y entender una gama de enfermedades bacterianas (Anderson *et al.*, 1988; Lightner 1988; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990) y virales (Johnson 1983; Lightner 1985; Lightner y Redman 1990; Owens *et al.*, 1991; Lightner *et al.*, 1992; Boonyaratpalin *et al.*, 1993; Owens 1993; Takahashi *et al.*, 1994; Flegel *et al.*, 1995; Hasson *et al.*, 1995; Lightner 1996; Spann *et al.*, 1997), se conoce poco acerca de la dinámica de las epidemias de etiología viral.

#### **2.6.1. Virus en los camarones peneidos**

Los mayores grupos de virus reportados en crustáceos incluyen las familias: Reoviridae, Picornaviridae, Parvoviridae, Togaviridae, Baculoviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae e Iridoviridae (Bonami y Lightner 1991). Se conocen aproximadamente veinte virus que afectan a los camarones peneidos (Tabla 1), la mayor parte de los cuales han sido descubiertos a raíz de sus efectos negativos sobre la acuicultura (Lightner 1996). De acuerdo a Lightner y Redman (1998) al menos 13 enfermedades virales de los camarones peneidos de cultivo están reconocidas, de las cuales según Lightner (1999), únicamente cuatro tienen importancia económica para la industria acuícola: el virus de la cabeza amarilla (YHV), el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), el virus del síndrome de Taura (TSV) y el WSSV.

Tabla 1. Listado de virus que afectan a los camarones peneidos en los sistemas de cultivo (Lightner y Pantoja, 2001).

Virus ADN	Referencias
<b>Parvovirus (Parvoviridae)</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>IHHNV: virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética</li> <li>HPV: parvovirus hepatopancreático</li> <li>SMV: virus de la mortalidad de camarones aislados en desove</li> <li>LPV: virus similar al parvovirus linfoidal</li> </ul>	Lightner <i>et al.</i> , 1983 Bonami <i>et al.</i> , 1990 Lightner y Redman, 1985 Fraser y Owens, 1996 Owens <i>et al.</i> , 1991
<b>Baculovirus y virus similares a los baculovirus</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Tipo B: virus del tipo de baculovirus penaei (especies del tipo PvSNPV). Líneas de Bp del Golfo de México, Hawai y Pacífico Este</li> <li>Tipo-MBV: baculovirus del tipo <i>Penaeus monodon</i> (especies del tipo PmSNPV). Líneas de MBV del Este y Sudeste Asiático y la región Indopacífica</li> <li>Tipo-BMN: virus del tipo baculovirus necrótico del tracto intestinal medio BMN = de <i>P. japonicus</i> en Japón</li> <li>TCBV: baculovirus del tipo C de <i>P. monodon</i>.</li> <li>PHRV: virus hemocítico infeccioso no ocluido similar al baculovirus</li> </ul>	Couch, 1974a, 1974b Bonami <i>et al.</i> , 1995 Lightner <i>et al.</i> , 1983 Wang <i>et al.</i> , 1996 Momoyama y Sano, 1989 Arimoto <i>et al.</i> , 1995 Mari <i>et al.</i> , 1993 Chang <i>et al.</i> , 1993 Owens, 1993
<b>Virus del Síndrome de la Mancha Blanca</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>SEMBV: virus sistémico ectodérmico y mesodérmico similar al baculovirus</li> <li>RV-PJ: virus con forma de bastón del <i>P. japonicus</i></li> <li>PAV: virus de la viremia aguda de los Peneidos</li> <li>IHHNV: virus necrótico epidérmico y hematopoyético similar al baculovirus, agente del SEDS (enfermedad epidémica explosiva del camarón)</li> <li>WSBV: virus de la Mancha Blanca similar al baculovirus</li> <li>PRDV: virus de DNA en forma de bastón de los peneidos</li> <li>WSV: virus de la Mancha Blanca</li> </ul>	Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1995 Takahashi <i>et al.</i> , 1994 Huang <i>et al.</i> , 1995 Wang <i>et al.</i> , 1995, 1998 Lo <i>et al.</i> , 1996, 1997a, 1999 Durand <i>et al.</i> , 1996, 1997 Chou <i>et al.</i> , 1995 Kimura <i>et al.</i> , 1996 Kasornchandra <i>et al.</i> , 1995 Van Hulten <i>et al.</i> , 2000
<b>Iridovirus:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>IRIDO: iridovirus del camarón</li> </ul>	Lightner y Redman, 1993
<b>Virus RNA</b>	
<b>Picornavirus (Picornaviridae)</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>TSV: virus del síndrome de Taura</li> </ul>	Lightner <i>et al.</i> , 1995 Brock <i>et al.</i> , 1995, 1997 Hasson <i>et al.</i> , 1995 Bonami <i>et al.</i> , 1997 Mari <i>et al.</i> , 1998 Nunan <i>et al.</i> , 1998
<b>Reoviruses</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>REO-III-IV: virus similar al REO del tipo II y IV</li> </ul>	Tsing y Bonami, 1987 Adams y Bonami, 1991
<b>Virus similar al TOGA</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Virus de vacuolización del órgano linfoide</li> </ul>	Bonami <i>et al.</i> , 1992 Lightner, 1996
<b>Rhabdovirus:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Rhado virus de los camarones peneidos</li> </ul>	Nadala <i>et al.</i> , 1992 Lu y Loh, 1994
<b>Grupo de Virus de Cabeza Amarilla</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>YHV/YBV: virus de cabeza amarilla del <i>P. monodon</i></li> <li>GAV: virus asociado a las branquias del <i>P. monodon</i></li> <li>LOV: virus del órgano linfoide de <i>P. monodon</i></li> </ul>	Chantanachookin <i>et al.</i> , 1993 Boonyaratpalin <i>et al.</i> , 1993 Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1997 Tang y Lightner, 1999 Flegel <i>et al.</i> , 1995 Spann <i>et al.</i> , 1995, 1997

## 2.7. LA ENFERMEDAD DE LA MANCHA BLANCA

El WSD es hasta el momento la más devastadora enfermedad reportada para camarones peneidos cultivados (Lightner 1996; Flegel 1997). El WSSV fue reconocido al principio de la década de los 90 en el este y suroeste de Asia, propagándose rápidamente por todo el mundo. En Ecuador, se detectó en junio de 1999 en la provincia de Esmeraldas y rápidamente se propagó al resto de las provincias costeras ecuatorianas (Calderón *et al.*, 1999).

Los animales afectados con la enfermedad muestran un decrecimiento en el consumo de alimento, comportamiento letárgico, coloración rojiza y en ocasiones manchas blancas (0.5 a 2.0 mm de diámetro) sobre la superficie interna de la cutícula (Wang *et al.*, 1999b). Como toda enfermedad infecciosa, la Mancha Blanca presenta tres aspectos relevantes: i) intervienen dos organismos diferentes, esto es el hospedero y el agente infeccioso, ii) la ocurrencia del evento infeccioso en un individuo depende de la ocurrencia en otros miembros de la población y iii) la prevalencia de la infección y el curso de la enfermedad están determinados por las interacciones entre el animal, el agente infeccioso y el medio circundante al animal.

### 2.7.1. Determinantes del WSSV

#### 2.7.1.1. Determinantes del agente

El WSSV presenta altos niveles de infecciosidad, contagiosidad, patogenicidad y virulencia. Con respecto a la infecciosidad se ha encontrado que entre las 24 y 35 h post

infección (p.i.) el virus se multiplica 140 veces en los tejidos del individuo (Tang y Lightner, 2000). Los cuadros aparentes de infección aguda causan alta mortalidad en las primeras 2 semanas de infección en especies *P. monodon*, *Penaeus indicus* y *Penaeus penicillatus* (Nakano *et al.*, 1994; Chou *et al.*, 1995). El WSSV presenta una baja especificidad y virtualmente puede ser transmitido a cualquier especie de crustáceos, los cuales se comportan, en la mayoría de los casos, como portadores asintomáticos (Lo *et al.* 1996; Supamattaya *et al.*, 1998). Sin embargo, es extremadamente patogénico y virulento en camarones. La literatura reporta que, la patogenicidad, en contraste a la transmisión, es afectada por la temperatura, siendo este un factor crítico para la supervivencia de una población de camarones de cultivo (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003). En condiciones de laboratorio, los brotes de mortalidad ocurren entre los 3 y 10 días a partir de que se observan los primeros síntomas produciendo una letalidad de hasta el 100 % (Chou *et al.*, 1995; Wongteerasupaya *et al.*, 1995).

La información disponible al momento sobre Mancha Blanca indica que los periodos de latencia y de incubación son muy cortos, con un periodo latente ligeramente más corto que el de incubación. Así, en condiciones experimentales, se ha observado que el periodo latente se extiende hasta 1.5 o 2 días luego de la infección (Sonnenholzner *et al.*, 2002). Posteriormente, se presenta el periodo infeccioso y, casi inmediatamente, el periodo sintomático y de lesiones histológicas. En el campo, en un experimento parcelando una piscina con mallas larveras se observó que luego de la siembra de animales negativos para WSSV, los animales se infectaron con el virus entre los días 33 y 39, al mismo tiempo en casi todas las parcelas (Bayot *et al.*, 2005), indicando que el periodo latente fue muy corto, dando paso inmediatamente al periodo infeccioso. El periodo de incubación pudo haber tenido una duración muy cercana al periodo latente, ya que hasta el día 43 se

presentaron mortalidades de hasta el 80 %. Mientras que en los días 43 y 47 se presentó el máximo porcentaje (100 %) de animales infectados. Por tanto, se presentó un desfase entre los picos de mortalidades y prevalencia, con un adelanto en la mortalidad con respecto al de la prevalencia. En tales condiciones, los animales menos resistentes pudieron sucumbir más rápidamente y ser el detonante para que la epidemia ocurra con una prevalencia del 100 % a los días 43 y 47. Un segundo brote epidémico a los 106 días de cultivo apoya la idea de la resistencia. En el experimento, los animales más resistentes pudieron sobrevivir a un primer brote epidémico, pero no al segundo. En el mismo experimento se observó que luego de que el 100 % de la población se infectó con el virus (días 43 y 47), la prevalencia decreció hasta un 4 %, señalando evidencias a favor de la hipótesis de una limpieza del virus (Granja *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2003; Momoyama *et al.*, 1994). La ocurrencia en Ecuador de brotes severos de WSD de *P. vannamei* ocurren principalmente en los primeros 47 días de cultivo, con máximas frecuencias de ocurrencia entre 29 y 41 días (Bayot *et al.*, 2004).

#### 2.7.1.1. Determinantes del hospedero

El WSSV tiene una gran diversidad de hospederos, ya que todos los crustáceos sometidos a pruebas de desafío han mostrado ser susceptibles de infectarse con el virus (Wang *et al.*, 1997; Corbel *et al.*, 2001; Jiravanichpaisal *et al.*, 2001), pudiendo actuar como vectores y o reservorios (Wang *et al.*, 1997). La susceptibilidad y mortalidad pueden variar de acuerdo a las especies y el estado de vida del hospedero (Wang *et al.*, 1999; Sahul *et al.*, 2000). Así, se han observado infecciones inaparentes en *Macrobrachium* sp., cangrejos y langostas silvestres (Wang *et al.*, 1998). Se han reportado mortalidades entre los 3 y 6 d p.i. en post-larvas de *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum* y *P. vannamei*. Mientras que, se ha observado mortalidades acumuladas del 100 % en juveniles de *Penaeus setiferus* y

*P. vannamei* a los 8 d p.i.; en contraste *P. aztecus* ha demostrado ser más resistente, observándose un 27 % de mortalidad acumulada durante el mismo tiempo de infección (Lightner y Redman, 1998). En tanto que, en cangrejos *Liocarcinus puber* y *Liocarcinus depurator*, se presenta 100 % de mortalidad entre los 8 y 9 d p.i., respectivamente (Corbel *et al.*, 2001).

Los animales en estadios tempranos (larvas y postlarvas) pueden ser infectados, pero la literatura reporta infecciones con prevalencias y mortalidades bajas. Sin embargo, las mortalidades ocurren en juveniles y preadultos. Mientras que, los animales adultos (reproductores) no mueren al ser desafiados con WSSV (Guevara 2003). Esto explica por que los problemas se presentan en las granjas y no en los laboratorios de cultivo de larvas. No se conoce suficientemente porque las larvas infectadas no desarrollan la enfermedad. Al respecto, se ha sugerido que el virus no se replica o tarda en replicarse en estadios tempranos y por tanto no se desarrolla la enfermedad (Yoganandhan *et al.*, 2003) Mientras que, se menciona que el sistema inmune de los adultos es maduro con respecto a juveniles, lo que le confiere una mayor capacidad para hacerle frente a las infecciones de diferente tipo.

Otro argumento usado para explicar la menor prevalencia en animales pequeños se refiere a que los animales pequeños comparado con los animales grandes, presentan una mayor frecuencia de muda (Cadena, 2000). La probabilidad de replicación del virus al interior del organismo sería menor con una mayor frecuencia de mudas porque el virus no tendría oportunidad de encontrar fácilmente las vías de acceso, ya que los hemocitos estarían migrando para proteger al epitelio cuticular (Echeverría *et al.*, 2002). La presencia de la cutícula conferiría cierta protección frente al ingreso de WSSV. En contraste, cuando

ocurre la muda ya no se contaría con tal protección, lo que facilitaría el ingreso de agentes patógenos al interior del hospedero. Es muy probable que esta sea la causa por la que los camarones infectados con WSSV mueran en post-muda (Echeverría *et al.*, 2002). Lo que implica que el camarón sería más susceptible durante la premuda tardía (Echeverría *et al.*, 2002).

### 2.7.1.3. Determinantes ambientales

La temperatura ha mostrado afectar la susceptibilidad de los peneidos a la exposición a WSSV (Chou *et al.*, 1995; Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002), aunque en investigaciones realizadas en el CENAIM por Guevara (2003) no se encontró diferencias significativas en cuanto a supervivencia en animales sometidos a temperaturas de 27 y 33 °C. En *P. vannamei* la susceptibilidad al virus sería mayor a temperaturas bajas (inferiores a 29 °C); así, se ha encontrado que la estación fría / seca es un importante factor de riesgo en la ocurrencia de brotes de WSD en Ecuador (Rodríguez *et al.*, 2003).

En ensayos de desafío a diferentes temperaturas se ha detectado resistencia a la manifestación de la enfermedad en condiciones de hipertermia (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002). Granja *et al.* (2003) plantean que se produce un mayor índice de apoptosis en juveniles de *P. vannamei* mantenidos a 33 °C respecto a los que permanecen a temperatura ambiente (25 °C), lo cual apoya la hipótesis de que la apoptosis controla la propagación del virus en condiciones de hipertermia. Sin embargo, la apoptosis no es suficiente para eliminar el virus, ya que cuando disminuye la temperatura del agua se observa mortalidades elevadas. Blake (2004) sugiere que la apoptosis puede ser considerada como una de las primeras respuestas de los camarones ante las

infecciones virales, aunque este mecanismo no parece ser muy eficaz para frenar la entrada del virus en los animales que son más susceptibles al virus. No obstante, los camarones más resistentes, además de la apoptosis, contarían con otros mecanismos de defensa frente a WSSV, tales como, infiltración de hemocitos hacia los tejidos, regeneración del órgano linfoide y formación de esferoides Tipo A (Blake 2004).

Por otro lado, las condiciones de estrés agravan la magnitud de una epidemia de WSD. En tal sentido, se ha mencionado que una mayor densidad y/o número de animales determina que una epidemia sea más agresiva (Bayot *et al.*, 2005).

### **2.7.2. Mecanismos y rutas de infección del WSSV**

Existen varios métodos para desafiar de manera experimental a crustáceos en condiciones experimentales, tales como: inyección de un extracto de tejido infectado, 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 epidémicos (Lotz y Soto, 2002).

Se ha comprobado que el virus utiliza un mecanismo de transmisión horizontal, a través del contacto con el medio acuático (Flegel 1997; Flegel *et al.*, 1998) e ingestión oral (Mohan *et al.*, 1997 y Chou *et al.*, 1998). La transmisión vertical ha sido probada por Lo *et al.* (1997b) y Mohan *et al.* (1997). De acuerdo a Wang *et al.* (1999a) los oocitos pueden ser infectados con WSSV pero son incapaces de desarrollarse y mueren antes de la maduración. Más recientemente, Maeda *et al.* (2003) plantean que los cultivos *in vitro*

primarios de células ováricas de *Marsupenaeus japonicus* son altamente sensibles a la infección por WSSV. Varios autores (Lotz y Soto, 2002; Wu *et al.*, 2001 y Chou *et al.*, 1998) plantean que la transmisión oral es la forma predominante de transmisión, debido principalmente al comportamiento caníbal de los animales, siendo estimado en un orden de magnitud superior a la transmisión por cohabitación (Lotz y Soto, 2002). Un trabajo reciente en el CENAIM encontró que la transmisión por contacto con el agua produce una prevalencia de WSSV superior con respecto a la transmisión por ingestión (Blake, 2004).

### 2.7.3. Métodos de diagnóstico

Las técnicas de diagnóstico de enfermedades para camarones peneidos se basan en métodos tradicionalmente usados en el diagnóstico de enfermedades en peces y humanos. En el caso del WSSV, las técnicas de diagnóstico más utilizadas son: el análisis de reacción de polimerización en cadena (PCR), PCR anidado, reacciones con sondas moleculares (hibridación *in situ*, inmunohistoquímica) y observaciones histológicas con microscopios ópticos y microscopios electrónicos de transmisión.

Las observaciones histológicas han encontrado que en determinadas circunstancias los camarones con severas infecciones muestran una marcada necrosis en el órgano linfoide, muy similar a la observada en infecciones por YHV (Pantoja y Lightner, 2003). Se considera que es muy probable la ocurrencia simultánea de ambas infecciones (Durand *et al.*, 2000). La similitud de las lesiones provocadas por ambos virus, observadas mediante histología en tejidos como el órgano linfoide, han causado errores de diagnóstico; hemocitos con picnosis y cariorexix han sido relacionados con ambos virus (Pantoja y

Lightner, 2003). La lesión causada por WSSV se caracteriza por la hipertrofia de los núcleos en células infectadas, similar a los cuerpos de inclusión eosinófilos denominados Cowdry A, observados en la etapa temprana de la infección (Momoyama *et al.*, 1994; Lightner y Chen, 2000), los cuales son muy frecuentes en el tejido conectivo del estómago (Pantoja y Lightner, 2003). Cuando la infección es avanzada estos cuerpos de inclusión son basófilos (Lightner y Chen, 2000).

Los métodos de análisis moleculares, tales como, las reacciones con sondas moleculares y amplificación del ADN por el PCR son comúnmente aplicados para el diagnóstico de ciertas enfermedades infecciosas de camarones peneidos (Lightner y Pantoja, 2001). Cuando se conoce las secuencias específicas de los ácidos nucleicos del ADN (virus, bacterias, etc.) es posible sintetizar iniciadores. Con el PCR es posible detectar cantidades muy pequeñas de ADN, que no podrían ser detectadas por otros medios. Esto se logra usando iniciadores de oligonucleótidos específicos diseñados para hibridar en la secuencia del ADN que se desea amplificar. El producto resultante del PCR puede entonces ser comparado con un estándar conocido, usando electroforesis en un gel de agarosa. También se puede realizar una reacción con una sonda de ADN específica de los productos de PCR impregnados en una membrana de nitrocelulosa en pruebas de tipo “Southern transfer” (Innis *et al.*, 1990; Perkin 1992).

Existen programas de computación que ayudan a seleccionar los iniciadores óptimos, cuando la información de la secuencia del ADN que se desea detectar está disponible (Innis *et al.*, 1990; Perkin 1992). La técnica de PCR ha sido aplicada a la investigación y detección de patógenos en la mayoría de los virus de importancia en el cultivo moderno del camarón (Wang *et al.*, 1996; Nunan *et al.*, 2000; Lightner 1999).

El PCR ha demostrado ser una herramienta de diagnóstico de gran alcance para la detección temprana de la infección con WSSV debido a su sensibilidad alta (Lo *et al.*, 1996; Wongteerasupaya *et al.*, 1996). El sentido práctico de la técnica de PCR la hace ideal como método de diagnóstico rutinario para la detección rápida de WSSV (Tang *et al.*, 2001). Presentando además la ventaja de tratarse de una prueba confirmatoria.

Debido a la carencia de líneas de cultivo de tejidos de camarón, no ha sido posible la cuantificación de las partículas virales de WSSV. El método cuantitativo de PCR en tiempo real ha sido desarrollado y aplicado en la cuantificación de numerosos virus humanos como el virus del herpes simple (Ryncarz *et al.*, 1999), Epstein-Barr virus (Kimura, *et al.*, 1999), cytomegalovirus humano (Nistche *et al.*, 1999), virus de la hepatitis B (Cane *et al.*, 1999), virus de la inmunodeficiencia humana (Lewin *et al.*, 1999). El método de PCR en Tiempo Real está basado en la actividad exonucleasa 5'-3' de la TaqDNA Golden polimerasa que resulta en el corte de las sondas fluorescentes marcadas durante el PCR. La intensidad de la fluorescencia es entonces medida por el Sistema de Detección Secuencial. La sonda Taqman es localizada entre dos iniciadores del PCR y tiene una temperatura de fusión (10 °C) mayor que la de los iniciadores. La unión de la sonda TaqMan y los iniciadores es crucial que se realice con anterioridad, porque sin ella los productos del PCR se formarían sin generación de intensidad fluorescente y sin ser detectados. La sonda TaqMan presenta dos marcadores fluorescentes unidos a ella. Uno de ellos es un reportero teñido, 6 – carboxifluoresceína, el cual presenta un espectro de emisión apagado por la proximidad de otro teñido por 6 – carboxi-tetrametil rodamina. La degradación de la sonda TaqMan por la acción de la Taq DNA polimerasa, libera al reportero teñido de la actividad como apagador del 6 – carboxi-tetrametil rodamina, incrementándose la fluorescencia con el incremento del hendidido de la sonda, el cual es proporcional a la cantidad de productos del PCR que se

forman (Leutenegger 2001). La cuantificación de la cantidad de blanco en muestras desconocidas es compuesta por la medida y empleo de una curva estándar para determinar el número inicial de copias (Durant *et al.*, 2003). Este método ha sido aplicado para medir el contenido de WSSV de inóculos empleados para desafiar camarones en bioensayos *per os*, inmersión e inyección (Durand y Lightner 2002; Blake 2004).

## 2.7. MODELOS EPIDÉMICOS

Debido a la gravedad del impacto de las epidemias en la industria acuícola mundial y a la gran cantidad de vacíos de conocimientos sobre las enfermedades, es importante emprender estudios que permitan un mejor entendimiento de estas epidemias y de las herramientas matemáticas para su control. En tal sentido, los modelos teóricos que cuentan con una adecuada cantidad de información experimental pueden reproducir una epidemia bajo distintas circunstancias. Esto se consigue a través de imitaciones o analogías, donde se simula el fenómeno en cuestión (siempre más simple que la realidad), que puede ser manipulado por el usuario. Si el modelo es representado con herramientas matemáticas, se lo conoce como modelo matemático (Juárez y Navarro 1998).

Se han formulado numerosos modelos matemáticos describiendo la dinámica de enfermedades infecciosas en poblaciones humanas (Anderson y May 1979; May y Anderson 1990; de Jong 1995; Hethcote, 2000; Gerbier *et al.*, 2002; Koella y Antia, 2003, entre otros). Por el contrario, existen pocos estudios similares para especies acuáticas (Reno 1998; Ogut, 2001; Murray y Gaughan, 2003). Hasta la fecha, se han elaborado modelos matemáticos para las enfermedades de los síndromes de Taura, de la Mancha Blanca y de la hepatopancreatitis bacteriana (NHPB) en camarones *P. vannamei* y

*P. setiferus* (Soto *et al.*, 2001, Soto y Lotz, 2001, Lotz y Soto, 2002, Soto y Lotz, 2003, Lotz *et al.*, 2003, Vincent y Lotz, 2006).

En general, todo modelo matemático se construye con ciertos pasos secuenciales: i) concepción de un problema proveniente del mundo real, ii) establecimiento de un marco teórico y de las hipótesis asociadas al modelo, que puedan ser probadas en forma matemática, iii) identificación de las variables de entrada (independientes) y respuesta (dependientes), iv) aplicación de los procedimientos matemáticos disponibles, para obtener variables de respuesta a partir de las variables de entrada, v) validación y verificación de las variables de respuesta predichas por el modelo y las observadas en el mundo real y vi) retroalimentación del modelo.

El modelo determinístico clásico de una epidemia (Modelos SIR) categoriza la población en tres grupos: susceptibles (S), infectados (I) y removidos (R) (Anderson y May 1979). Otros grupos pueden ser incorporados a un modelo dependiendo de las particularidades de cada enfermedad, del nivel de complejidad al que se quiere llegar o, de la información disponible. Por ejemplo, la expresión (1) muestra una representación sencilla de una epidemia, donde el 100 % de una población  $N(t)$  a un tiempo  $t$  se clasifica entre los animales S, I y enfermos (E).

$$N(t) = S_t + I_t + E_t \quad (1)$$

### 2.8.1. Modelo epidémico de la Mancha Blanca

El primer intento de reproducir una enfermedad de camarón en un contexto matemático fue realizado por Lotz y Soto (2002). Estos autores continuaron abordando el modelo propuesto y lo extendieron al virus del síndrome de Taura (TSV) (Lotz *et al.*, 2003; Soto y Lotz, 2003). Con anterioridad estos autores habían establecido los coeficientes de transmisión para WSSV en *P. vannamei* y *P. setiferus*, tanto por cohabitación, como por ingestión (Soto y Lotz 2001). Para Soto y Lotz la transmisión depende únicamente del número de animales susceptibles e infectados, por tanto, consideran que la transmisión es constante e independiente de otros factores, tales como la temperatura o la carga viral presente en el medio.

Según el modelo de Lotz y Soto (2002) los animales de una piscina pueden ser clasificados en:

i) animales *susceptibles* (S): animales no infectados por el virus, pero capaces de infectarse en cualquier momento del ciclo de producción, ii) animales *latentes* (I) infectados con el virus, iii) animales *enfermos* (E) de forma aguda por WSSV, iv) *mueritos* (M) a lo largo del ciclo de producción y v) mueritos *removidos*, correspondiente a animales muertos que dejan de ser infecciosos, por descomposición, o por que son comidos por otros animales.

La dinámica de la epidemia sigue el esquema mostrado en la Figura 4. Donde los animales susceptibles pasan a ser latentes de acuerdo a la probabilidad de transmisión del virus ( $\beta$ ). Una vez que el animal es infectado, tiene una probabilidad ( $\gamma$ ), denominada patencia, de que la infección se convierta en aguda o crónica. Una vez que el animal está

enfermo tiene una probabilidad de morir ( $\alpha$ ), denominada virulencia. Finalmente, existirá una probabilidad ( $\delta$ ) de que un camarón infeccioso muerto se convierta en no infeccioso po:

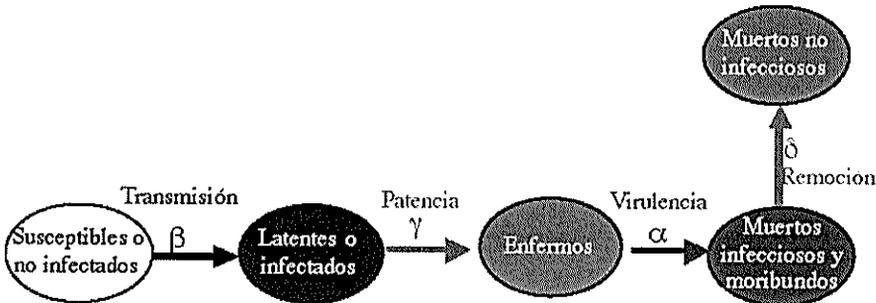


Figura 4. Dinámica simplificada de la enfermedad de la Mancha Blanca (WSD) durante el curso de una epidemia. Los óvalos representan los posibles estados de un animal durante un ciclo de producción en una piscina. Las probabilidades de paso de un estado a otro están representadas por letras griegas ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ).

El resultado final del modelo es la variación en el tiempo del número de animales susceptibles, infectados, enfermos y muertos. Para llegar a obtener tal variación es necesario cuantificar las principales características que definen la dinámica de la epidemia. Esto se consigue determinando la transmisión, patencia, virulencia (letalidad) y remoción, las mismas que están en función de las probabilidades  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\delta$ . Soto y Lotz (2001) a través de varias experimentaciones, determinaron que los valores de las probabilidades  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\delta$  para transmisión por cohabitación eran iguales a 0.5, 0.5, 0.27 y 0.1, respectivamente. Según su modelo estos valores son fijos y por tanto las soluciones son las mismas para distintas condiciones de temperatura o carga viral (Figura 5).

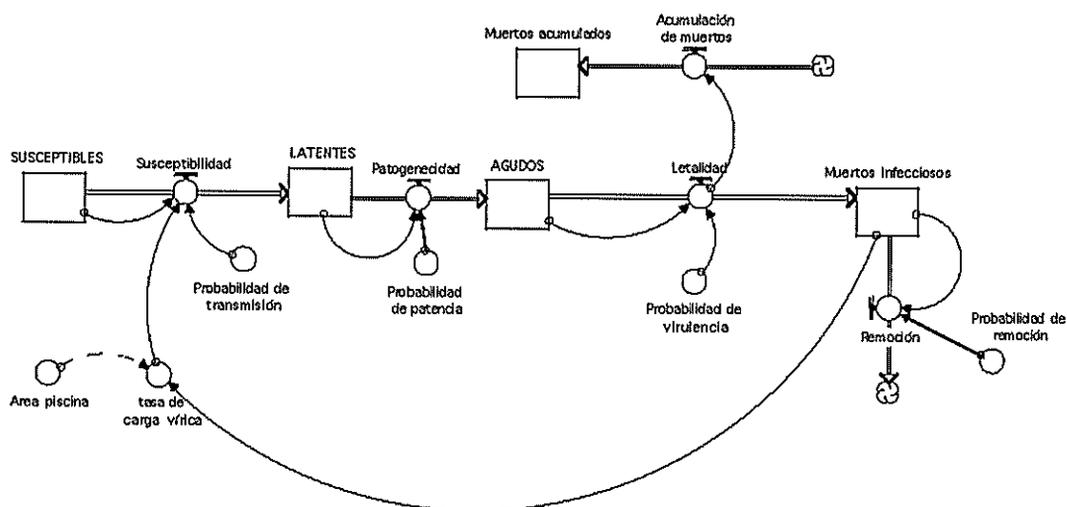


Figura 5. Modelo conceptual propuesto por Lotz y Soto (2002), representando la dinámica de una epidemia de Mancha Blanca. Las variables o grupos de población (animales susceptibles, latentes (infectados), agudos (enfermos), muertos infecciosos y muertos acumulados) están representados por cuadrados. Los parámetros o probabilidades de paso de un estado a otro están representados por círculos (probabilidades de transmisión, patencia, virulencia y remoción,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ , respectivamente). La transferencia de material (susceptibilidad, patogenicidad, letalidad y remoción) está representada por tubos. La transferencia de información está representada por flechas curvas. El modelo ha sido simulado en Stella 8.1.1.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

En este estudio se realizaron 3 bioensayos con juveniles de la especie *P. vannamei* originarios de un lote de 600000 nauplios (Specific Pathogen-Free, SPF) provistos por Shrimp Improvement System (Florida, USA). Un lote de 200000 nauplios fue cultivado en un tanque de fibra de vidrio (5000 L) en la sala de aislamiento (set 16) del CENAIM siguiendo un protocolo diseñado para mantener la condición SPF (Anexo 1). El cultivo se realizó con agua de mar filtrada (filtros de piola y de polipropileno), esterilizada por luz ultravioleta (300000  $\mu$ Ws) y con un sistema cerrado, hasta zoea 3. Después de zoea 3 se realizó un recambio diario (1 al 15 %). La salinidad del agua se mantuvo alrededor de 35 ‰ y la temperatura del agua osciló entre 30 y 31 °C. Los animales fueron alimentados cada 2 a 3 horas con una mezcla de fitoplancton, *Artemia sp.* y alimento artificial (Molino 50<sup>TM</sup>). A partir de PL15 los animales fueron alimentados sólo con alimento artificial. La mayoría de los animales de este lote fueron utilizados por el Area de Virología del CENAIM y al momento de inicio de los experimentos de este estudio se contó con un remanente de aproximadamente 1000 animales SPF. Debido al escaso número de animales SPF se prefirió reservarlos para el experimento central de este estudio (Bioensayo 3). Mientras que, los Bioensayos 1 y 2 se realizaron con animales provenientes de un lote de 200000 nauplios SPF originarios del lote inicial de nauplios proporcionados por Shrimp Improvement Systems, pero que luego fueron expuestos previamente por el Area de Virología a un tratamiento de WSSV inactivado con formalina en los primeros estadios larvales de: zoea 1, zoea 2, zoea 3 y mysis 1, siguiendo el protocolo de Melena *et al.* (*in press*). Las suspensiones con WSSV inactivado fueron

aplicadas por inmersión y adicionadas al tanque de cultivo de 1000 L (set 16) a razón de 1ml L<sup>-1</sup>. En cada ocasión, las larvas fueron expuestas durante 6 horas, realizando luego un recambio de agua del 100 %. El protocolo de cultivo de estos animales fue igual al utilizado en los animales SPF.

### 3.2. CONTROL DE LA CONDICIÓN SPF

Durante el periodo de larvicultura, se colectó muestras aleatorias de animales para controlar la condición SPF. En cada ocasión se colectó 100 nauplios/zoeas, 40 mysis/PL1/PL10 y posteriormente 20 PL (hasta PL42), siguiendo el protocolo descrito por Melena *et al.* (*in press*). Los animales fueron fijados en una solución de etanol al 95 % para posterior determinación de WSSV mediante PCR anidado, usando los iniciadores diseñados por Kimura *et al.* (1996). Previo al inicio del Bioensayo 1, se colectó en forma aleatoria 96 individuos del tanque conteniendo los animales SPF (tamaño de muestra necesario para detectar con un 95 % de confianza al menos un animal positivo de una población de 1000 animales con una prevalencia estimada del 3 %). Los análisis de PCR se realizaron en forma individual. La PCR mostró que todas las muestras procesadas fueron negativas para WSSV.

### 3.3. OBTENCION DE BIOMASA INFECTADA

Para la preparación de la biomasa infectada se utilizaron animales provenientes de la estación experimental del CENAIM ubicada en la localidad de Palmar (Provincia del Guayas), a 150 Km de Guayaquil, al oeste de la carretera costera que conecta Santa Elena con Puerto López, a 2° 00' 51.40" S, 80° 43' 21.17" W. Los desafíos fueron realizados en el

set 22 (sala de cuarentena) del CENAIM. Se hicieron dos desafíos virales con aproximadamente 340 individuos de 10.0 g de peso promedio por desafío. Los animales fueron colocados en gavetas plásticas de 50 L de agua de mar filtrada, a razón de 10 animales por gaveta y mantenidos a temperatura ambiente y sin alimento durante las 24 h previas a la infección. Tejido de camarones *P. vannamei* (exoesqueleto y apéndices) infectados con WSSV (mantenido como stock de papilla viral madre en CENAIM) fue suministrado como papilla al 10 % de la biomasa en cada una de las gavetas. Para incrementar la susceptibilidad al WSSV en los animales del segundo desafío se aplicó un estrés de temperatura a las 12 h p.i., provocando un descenso brusco de temperatura desde 28 a 23 °C. En ambos desafíos, los animales moribundos y muertos entre las 24 y 48 p.i. fueron retirados y desechados. Para la preparación de la papilla infectada, se colectó entre las 48 y 120 h p.i. los animales muertos o moribundos que presentaban signos externos severos de WSSV. Mientras que, los animales observados en estado de descomposición fueron rechazados. Los animales colectados fueron conservados a -80 °C y los sobrevivientes luego de las 120 h p.i. fueron desechados. En cada ocasión, una muestra (10 animales escogidos en forma aleatoria) de la biomasa colectada fue sometida a PCR anidado usando los iniciadores de Kimura *et al.* (1996), siendo diagnosticados posteriormente como positivos a WSSV en grado severo. Además, se verificó la calidad del ADN de las muestras colectadas usando un control interno (Tang y Lightner, 2000).

### 3.4. SOLUCIÓN DE INÓCULO VIRAL MADRE PARA LA INFECCIÓN POR INMERSIÓN

La solución viral para la infección por inmersión fue preparada siguiendo el protocolo del CENAIM. Se utilizaron los camarones enteros colectados como papilla viral, a los que se les eliminó los hepatopáncreas para evitar la degradación del producto por sus enzimas. Los camarones fueron macerados y homogeneizados en tampón TN 1X (20 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4) en una relación 1:5. El homogenizado fue centrifugado a 1780 g por 10 minutos. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (Advantac). Durante unos minutos la solución fue mantenida en hielo hasta el momento de la inoculación y preservada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para experiencias posteriores. Las infecciones por inmersión se hicieron en función de la dilución requerida de solución de inóculo viral madre (1:5) con respecto al volumen del medio empleado en cada unidad experimental.

### 3.5. PREPARACIÓN DE LA PAPILLA INFECTADA

En los desafíos por ingestión se utilizó papilla preparada con diluciones de tejido de material infectado y animales SPF no infectados. Los materiales fueron mezclados y homogenizados antes de proporcionarlos a los animales de experimentación. Se utilizó 5 diluciones del inóculo viral madre: 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 y 1:100, que correspondieron a proporciones de 100, 20, 10, 2 y 1 % de material infectado con respecto al total del alimento suministrado. En cada caso, se utilizó músculo (sin cutícula) debido a la facilidad de homogenización y porque la literatura reporta que la transmisión de WSSV por ingestión de la cola es similar a la de la cabeza (Soto *et al.*, 2001). Para incrementar las

posibilidades de que los camarones desafiados consuman la papilla suministrada se sometió a los animales a un régimen sin alimentación por 48 horas.

### 3.6. AREAS EXPERIMENTALES Y SISTEMAS DE CALEFACCIÓN

Los bioensayos se realizaron en los sets experimentales 1 y 2 del CENAIM, cuya disposición interna se muestra en las Figuras 6 y 7.

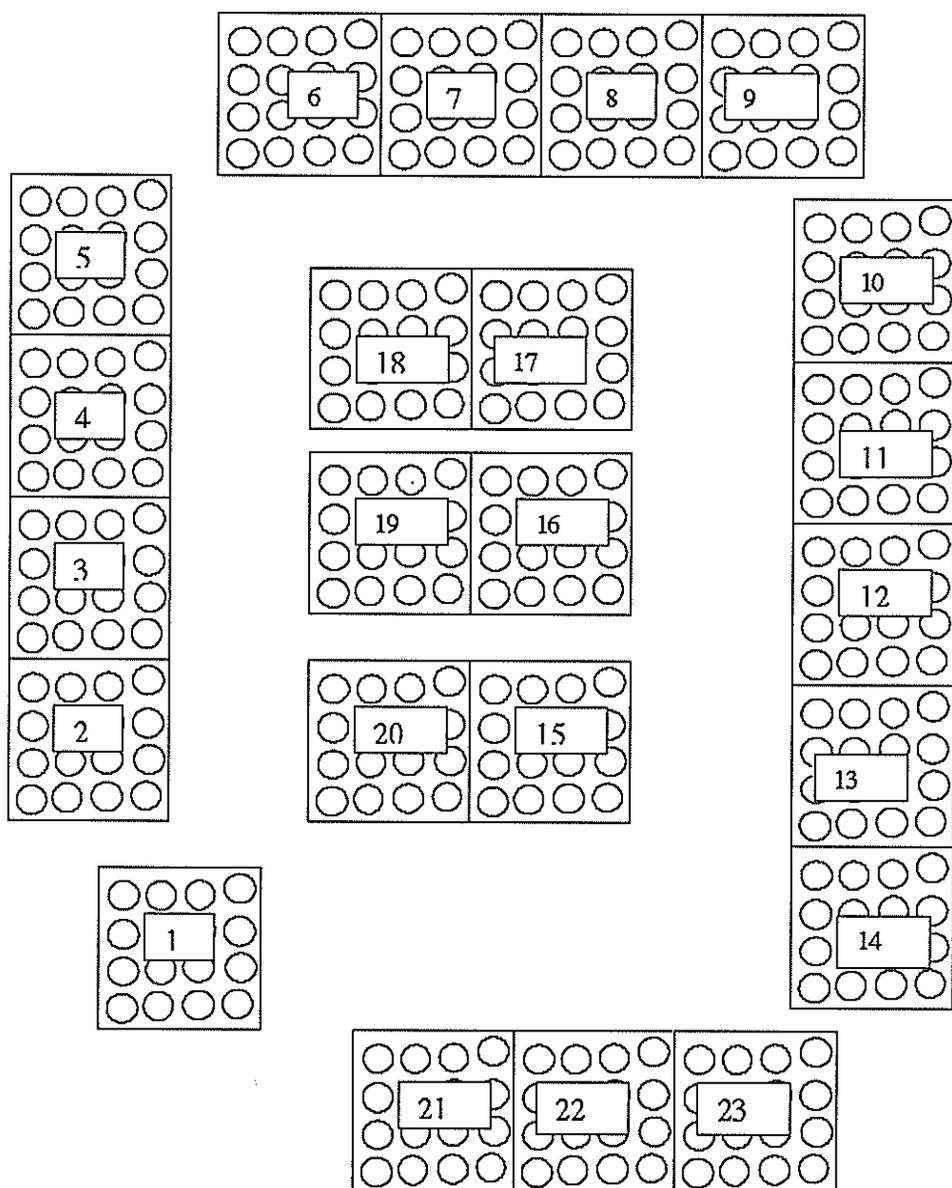


Figura 6. Distribución de las unidades experimentales al interior del set 1 compuestas por frascos de vidrio de 2 L (círculos), los cuales se encontraron distribuidos en 23 bandejas (cuadrados), a razón de 16 frascos/bandeja. Cada frasco contuvo 1 camarón. Bioensayos 1, 2 y 3.

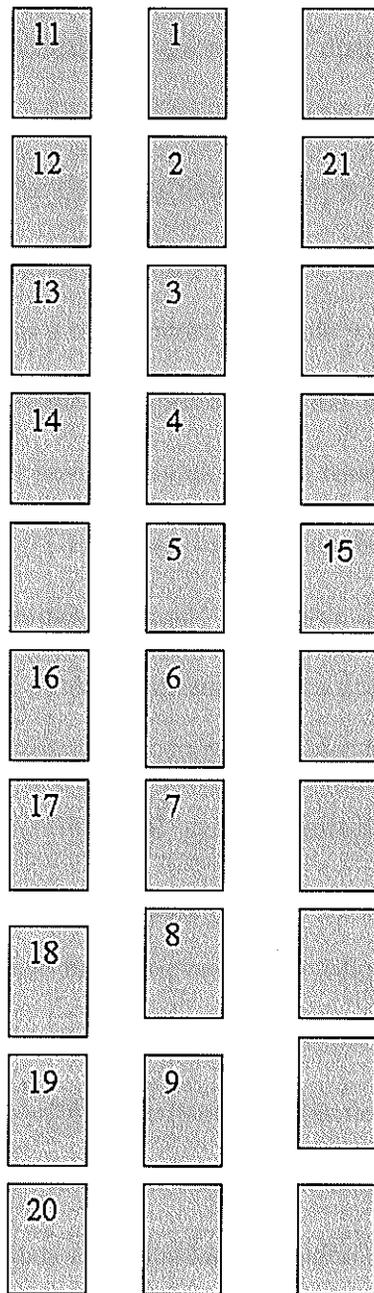


Figura 7. Distribución de las unidades experimentales (acuarios de 50 L) del set 2 compuestas de acuarios de 50 L de capacidad. Bioensayos 2 y 3.

Las unidades experimentales del set 1 estuvieron compuestas por frascos de vidrio (carameleras) de 2 L, los cuales se encontraron distribuidos en 23 bandejas (Figura 6). Cada una de las bandejas contuvo 16 frascos. Las bandejas utilizadas en los bioensayos de este estudio fueron llenadas con agua dulce a temperatura ambiente; por tanto los frascos de vidrio estuvieron asentados en un *Baño María* con el agua de las bandejas. Se trabajó con el agua de las bandejas a temperatura ambiente y para las bandejas que correspondían a tratamientos con temperatura superior a la del ambiente se utilizó un sistema de recirculación de agua, que llevó agua dulce de un reservorio (calentada por gas y regulada por un termostato a 32 °C) a cada una de las bandejas. Las temperaturas de los tratamientos fueron obtenidas regulando el flujo de entrada de agua caliente en cada una de las bandejas. Una vez obtenida la temperatura deseada al interior de las bandejas, el flujo de agua dulce se mantuvo constante. Previo al inicio de los experimentos se determinó que la temperatura del agua al interior de los frascos de vidrio fue aproximadamente igual a la del agua de las bandejas. Durante los experimentos, la temperatura de las bandejas fue observada cada 2 horas. Los valores de temperatura de agua al interior de las bandejas durante los experimentos mostraron una aceptable precisión y exactitud alrededor de las temperaturas de tratamientos, siendo reportados en esta tesis como: media  $\pm$  desviación estándar de la media. Cada uno de los frascos se mantuvo con aireación constante y tapados para evitar contaminación ambiental.

Las unidades experimentales del set 2 fueron 21 acuarios de 50 L de capacidad, provistos de aireación constante (Figura 7). Las temperaturas de experimentación se obtuvieron con calentadores de barra eléctricos de 100 W (Visi-Therm), que permitieron regular la temperatura del medio de experimentación con una aceptable precisión y exactitud alrededor de los valores de las temperaturas de tratamientos. La desinfección de las áreas

y unidades experimentales se realizó antes y después de cada bioensayo con jabón neutro, agua clorada durante 24 h a 100 ppm y declorada durante 48 h. El agua de mar fue esterilizada con filtros de piola (0.25  $\mu\text{m}$ ) y luz ultravioleta.

### 3.7. BIOENSAYO 1. EXPLORACIÓN DE LOS NIVELES DE CARGA VIRAL

La escasez de información sobre niveles de concentración viral durante brotes de WSD en las piscinas de producción de camarones evidenció la necesidad de determinar niveles de concentración viral que produjeran distintos valores de mortalidad. Por tal motivo, el objetivo de este bioensayo fue determinar niveles letales de concentración viral ( $\text{LD}_{50}$  y  $\text{LD}_{90}$ ) que mataran al 50 y 90 % de la población desafiada con WSSV en las dos rutas de transmisión viral (ingestión e inmersión) utilizadas en este estudio. Los niveles de concentración viral que produjeran altas ( $\text{LD}_{90}$ ), medianas ( $\text{LD}_{50}$ ) y bajas mortalidades ( $< \text{LD}_{50}$ ) en la exploración de los niveles de carga viral serían utilizados en el Bioensayo 3 (Transmisión y Patogenicidad de WSSV). El experimento se basó principalmente en la experiencia de Prior *et al.* (2003) para determinar dosis infectivas letales de WSSV y TSV en camarones juveniles *P. vannamei*.

#### 3.7.1. Material biológico

Debido a la escasa cantidad de animales SPF se decidió usar en el Bioensayo 1, animales SPF que en sus primeros estadios larvales habían recibido un tratamiento previo con WSSV inactivado. Para el efecto, se utilizaron 360 animales ( $0.3 \pm 0.1$  g) que fueron sembrados en el set 1 (Figura 6) a razón de 1 animal por frasco y aclimatados durante 48 h en las unidades experimentales. Durante las 24 horas previas al desafío no se suministró alimento a los animales para garantizar la ingestión de la papilla, en el caso de los

desafíos por ingestión, y para mantener la calidad del agua, en el caso de los animales desafiados por inmersión.

### **3.7.2. Diseño del experimento**

Las unidades experimentales estuvieron constituidas por los frascos (carameleras) de 2 L, llenados con 500 mL de agua de mar filtrada y esterilizada por UV (set 1). La variable de respuesta fue la mortalidad final a los 5 d p.i., registrada en cada individuo como variable dicotómica (vivo o muerto). Se utilizó dos variables explicatorias: i) carga viral con 5 niveles (obtenidos con proporciones de material infectado y animales SPF no infectados) y ii) ruta de transmisión con 2 niveles (ingestión e inmersión). En los desafíos por ingestión se utilizaron diluciones de tejido de material infectado y SPF no infectado (1:1, 1:5, 1:10, 1:50 y 1:100), correspondiendo a proporciones de 100, 20, 10, 2 y 1% de material infectado con respecto al total del alimento suministrado. En los desafíos por inmersión, 5 dosis de la solución de inóculo viral madre (1:5) fueron adicionadas a los frascos de vidrio conteniendo 500 mL de agua de mar filtrada y esterilizada, para obtener las diluciones: 1/800, 1/1000, 1/1250, 1/3000 y 1/6000 ml. En este trabajo, las diluciones finales son expresadas como mL de inóculo viral por mL<sup>-1</sup> de medio de cultivo (1.25 x 10<sup>-3</sup>, 1.0 x 10<sup>-3</sup>, 8.0 x 10<sup>-4</sup>, 3.3 x 10<sup>-4</sup> y 1.7 x 10<sup>-4</sup> mL L<sup>-1</sup>). Se emplearon 30 réplicas por tratamiento. La asignación de los tratamientos a las unidades experimentales se realizó de forma completamente aleatoria. Además, como control negativo se contó con 6 animales por cada uno de los 5 tratamientos, teniendo 30 animales de control negativo por ruta de transmisión, lo que totalizó 60 animales de control negativo (ingestión e inmersión). Al momento del desafío, los animales que sirvieron como control negativo para la ruta por ingestión fueron alimentados con tejido de animales SPF. En tanto que, los animales que sirvieron como control negativo por inmersión fueron inoculados con soluciones de

iguales diluciones utilizadas en los tratamientos por inmersión, pero preparadas con tejido de animales SPF, siguiendo el protocolo de la preparación de la solución de inóculo viral madre. La temperatura de todas las carameleras durante el experimento fue  $27.0 \pm 0.3$  °C. Se realizaron chequeos de mortalidad cada 2 h.

### 3.7.3. Desafío con WSSV

En los desafíos por ingestión se suministró 10 % de la biomasa promedio de los animales desafiados. En el caso del desafío por inmersión, las cantidades de inóculo viral madre fueron proporcionadas en base a la proporción del inóculo viral madre con respecto al medio (500 mL). A las 6 h p.i. se realizó un recambio de agua del 100 %. Para evitar la reinfección y asegurar que todos las réplicas reciban igual carga viral los animales fueron desafiados en forma individual.

## 3.7. BIOENSAYO 2. EFECTO DEL DESAFÍO INDIVIDUAL/COLECTIVO SOBRE LA MORTALIDAD DE WSSV

Las bajas mortalidades obtenidas en el Bioensayo 1 condujeron a investigar si los bajos niveles eran consecuencia de la forma de desafío individual. Por tanto, se ejecutó el Bioensayo 2 para comparar las mortalidades en dos tipos de desafío (animales sembrados en forma individual vs en forma colectiva) mediante un ensayo de mayor duración (10 d). Debido a la disposición de los sets experimentales, que no permitía combinar unidades experimentales de distinta capacidad, se utilizó los sets 1 (desafío individual) y 2 (desafío colectivo) simultáneamente. Con un análisis estadístico se compararon los resultados obtenidos en ambos sets.

### 3.8.1. Material biológico

Se utilizaron 400 animales SPF ( $0.3 \pm 0.1$  g) que en sus primeros estadios larvales habían recibido un tratamiento previo con WSSV inactivado. La mitad de los animales fueron sembrados individualmente en los frascos de 2 L del set 1; mientras que, la otra mitad fue sembrada en acuarios de 50 L del set 2. Todos los animales fueron aclimatados durante 48 h en sus respectivas unidades experimentales.

### 3.8.2. Diseño del experimento

Las unidades experimentales estuvieron constituidas por frascos (set 1) y acuarios (set 2). La variable de respuesta fue la mortalidad de cada individuo, registrada cada 2 h como variable dicotómica (vivo o muerto) durante el periodo que duró el experimento (10 d). La variable explicatoria fue definida como el tipo de desafío: forma individual (set 1) vs forma colectiva (set 2). Cada uno de los dos desafíos tenía tres niveles de carga viral. El desafío se realizó por ingestión. Cada uno de los niveles contó con 60 réplicas. En cada tipo de desafío se contó con un control negativo conformado por 20 réplicas. La cantidad de réplicas utilizadas en los tres niveles del factor estudiado y los controles negativos totalizó 200 individuos por tipo de desafío.

Desafío individual (set 1): La unidad experimental fue el frasco (caramelera) de 2 L conteniendo 500 mL de agua de mar filtrada y esterilizada por UV (200 frascos). Los niveles de carga viral fueron definidos por diluciones de tejido de material infectado y material SPF no infectado (1:1, 1:5 y 1:10), correspondiendo a proporciones de 100, 20 y 10 % de material infectado con respecto al total del alimento suministrado. Se emplearon 60 réplicas por tratamiento. Además, 20 individuos actuaron como control negativo del desafío individual, para lo cual fueron alimentados con papilla de tejido SPF no

infectado, preparado de manera similar a la papilla usada para los tratamientos infectados. La asignación de los tratamientos a las unidades experimentales se realizó en forma completamente aleatoria. Se realizaron observaciones periódicas del estado de los animales cada 2 horas, retirando los animales muertos de las botellas. La temperatura media durante el transcurso del experimento fue de  $26.9 \pm 0.1$  °C.

Desafío colectivo (set 2): Las unidades experimentales fueron los acuarios (10 acuarios) de 50 L, teniendo un volumen de 20 L de agua de mar filtrada y esterilizada por UV, con una distribución de 20 individuos por acuario. Al igual que en el desafío individual, los tres niveles de carga viral fueron definidos por diluciones de tejido de material infectado y SPF no infectado (1:1, 1:5 y 1:10), correspondiendo a proporciones de 100 , 20 y 10 % de material infectado con respecto al total del alimento suministrado. Se utilizaron tres acuarios por cada nivel de carga viral, lo que totalizó 60 réplicas por cada nivel. Se realizaron observaciones periódicas del estado de los animales cada 2 horas retirando y contabilizando los animales muertos de los acuarios durante el periodo que duró el experimento. La temperatura media durante el transcurso del experimento fue de  $26.9 \pm 0.3$  °C. La asignación de los animales a las unidades experimentales se realizó en forma completamente aleatoria. Un décimo acuario sirvió como control negativo, donde se colocaron 20 individuos que al momento de la infección fueron alimentados con tejido congelado de animales SPF no infectados.

### **3.8.3. Desafío con WSSV**

Se realizó un desafío por ingestión suministrando una ración del 10 % de la papilla viral con respecto a la biomasa promedio de los animales en cada una de las unidades experimentales. La infección se realizó a temperatura ambiente ( $26.89 \pm 0.14$  °C). A las 6

h p.i se realizó un recambio de agua del 100 % eliminando los residuos. Durante las 24 h previas al desafío no se suministró alimento a los animales de la experimentación para garantizar la ingestión de la papilla viral.

### 3.7. BIOENSAYO 3. TRANSMISIÓN Y PATOGENICIDAD DE WSSV

El objetivo principal del Bioensayo 3 fue determinar los parámetros que definen una epidemia en una población infectada con WSD: i) transmisión (Beta,  $\beta$ : probabilidad de transmisión del virus de un animal infectado a un susceptible, dado un contacto efectivo) y ii) patencia (Gamma,  $\gamma$ : probabilidad de que una infección se convierta en aguda o crónica), en función de la temperatura, la carga viral y la ruta de transmisión. El protocolo del bioensayo se basó principalmente en un trabajo previo de Soto y Lotz (2001), donde determinaron las probabilidades  $\beta$  y  $\gamma$  solamente en función del número de animales susceptibles e infectados. Debido a la escasez de animales SPF se decidió determinar los dos parámetros en base a un solo experimento de tres días de duración. El criterio que se usó para determinar el tiempo de duración del experimento se basó en: i) los animales infectados al día 1 o 2 p.i., también lo estarían al día 3 p.i., e incluso, la detección del virus por PCR sería más fácil al presentar mayor carga viral debido a un incremento de la replicación del virus y ii) se consideró que más allá de los 3 días se podría incrementar la posibilidad de que algún porcentaje de animales infectados se limpien del virus, con lo que se subestimaría el valor real de los parámetros estudiados.

El Bioensayo 3 se desarrolló en 2 fases. La fase 1 (desafío con WSSV) fue corrida en el set 2. Mientras que la fase 2 (aislamiento) se realizó en el set 1. Al momento de la cosecha, los animales fueron cortados en forma longitudinal. La mitad de cada animal fue

fijado con etanol para posterior análisis de la presencia de la infección con WSSV por PCR y la otra mitad fue preservada con solución Davidson para posterior análisis histológico para la determinación de infecciones agudas ó crónicas.

### **3.9.1. Material biológico**

Se utilizaron 320 animales SPF de un peso promedio  $1.2 \pm 0.6$  g. Los animales fueron sembrados (72 h antes del desafío) en 20 acuarios de 50 L del set 2 a razón de 16 camarones por acuario. Los acuarios contenían 20 L de agua de mar filtrada y esterilizada. Durante las 48 h previas al desafío no se suministró alimento a los animales de experimentación, para garantizar la ingestión de la papilla en el caso de los desafíos por ingestión y para mantener la calidad del agua en el caso de los animales desafiados por inmersión. En los tratamientos con hipertermia los calentadores fueron encendidos 24 h antes del desafío para obtener un incremento gradual de temperatura durante ese periodo de aclimatación.

### **3.9.2. Diseño del experimento**

Fase 1 (set 2). *Desafío con WSSV*: El desafío se llevó a cabo por ingestión e inmersión en los acuarios del set 2 llenos con 20 L de agua de mar esterilizada, con 16 animales/acuario. En el caso del desafío por ingestión, todos los acuarios de este factor fueron infectados con papilla viral equivalente a 3 juveniles de peso aproximado al promedio de los animales de experimentación. Se utilizó esta cantidad para incrementar las posibilidades de que se establezcan contactos efectivos entre cada uno de los 16 animales susceptibles y la papilla infectada. En el caso del desafío por inmersión se utilizó una serie de diluciones similares a las utilizadas en el desafío por ingestión, con lo que se garantizó la comparación de la carga viral entre las dos rutas de transmisión. En

este estudio se utilizó como referencia la carga viral proporcionada en el desafío por individuo desafiado, donde se asume que la carga viral fue proporcionalmente distribuida a todos los individuos desafiados. La unidad de observación fue el animal. Cada tratamiento estuvo conformado por 16 animales. Los tratamientos fueron definidos como la combinación de 2 niveles de ruta de transmisión (ingestión e inmersión), 3 niveles de temperatura (29, 31 y 33 °C) y 3 concentraciones virales (1:1, 1:5 y 1:10), resultando un total de 18 tratamientos. Además se contó con 16 animales como control negativo para el desafío por ingestión y otros 16 animales como control negativo para el desafío por inmersión. La asignación de los 18 tratamientos a las 18 unidades experimentales se realizó en forma completamente aleatoria. El periodo de desafío fue de 14 h, siendo similar al utilizado por Soto *et al.* (2001). A las 14 h p.i. se trasladaron los animales del set 2 al 1, donde se desarrolló la etapa de aislamiento.

Fase 2 (set 1). *Aislamiento*: Luego de cumplido el periodo de desafío de 14 h en el set 2, los animales fueron aislados en el set 1 en frascos de 2 L (caramelera) para evitar reinfecciones. Por tanto, la unidad experimental del set 1 fue el frasco de 2 L. Así, los 288 animales desafiados en el set 2, además de los 32 animales que sirvieron como controles negativos fueron trasladados del set 2 al set 1. Previamente, la temperatura del agua de las bandejas en el set 1 había sido elevada a los niveles de tratamiento, por lo que los animales no experimentaron cambios de temperatura en el traslado. Las temperaturas de tratamiento fueron asignadas aleatoriamente a las bandejas (6 bandejas por cada nivel de temperatura). Los tratamientos formados por la combinación de rutas de transmisión y carga viral (6 tratamientos) fueron asignados aleatoriamente a las bandejas que previamente habían sido bloqueadas por los tratamientos de temperatura. Cada animal trasladado desde el set 2 al set 1 pasó a constituirse en una unidad experimental. Cada 2

horas se realizaron observaciones de mortalidad. Los animales muertos fueron preservados en etanol (95 %) para posterior análisis de PCR. La fase de aislamiento duró 58 h. A partir de las 72 h p.i., los animales empezaron a ser muestreados. La cosecha se realizó en dos días. En el momento del muestreo los animales fueron cortados longitudinalmente. Una mitad fue preservada en etanol al 95 % para la detección de WSSV mediante PCR, mientras que la otra mitad fue preservada en solución Davidson para posterior análisis de histología.

### **3.7.3. Diluciones y carga viral del material infeccioso**

Para determinar la dilución final de la papilla viral en el desafío por inmersión (columna 2 en tabla 2) se calculó la relación de material infectado en el volumen final del medio de cultivo. Por ejemplo, en el segundo nivel de dilución se utilizó 3.62 g de papilla (3 veces el peso promedio de los individuos), que correspondió a 0.72 g de tejido infectado (dilución 1:5), lo que fue diluido en una solución de inóculo viral madre (1:5) que posteriormente fue diluida en 20 L de agua de mar, produciendo una dilución final de inóculo viral madre de 1:5525 (Tabla 2). Las cargas virales de las 3 diluciones de tejido de material infectado y SPF no infectado fueron cuantificadas por PCR en tiempo real en el Laboratorio de Patología Acuícola de la Universidad de Arizona (Arizona, USA), de acuerdo con Tang y Lightner (2001) y Durand y Lightner (2002). El análisis del material viral indicó la presencia de WSSV en las muestras de las 3 diluciones, tal como se reporta en la columna 3 de la tabla 2. La conversión de los resultados de PCR en tiempo real (réplicas virales  $\mu\text{g}^{-1}$  ADN) a gramo de papilla (réplicas virales  $\text{g}^{-1}$ , en los desafíos por ingestión) se realizó en base a la ecuación (2) (columna 4 en tabla 2) (Tang y Lightner, 2001) y Durand y Lightner, 2002).

$$R = (A \times B)/C \quad (2)$$

Donde,

R = No. de réplicas virales de desafío  $g^{-1}$

A = lectura de PCR en tiempo real (réplicas virales  $\mu g^{-1}$  ADN) en 150 ng de ADN

B = Volumen total de ADN extraído, en este caso correspondió a 100  $\mu l$

C = Masa (g) de tejido empleado en la extracción del ADN, que en promedio fue 0.3 g

Para determinar la carga viral por L de medio (desafío por inmersión) se determinó la relación de carga viral en el volumen final del medio de cultivo (columna 5 en tabla 2).

En este estudio, se utilizó como referencia la carga viral que le correspondía por individuo desafiado (réplica virales/individuo), ya que esta unidad describe la carga viral independientemente de la ruta de transmisión (columna 6 en tabla 2). Los cálculos utilizados están descritos en la ecuación (3)

$$CV = 3.62 \times R / E \quad (3)$$

Donde,

CV = carga viral proporcionada en el desafío por individuo (réplicas virales/individuo)

E = No. de camarones desafiados

R = No. de réplicas virales de desafío  $g^{-1}$

En los niveles de dilución de los desafíos por inmersión se utilizaron iguales proporciones de material infectado de las papillas por ingestión, de tal manera que la cantidad de partículas virales fueran comparables entre rutas de transmisión viral (Tabla 2).

Tabla 2. Dosis de diluciones de tejidos de material infectado y SPF no infectado y cuantificación de la carga de WSSV (por análisis de PCR en tiempo real en muestras de ADN extraídas de las papillas del desafío) en el Bioensayo 3. En cada uno de los tres niveles de dilución (concentraciones de tejido de material infectado y SPF no infectado: 1:1, 1:5 y 1:10) del desafío por ingestión (16 animales), se proporcionó 3.62 g de papilla. En los niveles de dilución de los desafíos por inmersión se utilizó iguales proporciones de material infectado de las papillas por ingestión, de tal manera que la cantidad de partículas virales fueran comparables entre las dos rutas de transmisión viral.

Dilución de la papilla viral = tejido de material infectado: SPF no infectado (desafío por ingestión)	Dilución de mL de inóculo viral madre (1:5) por mL <sup>-1</sup> de medio cultivo (20 L de agua de mar) (desafío por inmersión)	Carga de WSSV (réplicas virales µg <sup>-1</sup> ADN)	Carga de WSSV por g de papilla en el desafío por ingestión (réplicas virales g <sup>-1</sup> )	Carga de WSSV por L de agua de mar en el medio de desafío por inmersión (réplicas virales L <sup>-1</sup> )	Carga de WSSV por camarón desafiado (réplicas virales por individuo)
1:1	1:1105	1.20 x 10 <sup>7</sup>	6.00 x 10 <sup>8</sup>	1.08 x 10 <sup>8</sup>	1.35 x 10 <sup>8</sup>
1:5	1:5525	2.60 x 10 <sup>6</sup>	1.30 x 10 <sup>8</sup>	2.34 x 10 <sup>7</sup>	2.93 x 10 <sup>7</sup>
1:10	1:11049	6.00 x 10 <sup>5</sup>	3.00 x 10 <sup>7</sup>	5.40 x 10 <sup>6</sup>	6.75 x 10 <sup>6</sup>

#### 3.9.4. Diagnóstico de la infección de WSSV

Para el diagnóstico de la infección de WSSV se analizaron por PCR las muestras de los animales muertos entre las 0 y 72 h p.i. y los animales sobrevivientes. Los animales sobrevivientes fueron cortados longitudinalmente. La mitad de cada animal fue preservado en etanol (95 %) para análisis de PCR anidado, con iniciadores de Kimura *et al.* (1996) y control interno de ADN (Tang y Lightner, 2000). Los tejidos que se usaron para el diagnóstico fue una sección de la parte anterior del cefalotórax, que incluyó: branquias, tejido hematopoyético, glándula antenal, tejidos conectivo epitelial y sistema nervioso central.

### 3.9.5. Diagnóstico de animales enfermos

Un total de 288 animales fueron fijados y cortados en secciones de 4  $\mu\text{m}$  para detectar y diagnosticar patologías a nivel histológico. Los cortes fueron fijados y teñidos con Hematoxilina y Eosina (HyE) según Bell y Lightner (1988).

### 3.9.6. Índice histológico de WSSV

Para cuantificar el grado de lesiones agudas y crónicas provocadas por WSSV se construyó un índice histológico (IH) de WSSV para cada uno de los 18 tratamientos, utilizando la metodología descrita por Maldonado (2003). El índice se construyó en base a dos consideraciones: i) para cada uno de los camarones del tratamiento se asignó un peso a ciertos tejidos / órganos afectados con WSSV, basados en la importancia del tejido en el proceso de infección viral. (Tabla 3) y; ii) se otorgó un puntaje (entre 0 y 4) al grado de infección por cada órgano / lesión afectado, donde el grado 4 representó una lesión más avanzada. La tabla 4 muestra un ejemplo de la construcción del índice histológico de WSSV para un animal infectado por WSSV. Según el ejemplo, el animal tiene un índice histológico de 5.00. El valor final que se asignó a cada tratamiento correspondió al promedio de los valores de índice histológico para los 16 animales que conformaron el tratamiento.

Tabla 3. Peso otorgado a los órganos / tejidos afectados por WSSV en el índice histológico de WSSV

Tejido/Organo	Peso
Glándula antenal y epitelio cuticular	1
Estómago y tejido conectivo	2
Órgano linfoide, tejido hematopoyético y corazón	3

Tabla 4. Ejemplo para la construcción del índice histológico para WSSV

Tejido/Organo	Grado de infección	Normalización	Peso	Normalización x Peso	Total
Glándula antenal	2	$2/4 = 0.50$	1	$0.50 \times 1$	0.50
Tejido conectivo	3	$3/4 = 0.75$	2	$0.75 \times 2$	1.50
Órgano linfoide	4	$4/4 = 1.00$	3	$1.00 \times 3$	3.00
Suma					5.00

### 3.9.7. Análisis de mortalidad

La escasez de animales SPF impidió efectuar un cuarto experimento para la determinación de la mortalidad durante un periodo post-infección relativamente largo. Por tanto, se utilizaron los datos de mortalidad del Bioensayo 3 obtenidos durante el periodo de post-infección de 3 d. Con estos resultados se determinó la probabilidad de virulencia (Alpha,  $\alpha$ ).

### 3.7. ANÁLISIS DE DATOS

Para el Bioensayo 1, la relación entre la mortalidad acumulada a los 5 días p.i. con WSSV (variable dicotómica: vivo o muerto) y ruta de desafío (variable nominal: ingestión e inmersión) o carga viral de infección (variable nominal con niveles de infección) fue analizada a través de tablas de contingencia, utilizando la prueba exacta de Fisher al 95 % de confianza. Las diferencias en la distribución de supervivencias de los animales entre

rutas de desafío fueron comparadas a través del análisis de supervivencias de Kaplan-Meir, utilizando como estadístico de comparación el logaritmo del rango (log rank).

En el Bioensayo 2, la mortalidad acumulada a los 10 d p.i. con WSSV (variable dicotómica: vivo o muerto) fue comparada entre tipo de desafío (variable nominal: individual vs colectivo) y dentro de cada tipo de desafío (3 niveles de dilución) a través de tablas de contingencia y utilizando el estadístico de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ).

En el Bioensayo 3, para el análisis de la transmisión viral y por consiguiente para la determinación de la probabilidad de transmisión (Beta,  $\beta$ ), se realizó un análisis de la prevalencia final (definida como el porcentaje de animales infectados con WSSV, según el diagnóstico por PCR, en un determinado tratamiento) luego de 3 d p.i., a través de tablas de contingencia. Así, se comparó la prevalencia final, utilizando el estadístico de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), entre: niveles de temperatura (29, 31 y 33 °C), ruta de transmisión viral (ingestión e inmersión) y carga viral ( $1.35 \times 10^8$ ,  $2.93 \times 10^7$ ,  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales/individuo). Utilizando esas mismas tablas se calcularon los riesgos relativos (RR) de infección entre los niveles de las tres variables de estudio. El RR se definió como la prevalencia de infección en un determinado nivel de estudio, dividido para la prevalencia en el nivel de referencia. Donde intervalos de confianza mayores a 1 indicaron la presencia de riesgo significativo de infección en el nivel de estudio (nivel de riesgo), comparado con el nivel de referencia (nivel de protección). Mientras que, intervalos de confianza menores a 1, excluyéndolo, indicaron la presencia de protección significativa a la infección en el nivel de estudio comparado con el nivel de referencia.

La probabilidad de transmisión (Beta,  $\beta$ ) fue calculada utilizando la ecuación 4 (Soto *et al.*, 2001).

$$\beta = 1 - \exp [\ln ( S_1/S_0) / I_0] \quad (4)$$

Donde:

$\beta$  = coeficiente o probabilidad de transmisión viral definido en el capítulo 2,

$S_1$  = número de animales susceptibles en el tiempo  $t = 72$  horas

$S_0$  = número de animales susceptibles en el tiempo  $t = 0$  (antes de la infección)

$I_0$  = número de animales infectados en el tiempo  $t = 0$  (antes de la infección)

Las variables significativamente asociadas a la infección, en el análisis de las tablas de contingencia, fueron utilizadas para una regresión lineal múltiple entre ellas (variables explicatorias) y Beta (variable de respuesta). La ecuación resultante del análisis de regresión múltiple fue utilizada para modelar la probabilidad de transmisión (Beta) en el modelo epidémico.

Para el estudio de la enfermedad, y por tanto, para la determinación de la probabilidad de patencia (Gamma,  $\gamma$ ), se incrementó la calidad del diagnóstico de la enfermedad a través de la estrategia de combinar dos diagnósticos en una prueba en serie (Thrusfield 1995). Así, en un primer paso, se escogió los animales positivos por PCR. En un segundo paso, se consideró los animales de este grupo que fueran diagnosticados como positivos por análisis de histología. Solo se consideró como animales enfermos aquellos casos que resultaron positivos por ambas técnicas de diagnóstico. También fueron incluidos en el grupo de animales enfermos los animales muertos antes de la cosecha, que resultaron

positivos por PCR. Con este método se pretendió reducir los falsos positivos con el consiguiente aumento de la especificidad y del valor predictivo positivo, permitiendo una mejor confirmación de la enfermedad. Las ocurrencias de la enfermedad, tal como fue descrito con anterioridad fueron analizadas a través de tablas de contingencia, donde se comparó la morbilidad entre: niveles de temperatura (29, 31 y 33 °C), ruta de transmisión viral (ingestión e inmersión) y carga viral ( $1,35 \times 10^8$ ,  $2,93 \times 10^7$ ,  $6,75 \times 10^6$  réplicas virales / individuo) utilizando el estadístico de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Los riesgos relativos entre los niveles de las variables también fueron calculados. Las variables significativamente asociadas a la enfermedad en el análisis de las tablas de contingencia fueron utilizadas para un análisis de regresión logística entre ellas (variables explicatorias) y la ocurrencia de la enfermedad (variable dicotómica de respuesta). A partir de los parámetros de la ecuación de regresión logística (5), se despejó la probabilidad de ocurrencia de un evento (6).

$$\ln \text{ odd} = \ln \left[ \frac{P(x)}{1 - P(x)} \right] = a + b_1 X_1 + b_2 X_2 \quad (5)$$

$$P(X) = \frac{\exp^{a + b_1 X_1 + b_2 X_2}}{1 + \exp^{a + b_1 X_1 + b_2 X_2}} \quad (6)$$

Donde:  $b_1$  y  $b_2$  son los coeficientes de la regresión logística asociadas a las variables explicatorias  $X_1$  y  $X_2$ , siendo iguales al odds ratio (OR), que es un parámetro de riesgo, definido como la oportunidad de riesgo para la ocurrencia de un suceso (en este caso la enfermedad) en el nivel de una determinada variable, comparado con un nivel de referencia. La ecuación resultante del análisis de regresión logística (6) fue utilizada para modelar la probabilidad de enfermedad Gamma ( $\gamma$ ) en el modelo epidémico.

Adicionalmente, se calculó el IH de WSSV para todos los supervivientes de cada tratamiento y luego se calculó un valor promedio por tratamiento. El valor promedio por tratamiento consideró información de los animales muertos que fueron diagnosticados positivos por PCR. En estos últimos casos, que no fue posible realizar análisis de histología y por tanto no fue posible obtener un valor real de IH, se asumió un valor arbitrario de 13.25, que correspondió al máximo IH encontrado en los animales sobrevivientes. De esta manera el IH no obvió a los enfermos agudos de WSD que murieron durante el transcurso del experimento.

Para el análisis de la virulencia, las mortalidades fueron analizadas a través de tablas de contingencia, donde fueron comparadas entre: niveles de temperatura (29, 31 y 33 °C), ruta de transmisión viral (ingestión e inmersión) y carga viral ( $1.35 \times 10^8$ ,  $2.93 \times 10^7$ ,  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales / individuo) utilizando el estadístico de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Las variables significativamente asociadas a la mortalidad, en el análisis de las tablas de contingencia, fueron utilizadas para un análisis de regresión logística entre ellas (variables explicatorias) y la ocurrencia de la mortalidad (variable dicotómica de respuesta). La probabilidad de ocurrencia de la mortalidad fue obtenida a partir de los parámetros de la ecuación de regresión logística con una ecuación similar a la ecuación 6, y luego utilizada para modelar la probabilidad de mortalidad Alpha ( $\alpha$ ) en el modelo epidémico. Adicionalmente, se realizó un análisis de supervivencias de Kaplan-Meir utilizando el estadístico del logaritmo del rango para comparar las distribuciones de supervivencia a los 3 niveles de temperatura, ajustados por los niveles de carga viral. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa SPSS version 11.0. En cada una de las celdas de las tablas de contingencia, se observaron los residuos normalizados de Pearson, donde valores mayores a 1.96 y menores a -1.96 mostraron evidencias a favor del rechazo de la

hipótesis nula que las frecuencias observadas y esperadas en un determinado nivel de la variable explicatoria son iguales, sugiriendo una asociación entre ocurrencia de la enfermedad y el nivel de la variable en cuestión.

La estructura del modelo epidémico de WSD desarrollado en esta tesis se basó en el modelo desarrollado por Lotz y Soto (2002) (ecuaciones 7 a 10). La dinámica del modelo se basó en los modelos de cadena de Reed Frost (Abbey 1952; Black y Singer 1987). El cambio en tiempo del número de animales en cada una de las categorías fue expresado con las siguientes ecuaciones de diferencias:

$$S_{t+1} = S_t - S_t [1 - (1 - \beta)^{I_t}] \quad (7)$$

$$I_{t+1} = I_t + S_t [(1 - (1 - \beta)^{I_t}) - \lambda I_t] \quad (8)$$

$$E_{t+1} = E_t + \lambda I_t - \alpha E_t \quad (9)$$

$$M_{t+1} = M_t + \alpha E_t \quad (10)$$

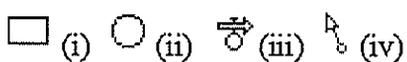
Donde:

$\beta, \lambda$ y $\alpha =$	Probabilidades de transmisión, patencia y virulencia, respectivamente.
$(1 - \beta)^{I_t} =$	Probabilidad de que un susceptible no adquiera una infección después de la exposición a todos los individuos infecciosos
$[1 - (1 - \beta)^{I_t}] =$	Probabilidad de que un individuo susceptible se infecte después de la exposición a todos los individuos infecciosos
$S_t, I_t, E_t$ y $M_t =$	No. de animales susceptibles, infectados, enfermos y muertos al tiempo $t = t$

$S_{t+1}, I_{t+1}, E_{t+1}$  y  $M_{t+1}$  = No. de animales susceptibles, infectados, enfermos y muertos al tiempo  $t = t + 1$ .

La expresión 4, utilizada para determinar la probabilidad de transmisión (Beta,  $\beta$ ) se obtiene despejando  $\beta$  de la ecuación (7):

La solución del modelo se obtuvo resolviendo las ecuaciones 7 a 10. Para lo cual se definió los parámetros básicos de la epidemia ( $\beta, \lambda$  y  $\alpha$ ) a través de las ecuación 4 y de las 3 regresiones mencionadas con anterioridad. Puesto que,  $\beta, \lambda$  y  $\alpha$  en esta tesis son una función de la temperatura, ruta de transmisión y carga viral, estas 3 variables fueron agregadas al sistema, obteniendo un modelo de tipo determinístico, ya que estuvo representado por las expresiones matemáticas (ecuaciones 7 a 10) de un modelo de Reed-Frost, y también de tipo probabilístico debido a las regresiones utilizadas. La simulación del modelo se realizó en Stella Research 8.1.1 (High Performance System). El modelo se formuló básicamente con las siguientes componentes:



- i) Variables o compartimientos determinísticos, contruidos con todos los grupos de la población ( $S_t, I_t, E_t$ , y  $M_t$ ). Estuvieron representados por “stocks” que son dibujados como rectángulos y representan la acumulación de material.
- i) Parámetros y variables, que son elementos fijos determinados por el usuario y representados como círculos. El modelo desarrollado en esta tesis contiene tres parámetros, determinados por las 3 regresiones definidas en el modelo, por las probabilidades de paso de un estado a otro ( $\beta, \gamma, \alpha$ ). Mientras que, el modelo

contiene 3 variables (ruta de transmisión, temperatura y concentración de la carga viral).

- i) Tubos de flujos, representan la transferencia de material en un periodo de tiempo específico. Para el caso de este, los grupos ( $S_t$ ,  $I_t$ ,  $E_t$ , y  $M_t$ ) de la población, cambian en el tiempo a medida que la población fluye de un compartimiento a otro. Los compartimientos están conectados uno al otro a través de estos tubos, similar a lo que sucede con la llave de un lavabo, con nubes conectando las fuentes y los sumideros, es decir los compartimientos de entrada y de salida. La cabeza de la flecha indica la dirección del flujo. En el modelo los flujos son definidos o regulados por la susceptibilidad ( $S_t [1 - (1 - \beta)^I_t]$ ), la patogenicidad ( $I_t \gamma$ ) y la virulencia ( $E_t \alpha$ ).
- i) Conectores, conecta la información que se necesita para controlar el cambio del estado del sistema

La validación del modelo epidémico se realizó en dos etapas:

- i) Se evaluó la concordancia entre los resultados reales a los 3 d p.i. del Bioensayo 3 y los predichos por el modelo, para lo cual se determinó los atributos del modelo: sensibilidad (probabilidad de detectar correctamente a un individuo enfermo =  $a / a + c$ ), especificidad (probabilidad de detectar correctamente a un individuo sano =  $d / b + d$ ), valor predictivo positivo (probabilidad de que un individuo pronosticado como positivo sea realmente positivo =  $a / a + b$ ) y valor predictivo negativo (probabilidad de que un individuo pronosticado como negativo sea realmente negativo =  $d / c + d$ ). Estos parámetros son obtenidos a través de un análisis de tablas de contingencia (Dohoo *et al.*, 2003), tal como se muestra en la Tabla 5.

- i) Se evaluó la habilidad predictiva del modelo con datos procedentes de un experimento realizado por Sonnenholzner *et al.* (2002), donde se estudió la supervivencia, infección y estado patológico de juveniles *P. vannamei* (0.8 – 1.5 g) desafiados por vía oral con WSSV (día 0) y sometidos a diferentes condiciones de temperatura durante 16 días (4 tratamientos, 100 animales por tratamiento, 3 réplicas). Los datos iniciales del experimento de Sonnenholzner y colaboradores fueron corridos utilizando el modelo desarrollado en esta tesis. Posteriormente, se compararon los datos reales del experimento con las predicciones del modelo a través del cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos.

Tabla 5. Tabla de contingencia usada para evaluar la concordancia entre las predicciones del modelo y los datos reales.

		Datos reales		
		Positivos (enfermos)	Negativos (sanos)	
Modelo	Positivos	Verdaderos positivos (a)	Falsos positivos (b)	Total de positivos (a + b)
	Negativos	Falsos negativos (c)	Verdaderos negativos (d)	Total de negativos (c + d)
		Total de enfermos (a + c)	Total de sanos (b + d)	Total (N = a + b + c + d)

## 4. RESULTADOS

### 4.1. BIOENSAYO 1

Las mortalidades acumuladas a los 5 d p.i. en todos los tratamientos fueron inferiores al 50 %, por tanto no fue posible obtener niveles letales ( $LD_{50}$  y  $LD_{90}$ ) de concentración de WSSV (Tabla 6). La mayor mortalidad se obtuvo a través de la ingestión de tejido infectado al 100 % (dilución de tejido de material infectado y SPF no infectado en relación 1:1), que provocó una mortalidad del 16.7 % (5/30) del total de individuos desafiados a esa concentración (Tabla 6), no mostrando diferencias significativas ( $p = 0.195$ , prueba exacta de Fisher) con respecto a la mortalidad (3.3 % = 1/30) registrada en el tratamiento de ingestión de un 20 % (dilución 1:5) de tejido infectado. No se observaron mortalidades en el resto de los niveles de concentración viral experimentados en los desafíos por ingestión (Tabla 6). Tampoco se observaron mortalidades en las concentraciones más altas y baja del desafío por inmersión ( $1.25 \times 10^{-3}$ ,  $1.0 \times 10^{-3}$ ,  $1.7 \times 10^{-4}$  mL inóculo viral por mL de medio de cultivo) (Tabla 6). Se registró un animal muerto en cada una de las concentraciones de  $8.0 \times 10^{-4}$  y  $3.3 \times 10^{-4}$  mL inóculo / mL de medio de cultivo, lo que representó un 3.3 % (1/30) de mortalidad para cada una de los niveles mencionados (Tabla 6). La mortalidad acumulada, considerando todos los animales muertos en los 5 niveles de concentración viral, fue igual a 4.0 y 1.3 % para los desafíos por ingestión e inmersión, respectivamente. Tales valores mostraron no ser estadísticamente significativos ( $p = 0.282$ , prueba exacta de Fisher). Mientras que, la mortalidad final considerando los animales muertos en las dos rutas de desafío fue del 2.7 % (Tabla 6). No se observó ninguna mortalidad (0/60) en los controles negativos de ingestión o inmersión. En el mismo sentido, no se encontraron diferencias significativas

en el tiempo en morir de los animales desafiados por ambos tipos de desafíos (log rango = 2.1,  $gl = 1$ ,  $p = 0.1507$ ).

Tabla 6. Porcentajes de mortalidad acumulada (%) al día 5 p.i. con WSSV y tiempo en morir de *Penaeus vannamei* desafiados por ingestión (5 diluciones de tejido de material infectado y SPF no infectado: 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 y 1:100) e inmersión (5 diluciones de inóculo viral de WSSV:  $1.25 \times 10^{-3}$ ,  $1.0 \times 10^{-3}$ ,  $8.0 \times 10^{-4}$ ,  $3.3 \times 10^{-4}$  y  $1.7 \times 10^{-4}$  mL de inóculo viral por  $\text{mL}^{-1}$  de medio de cultivo). Para cada nivel de dilución  $n = 30$ , totalizando 150 camarones por cada ruta de desafío. Bioensayo 1.

Ruta de desafío	Dilución de tejido de camarón infectado y no infectado (desafío por ingestión) y mL de inóculo viral por $\text{mL}^{-1}$ de medio de cultivo (desafío por inmersión)	Mortalidad % (número de animales muertos)	Tiempo en morir de cada individuo (horas p.i.)
Ingestión	1:1	16.7 (5/30)	27, 48, 48, 66, 66
	1:5	3.3 (1/30)	60
	1:10	0.0 (0/30)	-
	1:50	0.0 (0/30)	-
	1:100	0.0 (0/30)	-
Inmersión	$1.25 \times 10^{-3}$	0.0 (0/30)	-
	$1.0 \times 10^{-3}$	0.0 (0/30)	-
	$8.0 \times 10^{-4}$	3.3 (1/30)	57
	$3.3 \times 10^{-4}$	3.3 (1/30)	70
	$1.7 \times 10^{-4}$	0.0 (0/30)	-

#### 4.1. BIOENSAYO 2

##### 4.1.1. Desafío individual

Tal como se observó en el Bioensayo 1, las mortalidades finales de los animales desafiados con WSSV en forma individual en el Bioensayo 2 fueron bajas (Tabla 7 y Figura 8). Así, la mortalidad en cada una de las concentraciones estudiadas fue menor al 5 % (Tabla 7). Mientras que, la mortalidad acumulada en todos los desafíos individuales fue igual al 5 % (9/180) (Tabla 7), corroborando los resultados obtenidos en el desafío

individual del Bioensayo 1. La mayor mortalidad se produjo entre los camarones desafiados con 100 % de tejido infectado (dilución de tejido de material infectado y SPF no infectado en relación 1:1). Las mortalidades en el desafío individual se reportaron en el intervalo entre las 57 y 89 horas p.i.

#### 4.2.2. Desafío colectivo

Todos los animales (60/60) desafiados colectivamente con la primera concentración de papilla viral (dilución de tejido de material infectado y SPF no infectado en relación 1:1) murieron en los 10 días de experimentación (Tabla 7). Mientras que, 20 individuos de la segunda concentración de papilla viral murieron (dilución de tejido de material infectado y SPF no infectado en relación 1:5) y ningún animal desafiado en forma colectiva con la tercera concentración de papilla viral murió en este bioensayo (Tabla 7); lo que evidencia una relación entre la mortalidad de los animales y la concentración del material infectado ( $\chi^2 = 126.0$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0.000$ ). Las mortalidades en el desafío colectivo ocurrieron en forma gradual entre 47 y 232 h p.i., sin mostrar grandes picos epidémicos (Figura 8).

Tabla 7. Porcentajes de mortalidad final acumulada (%) al día 10 p.i. con WSSV de *Penaeus vannamei* desafiados por ingestión (3 diluciones de tejido de material infectado y SPF no infectado: 1:1, 1:5 y 1:10) en forma individual o colectiva (n = 60 por cada desafío, totalizando 180 camarones por cada tipo de desafío). Bioensayo 2.

Tipo de Desafío	Dilución de tejido de camarón infectado y no infectado (desafío por ingestión)	Mortalidad % (número de animales)
Individual	1	5 (3/60)
	1:5	2 (1/60)
	1:10	2 (1/60)
Colectivo	1	100 (60/60)
	1:5	33 (20/60)
	1:10	0 (0/60)

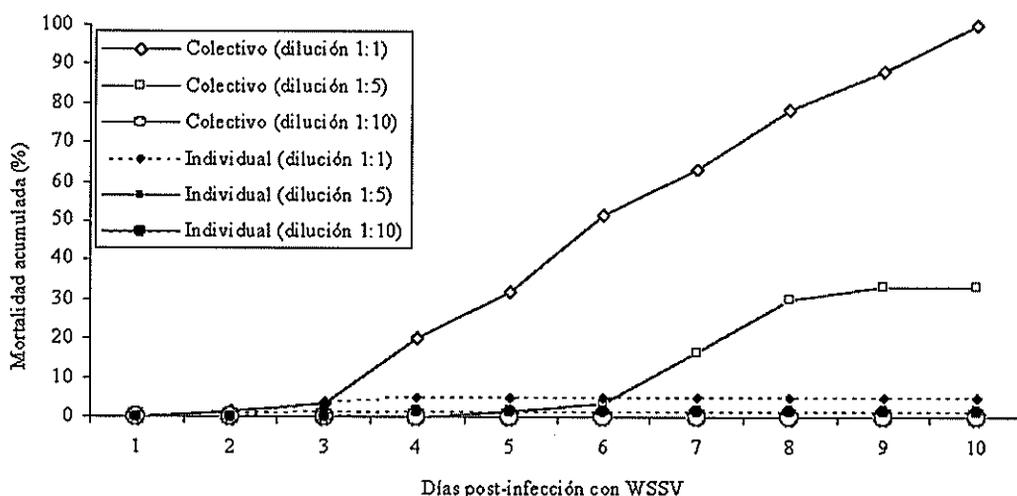


Figura 8. Mortalidad acumulada (%) de animales *Penaeus vannamei* desafiados con WSSV por ingestión en forma individual (180 animales sembrados individualmente en frascos de 2 L) y en forma colectiva, con 3 diluciones de tejido de material infectado y SPF no infectado (1:1, 1:5, 1:10) (180 animales sembrados a razón de 20 animales por acuario de 20 L y 3 acuarios por cada nivel de dilución. Bioensayo 2.

#### 4.2.3. Análisis conjunto de los desafíos (individual - colectivo)

Se encontró una mortalidad significativamente superior en los desafíos colectivos comparados con los individuales ( $\chi^2 = 86.6$ , gl = 1,  $p = 0.000$ ). Considerando los tres niveles de concentración viral, la mortalidad acumulada al final de los 10 d p.i. de los animales desafiados en forma colectiva fue del 44.4 % (80/180) comparado con un 2.7 % (5/180) registrado en los desafíos individuales. En el mismo sentido, el análisis de supervivencia mostró que los tiempos de supervivencia en los desafíos individuales fueron significativamente superiores (log rango = 84.88, gl = 1,  $p = 0.000$ ) comparados con los obtenidos en los desafíos colectivos. Este efecto se observó, inclusive, al considerar los niveles de concentración viral.

### 4.3. BIOENSAYO 3

#### 4.3.1. Análisis de la transmisión viral

Luego de 3 d p.i. los animales mantenidos a 29 °C mostraron la mayor prevalencia (68/96) de infección de WSSV (Tabla 8). Mientras que, los animales a 31 °C presentaron la menor prevalencia (26/98) en ambas rutas de transmisión viral (Figura 9). Se encontró evidencias a favor de la presencia de diferencias estadísticas significativas en la infección entre niveles de temperatura ( $\chi^2 = 38.11$ , g l = 2, p = 0.000). Así los animales mantenidos a 29 °C tuvieron 2.7 (68/96 / 26/98) y 1.46 (68/96 / 45/93) veces más riesgo relativo de ser infectados comparado con los animales mantenidos a 31 y 33 °C, respectivamente (Tabla 8). Los animales desafiados por inmersión presentaron una significativa ( $\chi^2 = 5.87$ , g l = 1, p = 0.015) mayor prevalencia (80/144) que la encontrada en los animales desafiados por ingestión (59/143) (Tabla 8 y Figura 9). El riesgo relativo fue 35 % superior en los animales desafiados por inmersión que por ingestión (80/144 / 59/143) (Tabla 8). Mientras que, no se observaron diferencias significativas en la ocurrencia de infección en función de la carga viral de infección ( $\chi^2 = 1.65$ , g l = 2, p = 0.438).

Tabla 8. Tablas de contingencia entre infección a WSSV (Datos del análisis de PCR con iniciadores de Kimura) a los 3 días p.i. y ruta de infección (ingestión e inmersión), niveles de temperatura (29, 31 y 33 °C) y concentración de WSSV ( $1.35 \times 10^8$ ,  $2.93 \times 10^7$  y  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales/animal). Bioensayo 3.

Variable	Nivel	Estadístico	No. animales no infectados	No. animales infectados	Total	
Ruta de infección	Ingestión	n	84	59	143	
		Porcentaje	58.7	41.3		
		Residuos	2.42	-2.42		
	Inmersión	n	64	80	144	
		Porcentaje	44.4	55.6		
		Residuos	-2.42	2.42		
		Total	148	139		287
Temperatura (°C)	29 °C	n	28	68	96	
		Porcentaje	29.2	70.8		
		Residuos	-5.38	5.38		
	31 °C	n	72	26	98	
		Porcentaje	73.47	26.53		
		Residuos	5.35	-5.35		
	33 °C	n	48	45	93	
		Porcentaje	51.6	48.4		
		Residuos	0.01	-0.01		
		Total	148	139		287
	Carga viral (réplicas virales / camarón)	$1.35 \times 10^8$	n	44	51	95
			Porcentaje	46.3	53.7	
Residuos			-1.3	1.3		
$2.93 \times 10^7$		n	53	43	96	
		Porcentaje	55.2	44.8		
		Residuos	0.9	-0.9		
$6.75 \times 10^6$		n	51	45	96	
		Porcentaje	53.1	46.9		
		Residuos	0.4	-0.4		
		Total	148	139		287

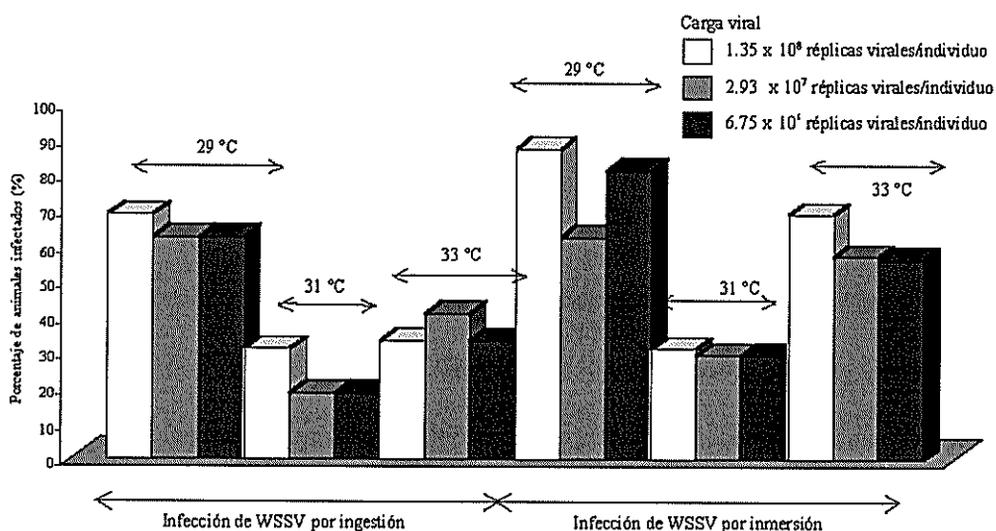


Figura 9. Porcentaje de animales infectados con WSSV (por análisis de PCR con iniciadores de Kimura) a los 3 d p.i. en función de la ruta de transmisión viral, temperatura y carga viral de infección. Bioensayo 3.

La probabilidad de transmisión ( $\beta$ ), calculada de acuerdo a la expresión 4, para los tratamientos formados por las combinaciones de temperatura y ruta de transmisión viral, varió en promedio entre 0.08 y 0.40 (Tabla 9). En estos tratamientos no se observó diferencias en los valores de Beta calculados para los tres niveles de carga viral (datos no mostrados). Las mayores transmisiones de WSSV ocurrieron a 29 °C por inmersión. Mientras que, las menores transmisiones se registraron por ingestión a 31 y 33 °C.

Tabla 9. Probabilidad de transmisión (Beta,  $\beta$ ) para distintos niveles de temperatura y ruta de transmisión viral. Cada probabilidad es el promedio de los valores obtenidos a las 3 concentraciones de carga viral ( $1.35 \times 10^8$ ,  $2.93 \times 10^7$  y  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales/animal). Bioensayo 3.

Ruta de transmisión viral	Temperatura (°C)	Probabilidad de transmisión (Beta, $\beta$ )
Ingestión	29	0,29
	31	0,08
	33	0,14
Inmersión	29	0,40
	31	0,11
	33	0,26

Los resultados del análisis de las prevalencias mostraron diferencias significativas en la infección entre niveles de temperatura y ruta de transmisión viral, no observándolas por efecto de la carga viral. Tales observaciones condujeron a estudiar la variabilidad de Beta en función de estas dos variables a través de un modelo de regresión múltiple. El modelo, resumido en la tabla 10, muestra evidencias de que la temperatura está significativamente asociada a Beta. La ruta de transmisión viral no mostró una significancia mayor del 90 % (Tabla 10), pero su contribución sobre la variabilidad de Beta es del 10 % (coeficiente estandarizados de la regresión múltiple, dato no mostrado). Por tal motivo, se decidió construir el modelo de regresión múltiple con las dos variables predictoras (ecuación 11). La temperatura fue el factor que más influyó en la infección final (coeficiente estandarizado = -0.513). Mientras que, la ruta de transmisión viral mostró un coeficiente estandarizado = 0.353. El modelo mostrado en la expresión 11 explicó el 39 % de la varianza observada en la variación de Beta ( $R^2$ ). Sin embargo, según el modelo lineal, por cada incremento en 1 °C se presenta tan sólo un decrecimiento de 0.0377 en la probabilidad de infección. Un incremento de 0.08485 en la probabilidad de infección fue observado en la transmisión viral por inmersión, con respecto a la transmisión por ingestión.

Tabla 10. Modelo de regresión múltiple que explica la contribución de la temperatura y la ruta de transmisión viral a la variabilidad de la probabilidad de transmisión (Beta,  $\beta$ ) en los datos del Bioensayo 3.

Variable	Coficiente no estandarizados	Error estándar del coeficiente	t	P-value
Constante	1.256	0.467	2.691	0.017
Temperatura	-0.0377	0.015	-2.540	0.023
Ruta de transmisión	0.08485	0.048	1.750	0.101

Probabilidad de transmisión (Beta,  $\beta$ ) =

$$= 1.256 - (0.0377 \text{ Temperatura}) + (0.08485 \text{ Ruta de transmisión}) \quad (11)$$

#### 4.3.2. Análisis de la patogenicidad

El menor número de individuos que enfermaron después de ser infectados se obtuvo en el tratamiento, a través de la ingestión a 33 °C y  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales / individuo (Figura 10). El mayor número de camarones enfermos se obtuvo a través de la ruta inmersión, a 29 °C y  $1.35 \times 10^8$  réplicas virales / individuo (Figura 10).

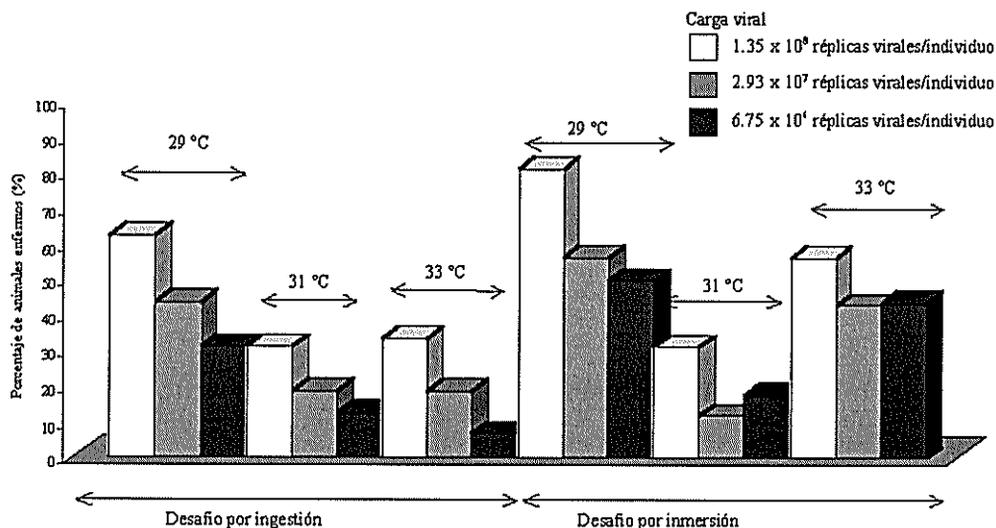


Figura 10. Porcentajes de animales enfermos con WSD (por análisis de histología) en función de la ruta de transmisión viral, temperatura y carga viral de infección a los 3 d p.i. Bioensayo 3.

Los resultados obtenidos a través de las tablas de contingencia (Tabla 11) mostraron que la temperatura ( $\chi^2 = 24.171$ , g l = 2,  $p = 0.000$ ) y la ruta de infección ( $\chi^2 = 7.125$ , g l = 1,  $p = 0.008$ ) estuvieron relacionadas con el estado de enfermedad de los animales de experimentación. Los animales desafiados por inmersión manifestaron una prevalencia de WSD (62/144) significativamente mayor que los desafiados a través de la ingestión

(40/143) (Tabla 11). Implicando que los individuos desafiados por inmersión presentaron 54 % mayor riesgo relativo (62/144 / 40/143) de padecer WSD comparado con los individuos desafiados a través de la ingestión (Tabla 11). Una vez que la infección ocurrió, los camarones sometidos a una temperatura ambiental de 29 °C, tuvieron 2.65 veces (51/96 / 19/98) más riesgo relativo de enfermar con WSD comparados con los mantenidos a 31 °C y 1.56 (51/96 /32/93) veces más riesgo comparados con los mantenidos a 33 °C (Tabla 11). Por el contrario, la carga viral no presentó relación con el estado de enfermedad de los camarones desafiados ( $\chi^2=4.66$ ,  $gl=2$ ,  $p = 0.097$ ) (Tabla 11).

Tabla 11. Tablas de contingencia entre ocurrencia de la enfermedad de Mancha Blanca (determinada a través del análisis de histología) a los 3 días p.i. y ruta de infección (ingestión e inmersión), temperatura (29, 31 y 33 °C) y concentración de WSSV ( $1.35 \times 10^8$ ,  $2.93 \times 10^7$  y  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales/animal). Bioensayo 3.

Variable	Nivel	Estadístico	No. animales sanos	No. animales enfermos	Total	
Ruta de infección	Ingestión	n	103	40	143	
		Porcentaje	72.0	28.0		
		Residuos	2,7	-2,7		
	Inmersión	n	82	62	144	
		Porcentaje	56.9	43.1		
		Residuos	-2,7	2,7		
		Total	185	102	287	
Temperatura (°C)	29 °C	n	45	51	96	
		Porcentaje	46.9	53.1		
		Residuos	-4,4	4,4		
	31 °C	n	79	19	98	
		Porcentaje	73,47	19,4		
		Residuos	4,1	-4,1		
	33 °C	n	61	32	93	
		Porcentaje	65.6	34.4		
		Residuos	0,3	-0,3		
		Total	185	102	287	
	Carga viral (réplicas virales / individuo)	$1.35 \times 10^8$	n	53	42	95
			Porcentaje	55.8	44.2	
Residuos			-2,2	2,2		
$2.93 \times 10^7$		n	66	30	96	
		Porcentaje	68.8	31.3		
		Residuos	1,1	-1,1		
$6.75 \times 10^6$		n	66	30	96	
		Porcentaje	68.8	31.3		
		Residuos	1,1	-1,1		
		Total	185	102	287	

El modelo de regresión logística construido con las variables temperatura y ruta de infección viral (Tabla 12) definió la función de la probabilidad (Gamma,  $\gamma$ ) de que los individuos desafiados se enfermen (ecuación 12).

Tabla 12. Influencia de la temperatura, ruta de transmisión viral sobre la enfermedad a los 3 d p.i. en el Bioensayo 3. Resultados del análisis de regresión logística.

Variables en la ecuación	Coef.	Error estándar del Coef	Estadístico de Wald	gl	P-value	Exp (Coef.) OR	IC 95 % para Exp (Coef.) = OR	
							Lim. inferior	Lim. Superior
Temperatura <sup>1</sup>	-0.215	0.079	7.435	1	0.006	0.806	0.691	0.941
Ruta de transmisión <sup>2</sup>	-0.682	0.255	7.167	1	0.007	0.506	0.307	0.833
Constante	6.385	2.447	6.809	1	0.009			

<sup>1</sup> La temperatura fue ingresada como variable continua en la regresión logística.

<sup>2</sup> La ruta de transmisión por inmersión es el nivel de referencia

Coef. = coeficiente, OR = odds ratio, IC = intervalo de confianza

$$\text{Probabilidad de ocurrencia de la enfermedad} = \text{Gamma } (\gamma) = \frac{[\exp^{6.385 - (0.215 \text{ Temperatura}) - (0.682 \text{ Ruta})}]}{[1 + \exp^{6.385 - (0.215 \text{ Temperatura}) - (0.682 \text{ Ruta})}]} \quad (12)$$

El empleo del índice histológico para WSSV de Maldonado (2003) sobre los resultados de la histología mostró implicaciones importantes en cuanto a la magnitud de los daños producidos en los tejidos. En la Figura 11, se observa una tendencia decreciente de la patogenicidad con respecto a la carga viral en el desafío. Además, a pesar de que los análisis previos mostraron en general que en la infección y la enfermedad los animales desafiados con WSSV a 33 °C tuvieron mayor prevalencia que a 31 °C, la magnitud de las lesiones a 33 °C fueron menores que a 31 °C (Figura 11). Observándose además que, la magnitud de las lesiones provocadas por el WSSV fueron más similares en los animales desafiados a 29 y 31 °C que entre 31 y 33 °C (Figura 11).

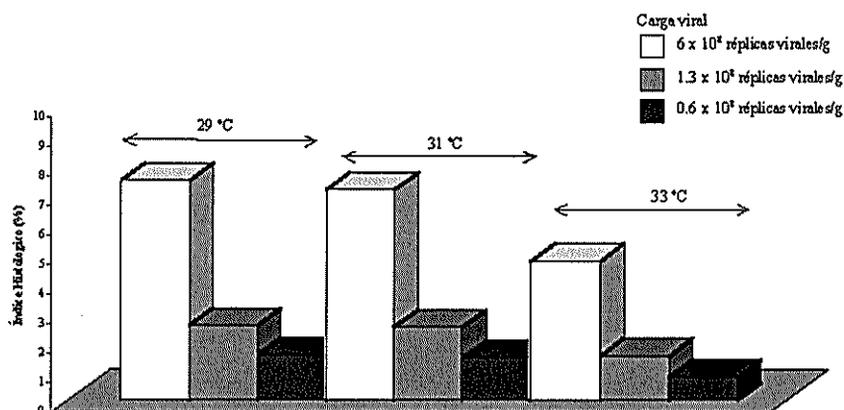


Figura 11. Índice Histológico (IH) en los camarones enfermos de WSD en el Bioensayo 3, en función de la temperatura y la carga viral de infección.

#### 4.3.3. Análisis de la virulencia

El análisis gráfico de la mortalidad en el Bioensayo 3 mostró que la mayor mortalidad estuvo asociada a los desafíos a 29 °C (Figura 12). La mortalidad ocurrió también a 31 °C, pero a 33 °C sólo se reportó un animal muerto (1/93) (Figura 12 y Tabla 13). Con respecto a la carga viral, se observó que las mayores mortalidades ocurrieron en la carga viral de mayor concentración ( $1.35 \times 10^8$  réplicas virales por individuo) (Figura 12). No se observó una tendencia clara en la mortalidad de los individuos en relación a la ruta de transmisión viral (Figura 12 y Tabla 13).

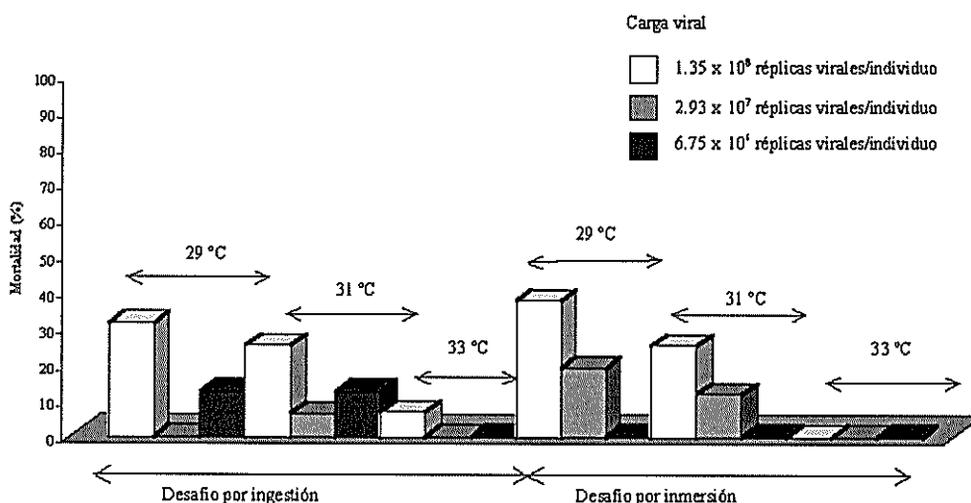


Figura 12. Mortalidad (%) a los 3 d p.i. en función de la ruta de transmisión viral, temperatura y carga viral de infección a los 3 d p.i. Bioensayo 3.

Los resultados obtenidos a través de las tablas de contingencia realizadas para analizar la relación entre las variables de estudio y la mortalidad mostró que la carga viral de desafío ( $\chi^2 = 19.049$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0.000$ ) y la temperatura ( $\chi^2 = 14.502$ ,  $g 1 = 2$ ,  $p = 0.001$ ) estuvieron relacionadas con la mortalidad de los camarones desafiados (Tabla 13). Los animales desafiados a una carga viral de  $1,35 \times 10^8$  réplicas virales por individuo, manifestaron una mortalidad significativamente mayor (21/95), que los desafiados a  $2.93 \times 10^7$  réplicas virales / individuo (6/96) y superior también a los desafiados a  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales / individuo (4/96) (Tabla 13). Lo cual implicó que, los individuos desafiados con una carga viral equivalente a  $1,35 \times 10^8$  réplicas virales / individuo presentaron 3.5 y 5.3 veces más riesgo relativo de morir por WSD comparados con los animales desafiados a  $2.93 \times 10^7$  y  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales / individuo, respectivamente (Tabla 13). Los animales sometidos a una 29 °C tuvieron 35 % (17/96 / 13/98) veces más riesgo relativo de morir por WSD que los animales mantenidos a 31 °C y 15.36 (17/96 /

1/93) veces mas riesgo que los mantenidos a 33 °C (Tabla 13). La ruta de transmisión viral no mostró relación significativa ( $\chi^2 = 0.349$ , g l = 1, p = 0.554) con la mortalidad (Tabla 13).

Tabla 13. Tablas de contingencia entre mortalidad a los 3 días p.i. y ruta de infección (ingestión e inmersión), niveles de temperatura (29, 31 y 33 °C) y concentración de WSSV ( $1.35 \times 10^8$ ,  $2.93 \times 10^7$  y  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales/animal). Bioensayo 3

Variable	Nivel	Estadístico	No. animales vivos	No. animales muertos	Total
Ruta de infección	Ingestión	n	126	17	143
		Porcentaje	88.11	11.89	
		Residuos	-0.6	0.6	
	Inmersión	n	130	14	144
		Porcentaje	90.28	9.72	
		Residuos	0.6	-0.6	
		Total	258	31	287
Temperatura (°C)	29 °C	n	79	17	96
		Porcentaje	82.29	17.71	
		Residuos	-2.7	2.7	
	31 °C	n	85	13	98
		Porcentaje	86.73	13.27	
		Residuos	-1	1	
	33 °C	n	92	1	93
		Porcentaje	98.92	1.08	
		Residuos	3.7	-3.7	
		Total	256	31	287
Carga viral (réplicas virales / camarón)	$1.35 \times 10^8$	n	74	21	95
		Porcentaje	77.89	22.11	
		Residuos	-2.2	2.2	
	$2.93 \times 10^7$	n	90	6	96
		Porcentaje	93.75	6.25	
		Residuos	1.8	-1.8	
	$6.75 \times 10^6$	n	92	4	96
		Porcentaje	95.83	4.17	
		Residuos	2.6	-2.6	
		Total	258	31	287

El análisis de los resultados de la regresión logística construida con las variables temperatura y carga viral (Tabla 14) permitió definir la función de la probabilidad de que los individuos desafiados mueran (ecuación 13).

Tabla 14. Modelo de regresión logística que explica la contribución de la temperatura, y la carga viral sobre la mortalidad a los 3 d p.i. en el Bioensayo 3.

Variable en la ecuación	Coef	Error estándar del Coef	Estadístico de Wald	gl	P-value	Exp (Coef) = OR	IC 95 % para Exp (Coef)	
							Lim. Inf.	Lim. Sup.
Temperatura <sup>1</sup>	-0.493844	0.145	11.552	1	0.001	0.610	0.459	0.811
Carga viral <sup>1</sup>	0.3243848	0.082	15.586	1	0.000	1.383	1.177	1.625
Coef	11.8521	4.367	7.359	1	0.007			

<sup>1</sup> La temperatura y la carga viral fueron ingresadas como variables continuas en la regresión logística.  
Coef. = coeficiente, OR = odds ratio, IC = intervalo de confianza

$$\text{Probabilidad de mortalidad} = \frac{\exp^{11.8521 - (0.4938 \text{ temperatura}) + (0.324 \text{ carga viral})}}{1 + \exp^{11.8521 - (0.4938 \text{ temperatura}) + (0.324 \text{ carga viral})}} \quad (13)$$

Alpha ( $\alpha$ )

Además, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier basado en los valores de mortalidad en función de la temperatura (estratificada por carga viral) mostró diferencias significativas en la distribución de la supervivencia (log rango = 14.15, gl = 2, P = 0.0008). Así, en los tres niveles de carga viral, la distribución de la supervivencia a 33 °C fue diferente a la observada a 29 y 31 °C. Mientras que, en estos dos últimos tratamientos no se observaron mayores diferencias (Figuras 13, 14 y 15).

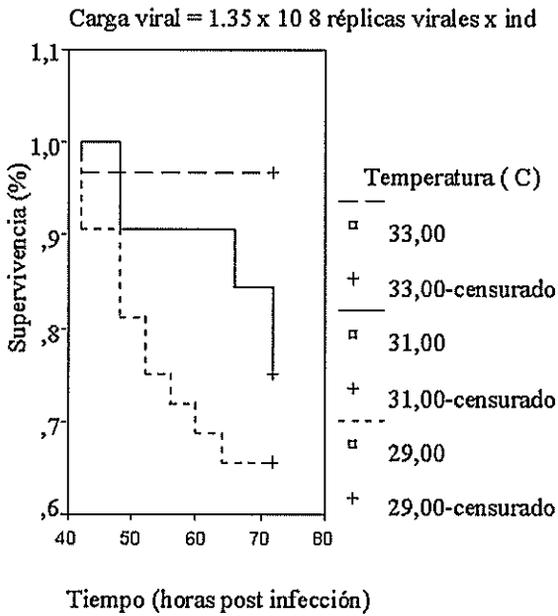


Figura 13. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier con relación a la temperatura. Carga viral de infección =  $1.35 \times 10^8$  réplicas virales/individuo. Bioensayo 3.

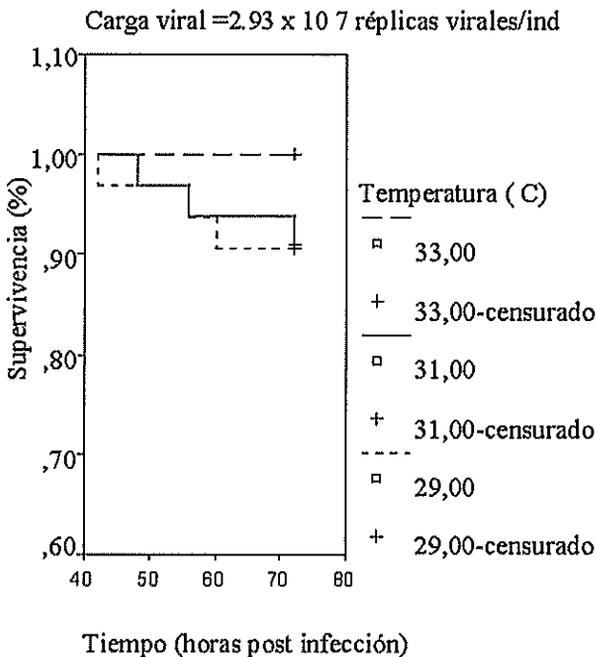


Figura 14. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier con relación a la temperatura. Carga viral de infección =  $2.93 \times 10^7$  réplicas virales/individuo. Bioensayo 3.

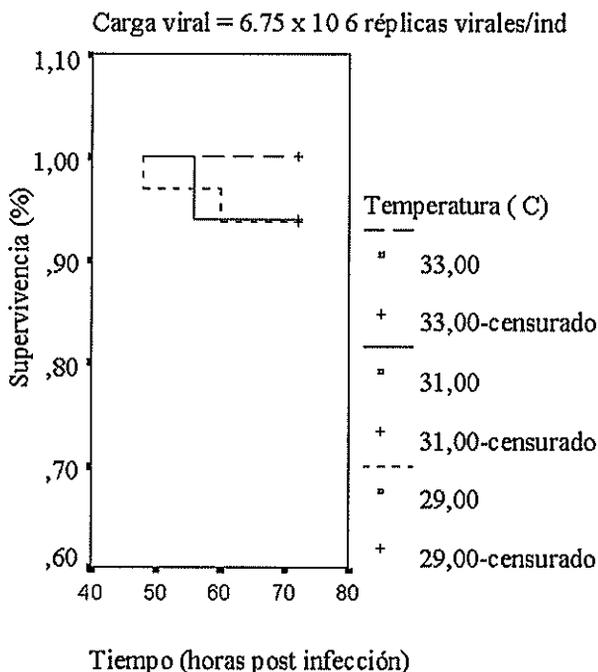


Figura 15. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier con relación a la temperatura. Carga viral de infección =  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales/individuo. Bioensayo 3.

### 4.3.3. Modelo epidémico de WSD

#### 4.3.3.1. Estructura del modelo

El modelo para una epidemia de WSD se construyó con las siguientes componentes:

- i) Las clases de individuos que ocurren durante una epidemia: susceptibles (S), infectados (I), enfermos (E), muertos (M). En la Figura 16 estos grupos son representados por cuadrados. Para las condiciones iniciales de los tratamientos, los valores iniciales fueron:  $S = 16$  animales,  $I = 0$ ,  $E = 0$ ,  $M = 3$ .
- i) Los parámetros básicos de una epidemia: las probabilidades de transmisión (Beta,  $\beta$ ), de patencia (Gamma,  $\gamma$ ) y de virulencia (Alpha,  $\alpha$ ), que fueron definidos en los modelos estadísticos desarrollados en la sección previa

(ecuaciones 11, 12 y 13). Según la hipótesis de este estudio, estos parámetros básicos dependen de tres variables (temperatura, ruta de transmisión y carga viral). En la Figura 16, los parámetros y las variables están representados por círculos.

$$\text{Probabilidad de transmisión (Beta, } \beta) = 1.256 - (0.0377 \text{ Temperatura}) + (0.08485 \text{ Ruta})$$

$$\text{Probabilidad de enfermedad (Gamma, } \gamma) = \frac{[\exp^{6.385 - (0.215 \text{ Temperatura}) - (0.682 \text{ Ruta})}]}{[1 + \exp^{6.385 - (0.215 \text{ Temperatura}) - (0.682 \text{ Ruta})}]}$$

$$\text{Probabilidad de mortalidad (Alpha, } \alpha) = \frac{[\exp^{11.8521 - (0.4938 \text{ Temperatura}) + (0.324 \text{ Carga viral})}]}{[1 + \exp^{11.8521 - (0.4938 \text{ Temperatura}) + (0.324 \text{ Carga viral})}]}$$

- i) La transferencia de material o el paso de individuos de un estado a otro (por ejemplo, grupos de animales que pasan de estar infectados a enfermos) están representados por la susceptibilidad, patogenicidad y virulencia. En la Figura 16 están representados por los tubos de flujo.

$$\text{Susceptibilidad} = S_t [1 - (1 - \beta)^{I_t}]$$

$$\text{Patogenicidad} = \lambda I_t$$

$$\text{Virulencia} = \alpha E_t$$

- i) Para que la evolución de la epidemia sea dinámica, se conectaron las componentes del sistema, de tal manera que las variables explicatorias (temperatura, ruta de transmisión y carga viral) fueron conectadas a los parámetros de la epidemia ( $\beta$ ,  $\lambda$  y  $\alpha$ ). A su vez, estos parámetros conectan a las características básicas de la epidemia (susceptibilidad, patogenicidad y virulencia). Los grupos de individuos fueron colocados en el orden lógico del desarrollo de una epidemia. Así en primer lugar, se colocó la caja que contiene los individuos susceptibles, luego los infectados, los enfermos y, finalmente los muertos. Las cajas fueron conectadas siguiendo este orden.

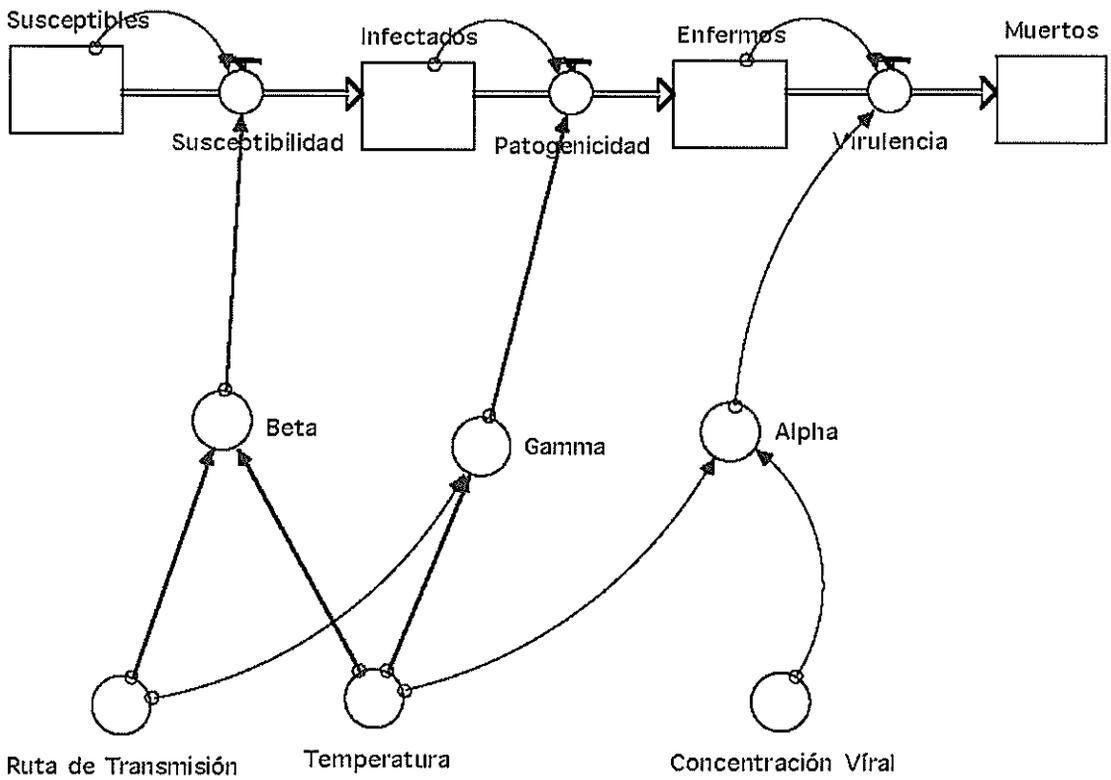


Figura 16. Esquema del modelo epidémico de WSD desarrollado con los resultados del estudio. Simulación corrida en Stella 8.1.1.

El esquema planteado determina que la dinámica sea establecida mediante la suma y resta de las entradas y salidas de individuos de un estado a otro.

Así, los susceptibles en el tiempo  $t + 1$  serán iguales a los susceptibles en el tiempo  $t$ , menos los susceptibles que dejaron de serlo para pasar a ser infectados, representada en la ecuación 7

$$S_{t+1} = S_t - S_t [1 - (1 - \beta)^{I_t}] \quad (7)$$

Los infectados en el tiempo  $t + 1$  serán iguales a los infectados en el tiempo  $t$ , más los

individuos susceptibles que se infectaron en el tiempo  $t$ , menos los individuos infectados que pasaron a formar parte de los enfermos. Esta dinámica fue representada en la ecuación 8.

$$I_{t+1} = I_t + S_t [1 - (1 - \beta) I_t] - \lambda I_t \quad (8)$$

Los individuos enfermos en el tiempo  $t + 1$  serán iguales a los enfermos en el tiempo  $t$ , más los infectados que se enfermaron en el tiempo  $t$ , menos los individuos enfermos que murieron en el tiempo  $t$  (ecuación 9)

$$E_{t+1} = E_t + \lambda I_t - \alpha E_t \quad (9)$$

Los individuos muertos en el tiempo  $t + 1$  serán iguales a los muertos en el tiempo  $t$ , mas los individuos enfermos que mueren (ecuación 10)

$$M_{t+1} = M_t + \alpha E_t \quad (10)$$

#### 4.3.4.2. Resultados de la simulación

Los datos iniciales de los 18 tratamientos conformados por la combinación de los 3 niveles de temperatura, 2 niveles de ruta de transmisión y 3 niveles de carga viral fueron corridos con el modelo propuesto en la Figura 16. Los resultados son mostrados en las Figuras 17, 18 y 19 e indican que a las 3 temperaturas (29, 31 y 33 °C) el modelo predice con bastante exactitud la mortalidad real en las 2 cargas virales inferiores. Se observan mayores diferencias en la concentración viral más alta por ingestión a las 3 temperaturas de experimentación. Esto sucede porque el modelo subestima la mortalidad real cuando la concentración viral es la más alta. Una observación interesante es que el máximo número de animales infectados ocurre al día 2 en todos los tratamientos a 29 y 31 °C y, en

ingestión a 33 °C. Sin embargo, el máximo número de animales infectados a 33 °C, en el desafío por inmersión, ocurre al día 3 p.i. Este hecho parece ocurrir debido a que en los animales desafiados por inmersión a 33 °C la probabilidad de enfermarse fue más baja, lo que conlleva a que haya mayor disponibilidad de animales infectados al día 3.

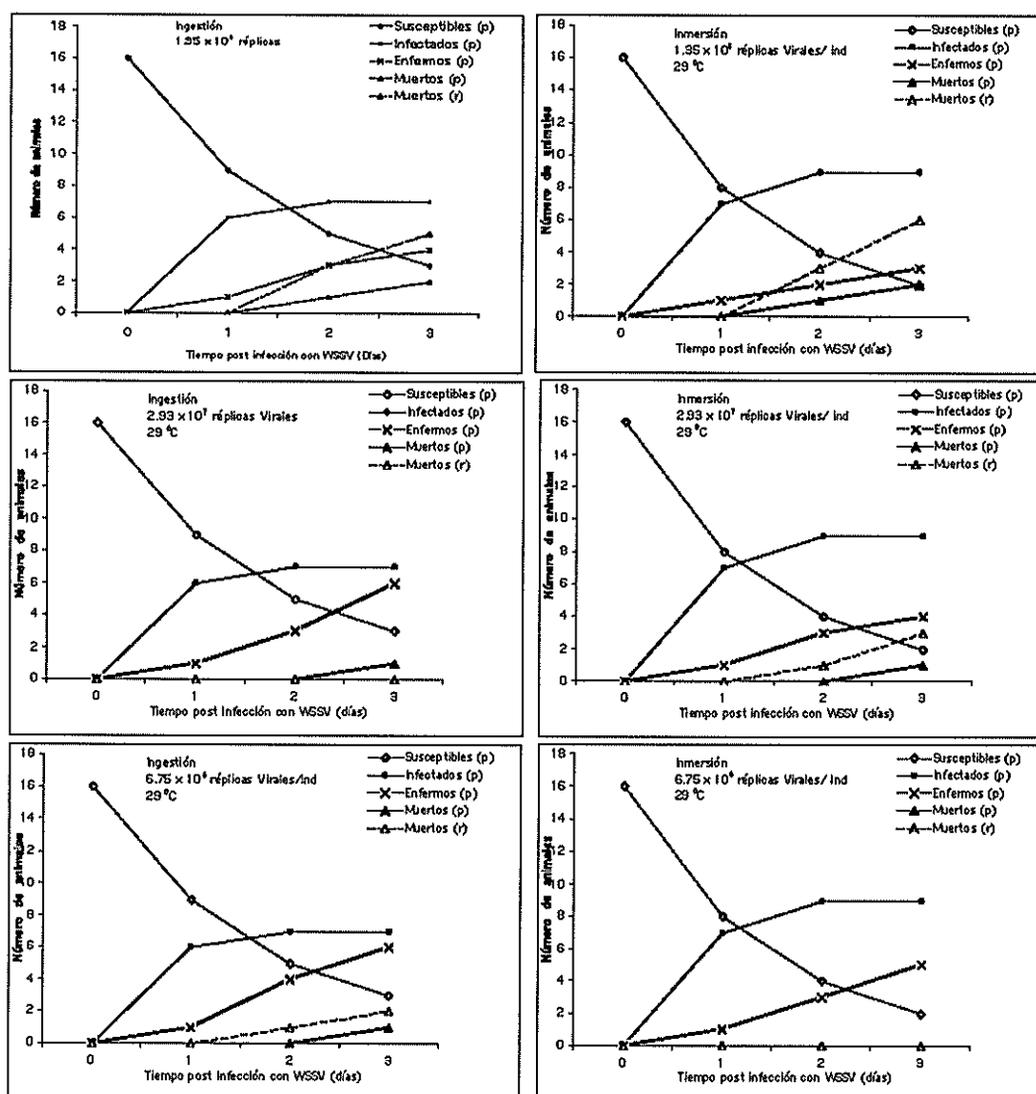


Figura 17. Variación en tiempo de la dinámica de WSD producida por desafíos por ingestión (gráficos en panel izquierdo) y por inmersión (gráficos en panel derecho) a 29 °C. Datos pronosticados por el modelo desarrollado a partir de los resultados del Bioensayo 3. La simulación fue realizada con Stella Research 8.1.1.

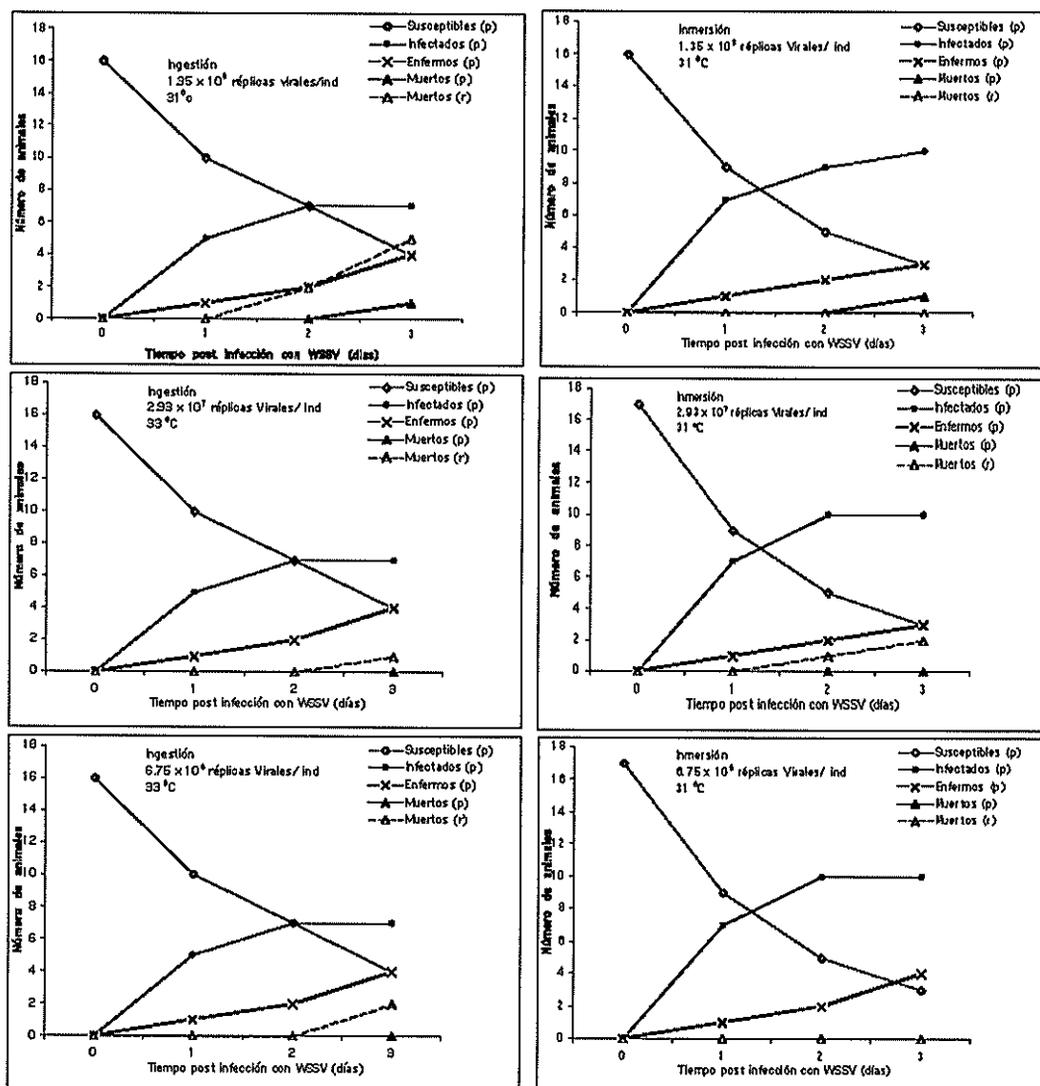


Figura 18. Variación en tiempo de la dinámica de WSD producida por desafíos por ingestión (gráficos en panel izquierdo) y por inmersión (gráficos en panel derecho) a 31 °C. Datos pronosticados por el modelo desarrollado a partir de los resultados del Bioensayo 3. La simulación fue realizada con Stella Research 8.1.1.

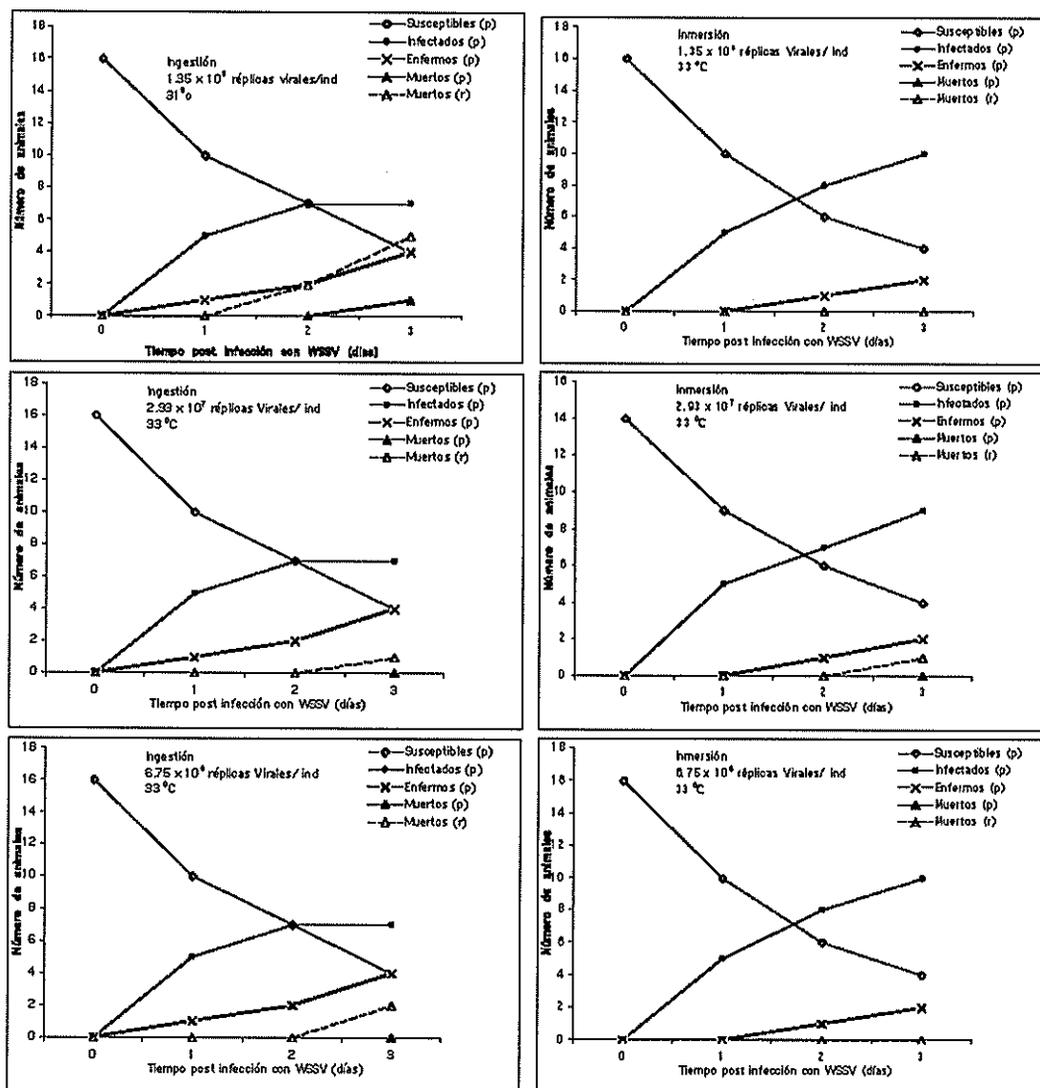


Figura 19. Variación en tiempo de la dinámica de WSD producida en desafíos por ingestión (gráficos en panel izquierdo) y por inmersión (gráficos en panel derecho) a 33 °C. Datos pronosticados por el modelo desarrollado a partir de los resultados del Bioensayo 3. La simulación fue realizada con Stella Research 8.1.1.

#### 4.3.4.3. Validación del modelo

El análisis de concordancia entre las predicciones del modelo y la información real del Bioensayo 3 mostró que la predicción del modelo tuvo una sensibilidad del 68 %, una especificidad del 87 %, un valor predictivo positivo del 78 % y un valor predictivo negativo del 81 %. Estos valores resultan en una evaluación favorable para la habilidad predictiva del modelo. Un análisis por separado de las predicciones sobre los animales susceptibles infectados, enfermos y muertos mostró lo siguiente:

Para los animales susceptibles: sensibilidad 54 %, especificidad 100 %, valor predictivo positivo 100 %, valor predictivo negativo 64 %.

Para los animales infectados: sensibilidad 100 %, especificidad 55 %, valor predictivo positivo 33 %, valor predictivo negativo 100 %.

Para los animales enfermos: sensibilidad 69 %, especificidad 97 %, valor predictivo positivo 83 %, valor predictivo negativo 84 %.

Para los animales muertos: sensibilidad 36 %, especificidad 100 %, valor predictivo positivo 100 %, valor predictivo negativo 83 %.

La concordancia para los 18 tratamientos en los cuatro grupos de animales es descrita en la tabla 15.

Tabla 15. Habilidad predictiva del modelo epidémico de WSD para los individuos susceptibles, infectados, enfermos y muertos de los 18 tratamientos del Bioensayo 3.

Grupo	Ruta de infección	Temperatura (°C)	Carga viral (réplicas / individuo)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo positivo (%)	Valor predictivo negativo (%)	
Susceptibles	Ingestión	29	1.35 x 10 <sup>8</sup>	60	100	100	85	
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	50	100	100	77	
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	50	100	100	77	
		31	1.35 x 10 <sup>8</sup>	36	100	100	100	42
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	31	100	100	100	25
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	31	100	100	100	25
		33	1.35 x 10 <sup>8</sup>	70	100	100	100	63
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	80	100	100	100	78
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	80	100	100	100	71
	Inmersión	29	1.35 x 10 <sup>8</sup>	100	100	100	100	100
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	33	100	100	100	71
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	67	100	100	100	93
		31	1.35 x 10 <sup>8</sup>	27	100	100	100	38
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	25	100	100	100	36
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	25	100	100	100	36
		33	1.35 x 10 <sup>8</sup>	67	100	100	100	83
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	67	100	100	100	80
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	67	100	100	100	75
Infectados	Ingestión	29	1.35 x 10 <sup>8</sup>	100	60	14	100	
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	100	69	43	100	
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	100	60	14	100	
		31	1.35 x 10 <sup>8</sup>	-	-	-	-	-
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	100	60	14	100	
		33	1.35 x 10 <sup>8</sup>	-	-	-	-	-
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	100	71	43	100	
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	100	73	57	100	
	Inmersión	29	1.35 x 10 <sup>8</sup>	100	47	11	100	
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	100	47	11	100	
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	100	64	56	100	
		31	1.35 x 10 <sup>8</sup>	-	-	-	-	-
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	100	50	30	100	
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	100	47	20	100	
		33	1.35 x 10 <sup>8</sup>	100	40	100	100	
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	100	42	22	100	
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	100	43	20	100	
Enfermos	Ingestión	29	1.35 x 10 <sup>8</sup>	80	100	100	92	
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	86	100	100	90	
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	86	100	100	90	
		31	1.35 x 10 <sup>8</sup>	100	80	25	100	
			2.93 x 10 <sup>7</sup>	100	86	50	100	
			6.75 x 10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	
	33	1.35 x 10 <sup>8</sup>	50	100	100	85		
		2.93 x 10 <sup>7</sup>	75	100	100	93		
		6.75 x 10 <sup>6</sup>	75	100	50	92		
	Inmersión	29	1.35 x 10 <sup>8</sup>	43	100	100	69	

			$2.93 \times 10^7$	67	100	100	83
			$6.75 \times 10^6$	63	100	100	73
		31	$1.35 \times 10^8$	100	87	33	100
			$2.93 \times 10^7$	-	-	-	-
			$6.75 \times 10^6$	100	93	75	100
		33	$1.35 \times 10^8$	22	100	100	50
			$2.93 \times 10^7$	33	100	100	67
			$6.75 \times 10^6$	29	100	100	64
Muertos	Ingestión	29	$1.35 \times 10^8$	40	100	100	79
			$2.93 \times 10^7$	-	-	-	-
			$6.75 \times 10^6$	50	100	100	93
		31	$1.35 \times 10^8$	20	100	100	73
			$2.93 \times 10^7$	-	-	-	-
			$6.75 \times 10^6$	-	-	-	-
		33	$1.35 \times 10^8$	-	-	-	-
			$2.93 \times 10^7$	-	-	-	-
			$6.75 \times 10^6$	-	-	-	-
	Inmersión	29	$1.35 \times 10^8$	50	100	100	86
			$2.93 \times 10^7$	33	100	100	87
			$6.75 \times 10^6$	-	-	-	-
		31	$1.35 \times 10^8$	25	100	100	80
			$2.93 \times 10^7$	-	-	-	-
			$6.75 \times 10^6$	-	-	-	-
		33	$1.35 \times 10^8$	-	-	-	-
			$2.93 \times 10^7$	-	-	-	-
			$6.75 \times 10^6$	-	-	-	-

- No se pudo realizar el cálculo debido a que dos celdas de la tabla de contingencia tuvieron 0 conteos

## 5. DISCUSION

La variabilidad en el tiempo del número de animales susceptibles, infectados, enfermos y muertos, en función de la temperatura, la carga viral y la ruta de transmisión viral, durante una epidemia, ha sido analizada en el transcurso de los 3 bioensayos realizados en este trabajo. Los resultados encontrados corroboraron la hipótesis inicial de trabajo referente a que la dinámica de una epidemia de WSD está relacionada con la concentración viral, la ruta de transmisión y la temperatura.

Adicionalmente, se encontraron otros resultados relacionados con el impacto de una epidemia de WSD. Así, en el proceso de búsqueda bibliográfica, sobre concentraciones letales de WSSV que produjeran distintos valores de mortalidad, observamos que no habían sido publicados trabajos que trataran sobre dosis letales ( $LD_{50}$  y  $LD_{90}$ ) de WSSV, basados en rutas naturales de transmisión. Wu *et al.* (2002) en *P. japonicus* y Prior *et al.* (2003) en *P. vannamei* citan el empleo y la obtención de  $LD_{50}$  en desafíos con homogeneizados de tejidos infectados con WSSV vía inyección, lo que al no ser una ruta de transmisión natural no pudo ser utilizada como niveles de carga viral de referencia para el Bioensayo 3. Prior y colaboradores intentaron sin éxito encontrar dosis letales de WSSV por inmersión. Por tales motivos, a falta de información relevante en la literatura, el Bioensayo 1 fue corrido para encontrar niveles de carga viral que pudiesen ser utilizados posteriormente en el Bioensayo 3. Aunque las mortalidades acumuladas a los 5 d p.i. en todos los tratamientos del Bioensayo 1 fueron inferiores al 50 %, y por tanto no fue posible obtener niveles letales ( $LD_{50}$  y  $LD_{90}$ ) de concentración de WSSV, se encontró que, sin importar la ruta de transmisión o concentración de carga viral, los individuos que fueron desafiados en forma aislada presentaron muy bajas mortalidades.

Coincidentemente, tales resultados fueron similares a los desafíos individuales realizados por Wu *et al.* (2001) y por Prior *et al.* (2003). Los bajos niveles de mortalidad obtenidos en el desafío individual, contrastados con los niveles altos de mortalidades en condiciones de cultivo, cuando los animales se encuentran agrupados en grupos, resaltó la relevancia de la transmisión secundaria sobre la mortalidad ocasionada por el WSD.

Los resultados del Bioensayo 2 permitió confirmar la relevancia del impacto de la transmisión secundaria, a través de la comparación entre desafíos individuales y colectivos. Se corroboraron las bajas mortalidades de los animales desafiados en forma individual, contrastadas con altas mortalidades observadas en los desafíos en conjunto. Esto, sumado al hecho de haber encontrado una relación significativa entre la concentración de carga viral y la supervivencia en el Bioensayo 2, confirma que la transmisión secundaria es un factor importante para las altas mortalidades producidas por el WSD en las poblaciones de cultivo. Al respecto, Wu *et al.* (2001) aducen un mayor estrés y más altas posibilidades de transmisión horizontal entre los individuos desafiados de forma colectiva.

Posiblemente, lo que ocurre durante una epidemia, es que casos secundarios (individuos susceptibles que son infectados por los casos primarios) e inclusive, los casos terciarios (casos producidos por contacto con los casos secundarios), pueden incrementarse en tiempo por efecto del canibalismo y la transmisión de patógenos liberados por los animales infectados al medio. Esto daría paso a que ocurra un brote epidémico. En este contexto, la contagiosidad o habilidad del patógeno para propagarse en una población, puede ser un término más importante para la dinámica de WSD que la transmisión viral. Por otro lado, los resultados obtenidos con los desafíos individuales sugieren que los

animales pueden controlar la enfermedad si ellos no son reinfectados. Por tanto, estrategias conducidas a decrecer la carga viral en las larvas antes de la siembra en la piscina o, conducidas a decrecer la contagiosidad, a nivel de casos secundarios y terciarios, pueden ser potenciales estrategias de control para el WSD.

Las concentraciones virales (diluciones 1:1, 1:5 y 1:10) empleadas en el Bioensayo 2, que a través de los desafíos en forma conjunta por ingestión produjeron mortalidades del 100, 33 y 0 %, fueron utilizadas en el Bioensayo 3, excluyendo de estudiar las diluciones inferiores probadas en el Bioensayo 1 que no produjeron ninguna mortalidad.

Para la completa comparación de la infección, enfermedad y mortalidad provocada por las dos rutas de transmisión viral (inmersión e ingestión), se utilizó igual cantidad de tejido infectado en ambas rutas de infección, resultando en las diluciones mostradas en la tabla 2 del capítulo 3. Esto permitió observar que la infección estuvo relacionada con la ruta de transmisión viral, siendo más efectiva por inmersión que por ingestión. Tales resultados se oponen a la afirmación de Lotz y Soto (2002), que plantean que la ruta más importante durante una epidemia es la ingestión. Por otro lado, el hecho de que similares porcentajes de infección fueran observados usando diferentes cargas virales puede ser fácilmente explicado si la mínima carga viral efectiva que se usó fue suficiente para producir un nivel de infección fuerte. Probablemente, para infectar a un individuo bastó con un número bajo de réplicas virales para iniciar la replicación al interior del organismo y para que posteriormente aparezcan los síntomas característicos de la enfermedad. Acorde con esto, sería suficiente aplicar una dilución de papilla viral 1:10, o lo que sería equivalente a una dilución de inóculo viral madre (1:5) por  $\text{mL}^{-1}$  de medio de cultivo de 1:11049, para conseguir el nivel umbral de carga infecciosa suficiente para producir una

infección efectiva. Dosis superiores no garantizarían una diferencia significativa en el porcentaje de animales infectados.

Tal como se esperaba, se encontró que la infección estuvo relacionada con la temperatura, observándose significativamente mayores prevalencias en los individuos desafiados a 29°C. Sin embargo, se encontró un número mayor de individuos infectados a 33 que a 31°C, lo cuál está en contraposición con la tendencia lógica esperada. Al respecto, vale destacar que, Sonnenholzner *et al.* (2002) previamente encontraron prevalencias altas de infección en animales sometidos a 33 °C. Por otro lado, la cosecha de los animales del Bioensayo 3 se prolongó dos días y la mayoría de los animales desafiados a 33 °C fueron colectados en el segundo día de cosecha, pudiendo ser una mayor replicación viral la causante de mayores niveles de transmisión en los animales desafiados a 33 °C comparados con los animales a 31 °C. A pesar de esto, los animales desafiados a 29 °C presentaron mayores infecciones que los animales desafiados a 33 °C, mostrando el riesgo alto de infección a esa temperatura.

La prevalencia de la enfermedad también presentó iguales patrones que la infección, con la ruta de transmisión viral y la temperatura afectando la presentación de la enfermedad. Así, a 29 y a 31 °C se presentó una cantidad significativamente mayor de animales enfermos y sanos, respectivamente. Mientras que a 33 °C no se observó ningún patrón claro (igual cantidad de enfermos y sanos). Un análisis más profundo mostró que las prevalencias de la enfermedad y la infección fueron mayores a 33 que a 31 °C en el desafío por inmersión (Figura 10). Sin embargo, al considerar tanto la ocurrencia como la magnitud de la enfermedad, expresada a través del índice histológico, se observó una relación inversa entre el índice histológico y la temperatura, sugiriendo que a pesar de una

mayor prevalencia de infección y enfermedad, los animales a 33 °C pudieron manejar mejor la enfermedad (Figura 11). Según Blake (2004), existe relación significativa entre el índice histológico para WSD y los signos clínicos externos de los animales que mueren y el curso de la infección. Este planteamiento asociaría los mayores índices histológicos con el curso más grave de WSD, que en el caso del Bioensayo 3 ocurrió principalmente a 29 °C y luego a 31 °C.

Tal idea fué reforzada por el hecho de que casi el 100 % de los animales infectados a 33°C sobrevivieron, mostrando una diferencia altamente significativa con respecto a los animales desafiados a 29 e inclusive a 31 °C. Mientras que, no se observó ninguna diferencia significativa de mortalidad entre los animales desafiados a 29 y 31 °C. Esto corrobora, los resultados encontrados por Granja *et al.* (2003) y Vidal *et al.* (2001), respecto a que el nivel crítico de temperatura está alrededor de 32 °C. De acuerdo a ellos, temperaturas bajas en los cultivos permiten al WSSV propagarse y causar severas epidemias a partir del segundo día posterior a la disminución de este parámetro, en tanto que la mortalidad es inhibida en los camarones de la especie *P. vannamei* cuando las temperaturas son superiores a los 32 °C. Sin embargo los resultados de esta tesis muestran que WSD puede ser un problema, inclusive en cultivos con invernaderos, debido a que la hipotermia no protege a los animales de la infección.

Sonnenholzner *et al.* (2002) plantean que la supervivencia guarda relación con el grado de infección, pero no con la prevalencia, la cual en su estudio fue del 100 % en los animales sometidos a todas las temperaturas estudiadas después de las 24 h p.i., sugiriendo que el virus conserva su capacidad de infección a cualquier temperatura. Nuestros resultados no mostraron una prevalencia tan elevada como la reportada por Sonnenholzner *et al.* (2002),

debido a que en nuestro estudio las reinfecciones fueron evitadas, y que nuestro diagnóstico de infección (PCR), no estuvo basado en un método cuantitativo. Sin embargo, es evidente que la respuesta del hospedero, o las condiciones para que se produzca esta respuesta, fueron superiores a 33 °C. Los resultados de Vidal *et al.* (2001) y Sonnenholzner *et al.* (2002) indicaron que las temperaturas elevadas no inactivan el virus. Pero es mayor la respuesta al estrés térmico de los camarones, la cual puede detener las mortalidades. Se ha encontrado que *P. monodon* producen proteínas de estrés térmico (hsp = heat shock protein) a temperaturas superiores a 32 °C, indicando que los animales se enfrentan a situaciones de estrés a esa temperatura (de la Vega *et al.*, 2005). Lo que explicaría la paradoja encontrada en nuestros resultados de que a pesar de que a 33 °C se presente una mayor prevalencia que a 31 °C, la mortalidad fue casi inexistente. Esto conlleva a desarrollar la hipótesis de que la hipertermia, a partir de una temperatura situada en el intervalo entre 31 y 33 °C, deja de actuar como factor de protección con relación a la infección. Temperaturas superiores a 31 °C podrían ser un factor limitante para los camarones. Así, Venkataramiah *et al.*, (1974) han observado que la tasa de crecimiento de el *P. aztecus* declina cuando la temperatura se incrementa por encima de 31 °C. El estudio del efecto protector frente a WSSV de temperaturas entre 31 y 33 °C debe ser investigado.

La línea temporal de la dinámica de la infección y de la enfermedad mostró que la ruta de transmisión y la temperatura influyeron sobre la variabilidad del número de animales infectados y enfermos. Mientras que la temperatura y la carga viral modificaron la supervivencia, independientemente de la ruta de transmisión. La mortalidad en el desafío con la dilución más concentrada (1:1) mostró ser estadísticamente diferente a las otros dos diluciones en los tres días que duró el experimento. Consistente con esta observación,

se obtuvieron iguales resultados en el desafío colectivo del Bioensayo 2. Por tanto, es importante destacar que, a diferencia de los resultados encontrados en la infección, donde se obtuvo similares valores de infección con los tres niveles de carga viral, la supervivencia, estuvo condicionada a mayores niveles de carga viral. Las infecciones provocadas por un número pequeño de réplicas virales serían más fáciles de contrarrestar que las producidas por un alto número de réplicas virales. La mortalidad al estar estrechamente relacionada con la carga viral, determina que los camarones sean capaces de sobrevivir cuando la infección es producto de una baja carga viral. Blake (2004), obtuvo bajos niveles de mortalidades a través de infecciones subletales con WSSV en desafíos por inmersión. Lo cual es consistente con los resultados del Bioensayo 3, donde se obtuvo un número significativamente mayor de animales infectados y enfermos, a través de la inmersión viral. Sin embargo, la mortalidad resultó independiente de la ruta de transmisión viral.

El modelo epidémico publicado sobre el WSD se ha basado en el criterio histológico para definir la probabilidad de transmisión (Soto *et al.*, 2001, Soto y Lotz, 2001, Lotz y Soto, 2002, Soto y Lotz 2003). Al considerar que la histología no hace más que observar y cuantificar los signos clínicos de la enfermedad en los tejidos, de acuerdo a la metodología que se emplee, consideramos que existe una diferencia sustancial dentro de la dinámica de la enfermedad apreciada por el modelo de Lotz y Soto (2002) con la que aplicamos en el modelo desarrollado en el presente trabajo, ya que éste último muestra un mayor nivel de complejidad al diferenciar a los individuos infectados de los enfermos y calcular probabilidades para los dos casos.

Las predicciones del modelo desarrollado en esta tesis mostraron una aceptable exactitud con respecto a los valores reales, con valores más altos de especificidad, que de sensibilidad. Pero, con valores predictivos positivos y negativos altos, lo que significa que la habilidad predictiva del modelo fue aceptable.

Para validar el modelo desarrollado en esta tesis, se corrieron los datos iniciales de un experimento realizado por Sonnenholzner *et al.* 2002. En este experimento se estudió durante 16 días la supervivencia, infección y estado patológico de juveniles *P. vannamei* (1.2 g, en promedio) desafiados por vía oral con WSSV y sometidos a diferentes condiciones de temperatura. Para la validación del modelo, se escogieron los datos del experimento a 27 °C, ya que los otros tratamientos incluyeron cambios de temperatura, que el modelo desarrollado en esta tesis no considera.

En el tratamiento 27-27-27 °C de Sonnenholzner y colaboradores, los animales fueron infectados a 27 °C y mantenidos a esa temperatura hasta el final del experimento. Al día 0, antes de la infección, toda la población inicial (N) de 105 animales era susceptible (S). Un pequeño porcentaje se infectó el primer día (Figura 20). Al día 1.5 casi toda la población estaba infectada con el virus (estimado en 94 %), por lo que quedaron muy pocos susceptibles (Figura 20). Esto determinó un decrecimiento exponencial en el tiempo de los animales susceptibles, tal como ocurre en otras enfermedades infecciosas. En el caso del experimento de Sonnenholzner y colaboradores, el decrecimiento fue brusco, ya que a partir del día 2 no se encontró ningún susceptible (Figura 19). Este comportamiento es típico para el caso de epidemias con una *contagiosidad* alta, donde el número promedio de infecciones secundarias que ocurre cuando un animal infectado es introducido en una población completamente susceptible es alto ( $R_0$ , Número básico

reproductivo). Al correr la simulación en el modelo (Figura 21), se obtuvo como diferencia fundamental que el modelo predice un número ligeramente superior a la mortalidad del total de la población original a los 16 días p.i. y por ende reporta un menor número de animales infectados.

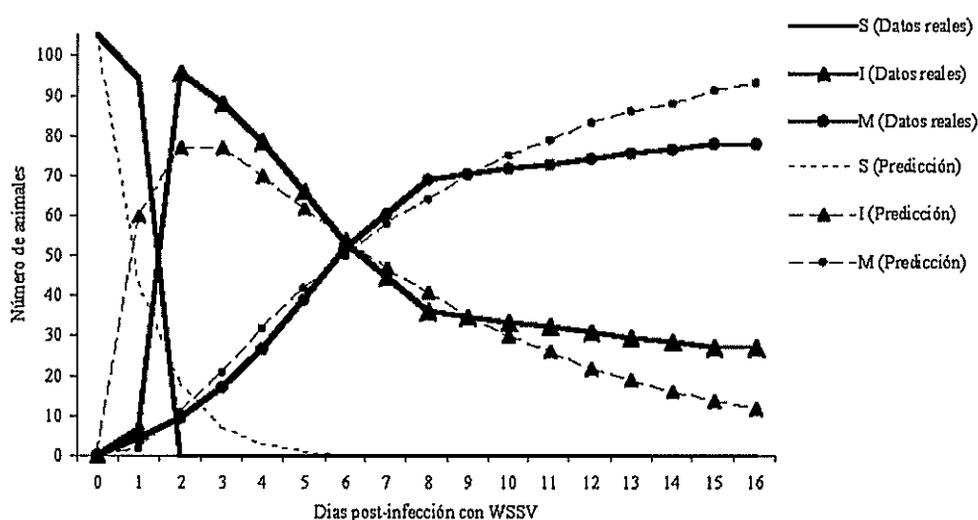


Figura 20. Datos reales mostrando el desarrollo de la epidemia de WSD durante 16 días de post-infección en el tratamiento 27-27-27 °C (promedios de 3 réplicas) (Sonnenholzner *et al.* 2002). Se muestra además los resultados de la simulación corrida a 27 °C con los mencionados datos iniciales. S = Susceptibles; I = Infectados; M = Muertos.

La dinámica de la epidemia no presentó diferencias muy pronunciadas entre la ocurrencia real de los eventos y su pronóstico. En el día 16 p.i., la sensibilidad del modelo con respecto a la mortalidad real fue del 100 %. Mientras que, la especificidad fue del 44.4 % y el valor predictivo positivo fue del 83.9 %. El mayor poder predictivo positivo (100 %) estuvo dado en cuanto al número de infectados, donde además se obtuvo una sensibilidad del 44.4 % y especificidad del 100 %. Los intervalos de registro de información en el desafío de Sonnenholzner y colaboradores fueron irregulares a partir del día 6 p.i. Por lo

que, al evaluar la predicción del modelo con los datos reportados hasta el día 6, este mostró un mayor ajuste, reflejado en el número de individuos infectados (sensibilidad 100 %, especificidad 98.08 %, valor predictivo positivo 98.1 %). Con respecto a la mortalidad al día 6 p.i., se obtuvo: sensibilidad 98.08 %, especificidad 100 % y valor predictivo positivo 100 %.

En la Figura 21 se observa que el ajuste de la mortalidad y de los animales infectados entre los datos reales del experimento de Sonnenholzner y colaboradores con la predicción de Soto y Lotz presenta una mayor diferencia en el tiempo, mostrando que el modelo desarrollado en esta tesis se ajusta mejor que el modelo de Soto y Lotz (2002). Al respecto, es importante destacar que, tanto el bioensayo de Sonnenholzner y colaboradores, como los experimentos de Soto y Lotz, se desarrollaron a 27 °C, lo que explicaría similitudes entre ambos datos. Pero, el modelo de Soto y Lotz mostrará los mismos resultados a cualquier nivel de temperatura, puesto que según ese modelo, los parámetros de la epidemia son fijos, sin mostrar variación por efecto de variables explicatorias.

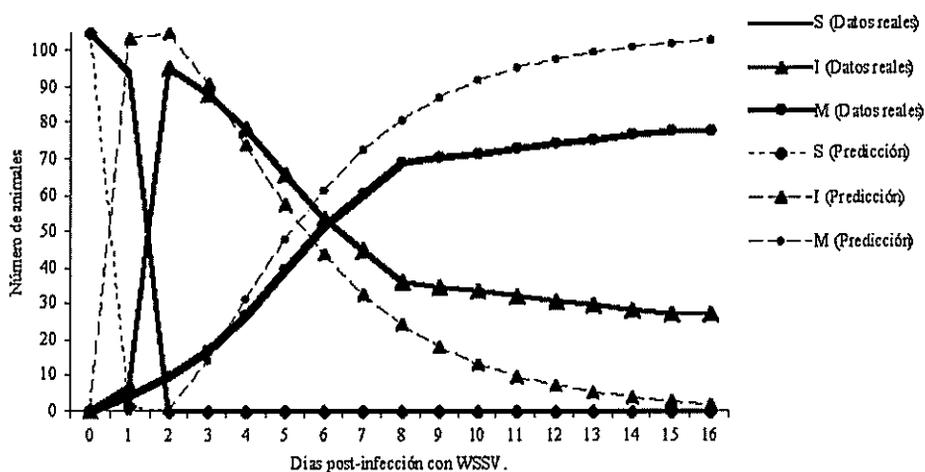


Figura 21. Datos reales del experimento de Sonnenholzner *et al.*, (2002) mostrando el desarrollo de la epidemia de WSD durante 16 días de post-infección en el tratamiento 27-27-27 °C y predicciones del modelo epidémico de Soto y Lotz (2002) corrido a 27 °C con los mencionados datos iniciales. S = Susceptibles; I = Infectados; M = Muertos.

La complejidad de los sistemas biológicos hace que el mejoramiento de los modelos epidémicos sea un esfuerzo dialéctico que necesita los aportes de diversos campos de especialización, permitiendo que el ajuste de las predicciones a los eventos de la dinámica de las enfermedades en los cultivos sea mayor a medida que se incrementan los conocimientos sobre los patógenos, sus hospederos y la dinámica de la enfermedad. El resultado de este trabajo es una contribución al mejoramiento de los conocimientos sobre la dinámica de WSD, con relación a varios de los determinantes de la enfermedad más importantes. El modelo desarrollado en tesis es factible de mejorarse ampliamente para que se convierta en un instrumento predictivo mucho más útil para el manejo de los cultivos de camarón.

## 6 CONCLUSIONES

1. No se obtuvo la LD<sub>50</sub> y LD<sub>90</sub> en desafíos con WSSV por vías naturales.
1. La mortalidad en los desafíos colectivos estuvo estrechamente relacionada con la carga viral con la que se realizó el desafío y fue independiente de la ruta de transmisión.
1. En las infecciones individuales, las mortalidades fueron bajas, sin importar que la carga viral sea elevada. Esto, se observó a ambas rutas de transmisión viral (ingestión e inmersión).
1. La mortalidad en los desafíos colectivos fue cuantitativamente mayor que en los desafíos individuales, debido a las reinfecciones por efecto de una mayor transmisión secundaria vía ingestión o por inmersión.
1. La infección de los camarones *P. vannamei* susceptibles a WSSV estuvo significativamente relacionada con la ruta de infección empleada y la temperatura del medio, e independiente de la carga viral.
1. El menor número de infecciones se obtuvo a la temperatura de 31 °C, a través de la ingestión a las concentraciones virales de  $2.93 \times 10^7$  y  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales por individuo.

1. El mayor número de individuos infectados se obtuvo a 29 °C, con la concentración de  $1.35 \times 10^8$  réplicas virales / individuo a través de la inmersión.
  
1. El paso de los camarones *P. vannamei*, infectados, al estado de enfermedad estuvo significativamente relacionado con la temperatura del medio y la ruta de infección.
  
1. El menor número de enfermos se obtuvo a la temperatura de 33 °C, a través de la ingestión a las concentraciones virales de  $2.93 \times 10^7$  y  $6.75 \times 10^6$  réplicas virales por individuo.
  
1. El mayor número de individuos enfermos se obtuvo a 29 °C, con la concentración de  $1.35 \times 10^8$  réplicas virales / individuo a través de la inmersión.
  
1. La temperatura y la concentración viral influyeron significativamente sobre la supervivencia.
  
1. La mayor mortalidad se produjo a la temperatura de 29 °C y a la concentración viral equivalente  $1.35 \times 10^8$  réplicas virales / individuo, independientemente de la ruta de transmisión viral.
  
1. La mortalidad a 33 °C fue mínima o no existió, a todas las concentraciones empleadas.

1. El modelo presentó una aceptable habilidad predictiva determinada por valores relativamente altos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos.
1. El modelo desarrollado es capaz de simular una epidemia en función de la temperatura y carga viral para dos rutas de transmisión viral.

## 7. RECOMENDACIONES

1. La relación de los niveles de infección en los tejidos de los animales desafiados con respecto a las variables manejadas es una importante ruta de investigación que queda abierta posterior a este trabajo.
2. El efecto de la hipertermia en el rango entre 31 a 33 °C debe ser estudiado en profundidad, para determinar los valores de temperatura que presentan verdaderos efectos protectores para el cultivo de camarón.
3. Desarrollar estrategias de control de WSD conducidas a decrecer la contagiosidad a nivel de casos secundarios y terciarios y a decrecer la carga viral de las larvas sembradas en la piscina.
4. Continuar el desarrollo del modelo dinámico de la epidemia de WSD dada su aplicación e importancia.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abbey, H. 1952. An examination of the Reed-Frost theory of epidemics. *Human Biology* 24:201–233. in : Lotz, M. J. and A. M. Soto. 2002. Model of White Spot Syndrome Virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50:199-209.
- Adams, J. R. and J. R. Bonami. 1991. *Atlas of Invertebrate Viruses*. CRC Press. Boca Raton, FL. USA.
- Anderson, I. G., M. N. Shamsudin, M. Shariff, and G. Nash. 1988. Bacterial septicaemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fish Science* 2:93–108.
- Anderson, R. and R. May. 1979. Population biology of infectious diseases: Part 1. *Nature* 280:361-461.
- Arimoto, M., T. Yamazaki, Y. Mizuta, and I. Furusawa. 1995. Characterization and partial cloning of the genomic DNA of a baculovirus from *Penaeus japonicus* (PjNOB = BMNV). *Aquaculture* 132:213-220.
- Bayot, B., de Blas I, and Ruiz-Zarzuola I. 2004. Risk factors associated with disease outbreaks in *Litopenaeus vannamei* shrimp farms. Extended abstracts and short communications of contributions presented at the International Conference. *Aquaculture Europe 2004*. Special publication No. 34. October 2004, Barcelona – Spain.
- Bayot, B., de Blas I, Gullian M, Sonnenholzner S, Ollevier F, and Calderón, J. 2005. Effect of pond parceling on *Litopenaeus vannamei* survival and white spot syndrome virus prevalence. Submitted in *Diseases of Aquatic Organisms*.

- Bell, T. A. and D. V. Lightner. 1988. A handbook of normal shrimp histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA.
- Black, F. L., and B. Singer. 1987. Elaboration versus simplification in refining mathematical models of infectious disease. *Annual Review of Microbiology*. 41:677-701. In: Lotz, M. J, and A. M. Soto. 2002. Model of white spot Syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50:199-209.
- Blake, G. S. 2004. "Contribución al estudio de los mecanismos celulares empleados por el camarón *Litopenaeus vannamei* para eliminar el virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV)". Tesis de Maestría. CENAIM. Guayas. Ecuador.
- Bonami J. R., K. W. Hasson, J. Mari, B. T. Poulos, and D. V. Lightner. 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *Journal of General Virology* 78:313-319.
- Bonami, J. R. and D. V. Lightner. 1991. Unclassified viruses of crustacea, 597-622. in. Sangamaheswaran, A. P and M. J. P. Jeyasaelan. 2001. White Spot Viral Disease in Penaeid Shrimp A Review. *Naga. The ICLARM Quarterly*. Vol. 24. Julio-Diciembre.
- Bonami, J. R., D. V. Lightner, R.M. Redman and B.T. Poulos. 1992. Partial characterization of a togavirus (LOVV) associated with histopathological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimps. *Diseases of Aquatic Organisms* 14:145-152.
- Bonami, J. R., L. D. Bruce, B. T. Poulos, J. Mari, and D. V. Lightner. 1995. Partial characterizations and cloning of the genome of PvSNPV (= BP-type virus) pathogenic for *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:59-66.

- Bonami, J.R., M. Brehelin, J. Mari, B. Trumper, and D.V. Lightner. 1990. Purification and characterization of IHNV virus of penaeid shrimps. *Journal of General Virology* 71:2657-2664.
- Boonyaratpalin, S., K. Supamattaya, J. Kasornchandra, S. Direkbusaracom, U. Aekpanithanpong, and C. Chantanachooklin. 1993 Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of Yellow Head Disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Gyobyo Kenkyu* 28(3):103–109.
- Brock, J. A., L. K. Nakagawa, H. Van Campen, T. Hayashi, and S. Teruya. 1986. A record of Baculovirus penaeid from *Penaeus marginatus* Randall in Hawaii. *Journal of Fish Diseases* 9:353-355.
- Brock, J. A., R. B. Gose, D. V. Lightner, and K. W. Hasson. 1997. Recent developments and an overview of Taura Syndrome of farmed shrimp in the Americas. 275-283 en: *Diseases in Asian Aquaculture III, a Proceedings from the Aquatic Animal Health Section FHS/WAS'96 Meeting, Bangkok, Thailand. Jan. 29-Feb. 2, 1996.*
- Cadena, 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, and V. Alday de Graindorge. 1999. Monitoreo del Virus de la Mancha Blanca en Ecuador. *El Mundo Acuicola* 5:211 – 214.
- Cane, P., A. Cook., P. Ratcliffe, D. Mutimer, and D. Pillay. 1999. Use of real time PCR and fluorimetry to detect lamivudine resistance-associated mutations in hepatitis B virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:1600–1608.

- Chamberlain, G. 2001. Cultivo sostenible del camarón: mitos y realidades. [en línea]. INFOPECA Internacional 13 [ref. 2004-12-20]. Disponible en Web: [www.infopesca.org/articulos/art06.pdf](http://www.infopesca.org/articulos/art06.pdf)
- Chang, P. S., C. F. Lo, G. H. Kou, and S. N. Chen. 1993. Purification and amplification of DNA from *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). *Journal of Invertebrate Pathology* 62:116-120.
- Chantanachookin, C., J. Boonyaratpalin, S. Kasornchandra, U. Direkbusarakom, K. Ekpanithanpong, S. Supamataya, S. Sriurairatana, and T.W. Flegel. 1993. History and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by “yellow head” disease. *Diseases of Aquatic Organisms* 17:145-157.
- Chen, J., C. Lin, M. N. Ting, Y. Lin, and J. N. 1995. Survival, haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinities and temperature levels. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part. A* 110:253–258.
- Chou, H. Y., C. Y Huan, C. F. Lo, and G. H. Kou. 1998. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. *Aquaculture* 164:263-276.
- Chou, H. Y., C. Y. Huan, C. H. Wang, H. C. Chiang, and C. F. Lo. 1995. Pathogenicity of baculovirus infection causing White Spot Syndrome in cultured penaeid shrimps in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:165-173.
- Corbel, V., Z. Zuprizal, C. Shi, H. Sumartono, J. M. Arcier, and J. R. Bonami. 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Fish Diseases* 24:377-382.
- Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones (CORPEI). 2001. [en línea] [ ref 2005 - 08 - 03] Product profile Tilapia: “Expansion of Ecuador’s Export

Commodities". Disponible en:

Web: [www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/CORPEI/tilapia.pdf](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/CORPEI/tilapia.pdf).

**Couch, J. A.** 1974a. Free and occluded virus similar to Baculovirus in hepatopáncreas of pink shrimp. *Nature* 247 (5438):229-231.

**Couch, J. A.** 1974b. An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. *Journal of Invertebrate Pathology* 24:311-331.

**de Blas, I., I. Zarzulela, R. Zarzuela, C. Ferreira, and B. Bayot.** *In press*. Elementos de Epidemiología cualitativa. en: Manual de Epidemiología Veterinaria. Consulta 2005-01-07, 37-49.

**de la Vega, E., M. R. Hall, B. M. Degnan, and K. J. Wilson.** 2005. Short – term hyperthermic treatment of *Penaeus monodon* increases expression of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of gill associated virus (GAV). *Aquaculture* 253:82-90.

**De Jong, M. C. M.** 1995. Mathematical modelling in veterinary epidemiology: why model building is important. *Preventive Veterinary Medicine* 25:183–193.

**Dohoo, I., W. Martin, and H. Stryhn.** 2003. *Veterinary Epidemiologic Research*. AVC Inc. Charlottetonw. Prince Eduar Islan. Canada. .

**Durand, S., D. V. Lightner, L. M. Nunan, R. M. Redman, J. Mari, and J. R. Bonami.** 1996. Aplication of gene probes as diagnostic tool for the white spot baculovirus (WSSV) of penaeid shrimps. *Diseases of Aquatic Organisms* 27:59-66.

**Durand, S., D. V. Lightner, R. M. Redman, and J. R. Bonami..** 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* 29:205-211.

- Durand, S, V. and 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., K. F. T. Tang, and D. V. Lightner. 2000. Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *Journal of Aquatic Animal Health* 12:128-135.
- Durant, S. V., R. M. Redman, L. L. Mohnney, K. Tang, J. R. Bonami, and D. V. Lightner. 2003. Qualitative and quantitative studies on the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSV. *Aquaculture* 216:9 –18.
- Echeverría, F., V. Otero, F. Cornejo, and J. Rodríguez. 2002. WSSV y ciclo de muda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *El mundo acuícola* 8 (1):43-46.
- Flegel, T. W. 1997. Special topic review: major viral disease of the black tiger prawn *Penaeus monodon* in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13:433-442.
- Flegel, T. W., S. Boonyartatpalin, and B. Withyachumnarnkul.. 1998. Current status research on yellow head virus and white spot virus in Thailand. 285-295 en: Flegel, T. W. and I. H. MacRae. *Diseases in Asian Aquaculture*, Asian Fisheries Society, China.
- Flegel, T. W., S. Sriurairatana, C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim, and B. Withyachumnarnkul. 1995 Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. in: Browdy, C. L., Hopkins. J. S. (eds) *Swimming through troubled waters. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.USA.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2003. Review of state of world Aquaculture. Fisheries Circular No. 886 Rev. 2, Rome, Italia.

- Fraser, C. A. and L. Owens. 1996. Spawner-isolated mortality virus from Australian *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 27:141-148.
- Gerbier, G., J. N. Bacro, R. Pouillot, B. Durand, F. Moutou, and J. Chadoeuf. 2002. A point pattern model of the spread of foot – and – mouth disease. *Preventive Veterinary Medicine* 56:33–49.
- Granja, C., L. F. Aranguren, O. M. Vidal, L. Aragón, and M. Salazar. 2003. Does hypertermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 54:73-78.
- Guevara, T. M. L. .2003. Susceptibilidad de juveniles de *Penaeus vannamei* al virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) relacionada con la edad (3 y 4 meses), el estadio de muda y temperatura (27 y 33°C). Tesis de Maestría. CENAIM. Guayas. Ecuador.
- Halloran, M. E. 1998. Concepts of infectious disease epidemiology. in: Rothman, K. J, and S. Greenland. *Modern epidemiology*, 2nd edition. Liincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania. USA. 529-554.
- Hasson, K. W., D. V. Lightner, B. T. Poulos, R. M. Redman , B. L. White, and J. A. Brock.. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:115–126.
- Henning, O. L. and E. R. Andreatta. 1998. Effect of temperature in an intensive nursery system for *Penaeus paulensis* Perez Farfante. *Aquaculture* 164:167–172.
- Hethcote, H. 2000 The mathematics of infectious diseases 42 (4):599-653.
- Huang, J., J. Yu, X. L. Song, J. Kong, and C. H. Yang. 1995. Studies on fine structure, nucleic acid, polypeptide and serology of hypodermal and haematopoietic necrosis baculovirus of penaeid shrimp. *Marine Fisheries. Research* 16:11-23.

- Innis, M. A, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc. Berkeley, CA. USA.
- Jiravanichpaisal, P., E. Bangyeekhun, K. Söderhäll, and I. Söderhäll. 2001. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 47:151-157.
- Johnson, P. T. 1983. Diseases caused by viruses, Rickettsiae, bacteria and fungi. In: Provenzano AJ Jr, Bliss DE (eds) *The biology of Crustacea*, Vol 6. Pathobiology. Academic Press, New York. USA.
- Jory, D. E. and Dixon H. M. (1999) Shrimp white spot virus in the hemisphere. *Aquaculture Magazine* 25:83-91.
- Juárez, G. A. and I. S. Navarro. 1998. Epidemiología matemática. FAC Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Catamarca.[en línea][ref. 2004-12-20]. Disponible en Web: [www.catunesco.upc.es/ads/contagio.doc](http://www.catunesco.upc.es/ads/contagio.doc)
- Kasornchandra, J., S. Boonyaratpalinn, R. Khongpradit, and U. Akpanithanpong. 1995. A bacilliform virus, the causative agent of red disease with white patch in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Technical Paper N°3, National Institute of Coastal Aquaculture, Kaoseng, Songkla, Thailand.
- Kimura, H., M. Morita, Yabuta. Y, Kuzushima. K, Kato. K, Kojima. S, Matsuyama. T and Morishima. T. 1999. Quantitative analysis of Epstein–Barr virus load by using a real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 132–136.
- Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraoka, and K. Inouye.. 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. *Fish Pathology* 31:93-98.

- Kinne, O. 1980. Diseases of Marine Animals. General Aspects, Protozoa to Gastropoda. John Wiley and sons, New York, USA.
- Koella, J. and R. Antia. 2003 Epidemiologicas models for the spread of anti-malarial resistance. Malaria journal 2:3.[Consulta en Linea] Disponible en : <http://www.malariajournal.com/content/2/1/3>.
- Lavilla-Pitogo, C. R., M. C. L. Baticados, E. R. Cruz-Lacierda, and L. D. Dleapena . 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in Philiines. Aquaculture 91:1–13.
- Le Moullac, G., M. Le Groumellec, D. Ansquer, S. Froissard, and 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 Inmmunology 7:227-234, in: Guevara, T. M. L. 2003. Susceptibilidad de juveniles de *Penaeus vannamei* al virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) relacionada con la edad (3 y 4 meses), el estadio de muda y temperatura (27 y 33°C). Tesis de Maestria.CENAIM, Guayas. Ecuador.
- Leutenegger, Ch. M. 2001. The real – time TaqMan PCR and applications in Veterinary Medicine. Veterinary Sciences Tomorrow. Issue 1. January.
- Lewin, S. R., M. Vesanen, L. Kostriskis, A. Hurley, M. Duran, L. Zhang, D. D. Ho, and M. Markowitz. 1999 Use of real time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. Journal of Virology 73: 6099–6103.
- Lightner, D. V., R.M. Redman, and T. A. Bell. 1983. Infectious hypodermal and haematopietic necrosis (IHHN), a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. Journal of Invertebrate Pathology 42:62-70.

- Lightner, D. V.** 1985. A review of the diseases of cultured penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. in: Taki, Y., J. Primavera, J. A. Llobrera. Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps. Aquaculture Department of SEAFDC, Iliolo, Philippines, Congress on Marine Science and Technology, Honolulu, HI.
- Lightner, D. V. and R. M. Redman.** 1985. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* 45:47-53.
- Lightner, D. V.** 1988. Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. in: Sindermann, C. J., D. V. Lightner. Disease diagnosis and control. North American marine aquaculture. Elsevier, Tokyo, Japan.
- Lightner, D. V. and R. M. Redman.** 1990. Penaeid virus diseases of the shrimp culture industry of the Americas. in: Fast, A.W., L.J. Lester. Culture of marine shrimp: principles and practises. Chapter 26. Elsevier, Amsterdam, p 569–588 *Asian Fish Science* 10:355–370.
- Lightner, D. V., T. A. Bell, R. M. Redman, L. L. Mohney, J. M. Natividad, A. Rukyani, and A. Poernomo.** 1992. A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indopacific. in: Shariff, M., R. P. Subasinghe, J. R. Arthur. Diseases in Asian aquaculture 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Filipinas.
- Lightner, D. V. and R. M. Redman.** 1993. A putative iridovirus from the penaeid shrimp *Protrachypene precipua* Burkenroad (Crustacea: Decapoda). *Journal of Invertebrate Pathology* 62:107-109.
- Lightner, D. V., R. M. Redman, K. W. Hasson, and C. R. Pantoja.** 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultra structure. *Diseases of Aquatic Organisms* 21:53-59.

- Lightner, D. V. (ed) 1996 A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA *Toxicon* 34:857–869.
- Lightner, D. V. 1996. Epizootiología y diseminación de dos virus de los camarones peneidos en las Américas y su impacto sobre el comercio internacional. Review of Science and technology. *Off. int. Epiz*, 1996, 15 (2):579-602.
- Lightner, D. V., K. W. Hasson, B. L. White, and R. M. Redman. 1998. Experimental infection of Western hemisphere penaeid shrimp with asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *Aquatic Animal Health* 10:271-281.
- Lightner, D. V. and R. M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164:201–220.
- Lightner, D. V. 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *Journal of Allied Aquaculture* 9:27-52.
- Lightner, D. V. and P. Chen. 2000. Enfermedad de las Manchas Blancas. [Consulta en línea][ref 2005 – 5 - 20]. Disponible en Web: <http://www.oie.int>.
- Lightner, D. V. and C. R. Pantoja. 2001. Bioseguridad en el cultivo de camarones.. [consulta en línea] [ref 2005-5-20]. Disponible en la Web: [www.uhh.hawaii.edu/.../USDA\\_Spanish\\_FINAL/Bioseguridad%20en%20el%20Cultivo%20de%20Camarones%20.pdf](http://www.uhh.hawaii.edu/.../USDA_Spanish_FINAL/Bioseguridad%20en%20el%20Cultivo%20de%20Camarones%20.pdf).
- Lo, C. F., J. H. Leu, C. H. Chen, S. E. Peng, Y. T. Chen, C. M. Chou, P. Y. Yeh, C. J. Huang, H. Y. Chou, C. H. Wang, and G. H. Kou. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 25:133-141.

- Lo, C. F., C. H. Ho, S. E. Peng, C. H. Chen, H. C. Hsu, Y. L. Chiu, C. F. Chang, K. F. Liu, M. S. Su, C. H. Wang, and G. H. Kou. 1997a. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms* 27:215-225.
- Lo, C. F., C. H. Ho, C. H. Chen, and K. F. Liu. 1997b. 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* 30:53-72.
- Lo, C. F., H. C. Hsu, M. F. Tsai., C. H. Ho, S. E. Peng, G. H. Kou, and D. V. Lightner. 1999. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome associated virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 35:175-185.
- Lotz, M. J. and A. M. Soto. 2002. Model of White Spot Syndrome Virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei* *Diseases of Aquatic Organisms* 50:199-209.
- Lotz, M. J., M.A. Flowers, and B. Verlee. 2003. A model of Taura syndrome virus (TSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 83:168-176.
- Lu, Y. and P. C. Loh. 1994. Viral structural proteins and genome analyses of the rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS). *Diseases of Aquatic Organisms* 19:187-192.
- Maeda, M., H. Saitoh, E. Mizuki, T. Itami, and M. Ohba. 2003. Replication of white spot syndrome virus in ovarian primary cultures from the Kuruma shrimp, *Marsopenaeus japonicus*. *Journal of Virological Methods* 116 (2004):89 - 94.
- Maldonado, M. 2003. Respuesta inmunitaria en familias de *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones de infección con WSSV y el efecto de la adición de  $\beta$ -1,3 glucanos. Tesis de grado. CENAIM. Guayas. Ecuador.

- Maldonado, M., J. Rodríguez, and I. de Blas. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *Revista AquaTIC* 21:78-91.
- Mari, J., J. R. Bonami, and D. V. Lightner. 1998. Taura syndrome of Penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Diseases of Aquatic Organisms* 33:11-17.
- Mari, J., J. R. Bonami, B. Poulos, and D. V. Lightner. 1993. Preliminary characterization and partial cloning of the genome of a baculovirus from *Penaeus monodon* (PmSNPV = MBV). *Diseases of Aquatic Organisms* 16:207-215.
- Martin, S. W., A. H. Meek, and Willeber. P. 1988. *Veterinary Epidemiology. Principles and Methods*. Iowa State University Press / Ames.
- May, R. and M. Anderson. . 1990 Parasite-host coevolution. *Parasitology* 100:S89-S101.
- Melena, J., B. Bayot, I. Betancourt, Y. Amano, F. Panchana, V. Alday de Graindorge, J. Calderón, S. Stern, Ph. Roch, and J. R. Bonami. Does pre-exposure to IHHNV or to inactivate WSSV confer a protection against white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus vannamei* post-larvae? *Journal of Fish Diseases*. In Press.
- Mohan, C. V., P. M. Sudha, K. M. Shankar, and A. Hegde. 1997. Vertical transmission of white spot baculovirus in shrimps – A possibility? *Current Science* 73(2):109-110.
- Momoyama, K. and T. Sano. 1989. Developmental stages of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* Bate, susceptible to baculoviral mid-gut gland necrosis (BMN) virus. *Journal of Fish Disease* 12:585-589.

- Momoyama, K., H. Hiraoka, H. Nakano, H. Koube, K. Inouye, and N. Oseko. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* in Japan in 1993: histopathological study. *Fish Pathology* 29:141-148.
- Murray, A. G. and D. Gaughan. 2003. Using an age-structured model to simulate the recovery of the Australian pilchard (*Sardinops sagax*) population following epidemic mass mortality. *Fisheries research* 60:415-426.
- Nadala, E. C. B., Y. Lu, P.C. Loh, and J. A. Brock. 1992. Infection of *Penaeus stylirostris* (Boone) with a rhabdovirus from *Penaeus sp.* Gyobyō Kenkyū. *Fish Pathology* 27:143-147.
- Nakano, H., H. Koube, S. Umezawa, K. Momoyama, M. Hiraoka, K. Inouye, and N. Oseko. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathology* 29:135-139.
- Nistche, A., N. Steuer, C. A. Schmidt, O. Landt, and W. Siegert. 1999. Different real time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clinical Chemistry* 45:1932-1937.
- Nunan, L. M., B. T. Poulos, and D. V. Lightner. 1998. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 34:87-91.
- Nunan, L. M., B. T. Poulos, and D. V. Lightner. 2000. Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Marine Biotechnology* 2:319-328.
- Ogut, H. 2001. Modelling of fish disease dynamics. A next approach to an old problem. *Turkish Journal of fisheries and Aquatic Sciences* 1:67-74.

- Owens, L., S. De Beer, and J. Smith. 1991. Lymphoidal parvovirus-like particles in Australian penaeid prawns. *Diseases of Aquatic Organisms* 11:129-134.
- Owens, L. 1993. Description of the first haemocytic rodshaped virus from a penaeid prawn. *Diseases of Aquatic Organisms* 16:217–221.
- Pantoja, C. R. and D. V. Lightner. 2003. Similarity between the Histopathology of White Spot Syndrome Virus y Yellow Head Syndrome Virus y its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. *Aquaculture* 218:47–54.
- Perkin, E. 1992. DNA Thermal Cycler 480 User's Manual. The Perkin Elmer Corp. Norwalk, CT.
- Prior, S., C. L. Browdy, E. F. Shepard, R. Laramore, and P. G. Parnell. 2003. Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 54:89- 96.
- Reno, P. 1998. Factors involved in the dissemination of disease in fish populations. *Journal of aquatic animal health* 10:160-171.
- Rodriguez, J., B. Bayot, Y. Amano, F. Panchana, I. de Blas, V. Alday, and J. Calderón. 2003. 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.
- Ryncarz, A. J., J. Goddardet, A. Wald, M. L. Huang, B. Roizman, and L. Corey.. (1999) Development of a high-throughput quantitative assay for detecting *Herpes simplex* virus DNA in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 37:1941–1947.

- Sahul, Hameed. A. S., M. X. Charles, and M. Anilkumar. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 183:207 – 213.
- Sangamaheswaran, A. M, and M .J. P. Jeyaseelan. 2001. White spot viral disease in penaeid shrimp – A review. *Naga, The ICLARM Quarterly* 24 (3-4):16-22.
- Selye, H. 1936. A syndrome produced by diverse innocuous agents. *Nature* 138:32.
- Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría, and J. Calderón. 2002. Supervivencia y respuesta immune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperatures. *El Mundo Acuicola* 8 (1):50-56.
- Soto, A. M. and J. Lotz. 2001 Epidemiological parameters of white spot syndrome virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. *Journal of Invertebrate pathology* 78:9-15.
- Soto, A. M., V. R. Shervette, and J. Lotz. 2001. Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) to *Litopenaeus vannamei* from infected cephalothorax, abdomen, or whole shrimp cadaver. *Diseases of Aquatic Organisms* 45:81-87.
- Soto, A. M. and J. Lotz. 2003. Transmission Virulence, and Recovery coefficients of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Taura Syndrome Virus (TSV) Infections in Kona Stock *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Aquatic Animal Health* 15:48-54.
- Spann, K. M., J. E. Vickers, and R. J. G. Lester. 1995. Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 26:127-134.
- Spann, K. M., J. A. Cowley, P. J. Walker, and R. J. G. Lester. 1997. A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Disease of Aquatic Organisms* 31:169–179.

- Subasinghe, R.** 1997. Fish health and quarantine. in: Review of the state of world aquaculture. FAO Fisheries Circular. No. 886, Rev. 1. Rome, FAO. 1997.
- Supamattaya, K., R. W. Hoffmann, S. Boonyaratpalin, and P. Kanchanaphum.** 1998. experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes sp.* Diseases of Aquatic Organisms 32:79-85.
- Takahashi, Y., T. Itami, M. Kondo, M. Maeda, R. Fujii, S. Tomonaga, K. Supamattaya, S. Boonyaratpalin.** 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). Fish Pathology 29:121-125.
- Tang, K. and D. V. Lightner.** 1999. A yellow-head virus gene probe: application to in situ hybridisation and determination of its nucleotide sequence. Diseases of Aquatic Organisms 35:165-173.
- Tang, K, and D. Lightner.** 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. Aquaculture 189:11-21.
- Tan, L.T., S. Soon, K. L. Lee, M. Shariff, M. D. Hassan, and A. R Omar.** 2001. Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius using competitive polymerase chain reaction. Journal of Fish Diseases 24:315-323.
- Thrusfield, M.** 1995. Veterinary Epidemiology. Ed Blackwell Science Ltd. Second Edition 483.
- Tsing, A. and J. R Bonami.** 1987. A new virus disease of the tiger shrimp *Penaeus japonicus* Bate. Journal of Fish Diseases 10:139-141.

- van Hulten, M. C., M. Westenberg, S. D. Goodall, and J. M. Vlak. 2000. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology* 266:227-236.
- Venkaramiah, A., G. J. Lakshimi, and G. Gunther. 1974. Studies on the effect of salinity and temperature on the commercial shrimp *Penaeus aztecus*, with especial regard to survival limits, growth, oxygen consumption and ionic regulation. in: Zuñiga, O., R. Ramos, R. Wilson, and E. Retamales. 1990. Efecto de la densidad y temperatura en el cultivo de *Penaeus vannamei* (Boone 1931) (Crustacea, Penaeidae). *Revista de Biología Marina* 25(2): 121 – 134.
- Vincent, A. and J. M. Lotz. 2006. A model of necrotizing hepatopancreatitis-bacterium (NHPB) epidemics in its shrimp host *Litopenaeus vannamei*. The shrimp sessions at aquaculture America 2006. Las Vegas, Nevada, USA.
- Vidal, O. M., C. B. Granja, J. A. Brock., and M. Salazar. 2001. A profound effects of hipertermia on the survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected whit White Spot Syndrome Virus. *Journal of the World Aquaculture Society*. 4:364-362.
- Wang, C. H., C. F. Lo, J. H. Leu, C. M. Chou, P. Y. Yeh, H. Y. Chou, M. C. Tung, C. F. Chang, M. S. Su. and G. H. Ko.. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:239-242.
- Wang, S. Y., C. Hong, and J. M. Lotz. 1996. Development of a PCR procedure for the detection of Baculovirus penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 25:123-131.
- Wang, C.S., K. F. J. Tang, G. H. Kou, and S. N. Chen. 1997. Light and electron microscopic evidence of white spot disease in the giant tiger shrimp, *Penaeus*

- monodon* (Fabricius), and the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate), cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases* 20:323-331.
- Wang, Y. C., C. F. Lo, P. S. Chang, and G. H. Kou. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture* 164:221-231.
- Wang, Q., B. L. White, R. M. Redman, and D. V. Lightner. 1999a. *Per os* challenge of *Litopenaeus vannamei* post larvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture* 170:179-194.
- Wang, Y.G., M. D. Hassan, M. Shariff, S. M. Zamri, and X. Chen. 1999b. 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.
- Wongteerasupaya, C., S. Wongwisansri, V. Boonsaeng, S. Panyim, P. Pratanpipat, G.L. Nash, B. Withyachumnarnkul, and T. W. Flegel. 1996 DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridisation with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. *Aquaculture* 143:23-32.
- Wongteerasupaya, C., J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, and T. W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 21:69-77.
- Wongteerasupaya, C., V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, and T. W. Flegel. 1997. Detection of yellow-head virus

- (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Diseases of Aquatic Organisms* 31:181-186.
- Wu, J. L., A. Namikoshi, T. Nishizawa, K. Mushiake, K. Teruya, and K. Muroga.** 2001. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Diseases of Aquatic Organisms* 47:129-135.
- Wu, J. L., T. Nishioka, K. Mori, T. Nishizawa, and 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.
- Yoganandhan, K., R. B. Narayanan, and A. 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.

## 9. ANEXOS

### ANEXO I. PROTOCOLO CENAIM DE MANTENIMIENTO DE POSTLARVAS DE *PENAEUS VANNAMEI* EN CONDICION DE SALUD SPECIFIC PATHOGEN FREE (SPF)

#### **Exterior del set**

1. Desinfectar el calzado de uso diario sumergiéndolo en el pediluvio ubicado a la entrada del set 16.
2. Apagar la lámpara de luz ultravioleta (UV) presente al interior del área de cambio de calzado.
3. Ingresar al set.

#### **Interior del set**

1. Cambiar el calzado diario por botas en el área destinada para este propósito.
2. Retirar la cortina de plástico negro que separa al área de cambio de calzado de los tanques ubicados (4) al interior del set.
3. Lavar con jabón líquido y agua dulce (toma ubicada en la pared opuesta a la entrada) las manos y brazos hasta la altura del codo.
4. Lavar con agua dulce el filtro y la manguera de 1plg que se emplean para hacer el sifón de cada tanque.
5. Lavar con agua dulce la manguera de 3/8plg para hacer el sifón de los restos de alimento que se acumulan en el fondo de los tanques.

6. Lavar con agua dulce un colector de larvas (balde amarillo con malla en el costado) para recolectar en él las larvas de camarón durante el proceso de sifón de los restos de alimento.
7. Introducir el filtro y la manguera en cada tanque y realizar el sifón, eliminando al menos el 40 % del volumen de agua contenido originalmente.
8. Ingresar el agua de mar tratada (filtrada y esterilizada por UV) para recuperar el volumen perdido por el sifón.
9. Enjuagar con abundante agua dulce los materiales descritos después de limpiar cada tanque y al culminar el trabajo.
10. Alimentar cada tanque con Ziegler a razón de 1 cucharada/ración/tanque, a partir de las 09h00 cada 4 horas.
11. Cambiar las botas por el calzado diario y extender la cortina plástica.
12. Salir del set y encender la luz ultravioleta.