

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Detección de agentes patógenos en el ambiente de cultivo del
camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) a través de la
secuenciación masiva de nueva generación**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Mriya Michele Celeste López Galicia

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Mriya Michele Celeste López Galicia

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Roberto Cruz Flores
Codirector de tesis

Dra. Laurence Stéphanie Mercier
Codirectora de tesis

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez

Dra. Ernestina Castro Longoria

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Copyright © 2024, Todos los Derechos Reservados, CICESE
Prohibida su reproducción parcial o total sin la autorización por escrito del CICESE

Resumen de la tesis que presenta **Mriya Michele Celeste López Galicia** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Detección de agentes patógenos en el ambiente de cultivo del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) a través de la secuenciación masiva de nueva generación

Resumen aprobado por:

Dr. Roberto Cruz Flores
Codirector de tesis

Dra. Laurence Stéphanie Mercier
Codirectora de tesis

El camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) es una especie acuícola de alto valor económico en México y a nivel global. Las elevadas tasas de producción, prácticas inapropiadas de cultivo y algunos factores ambientales influyen en la aparición y diseminación de enfermedades que afectan la crianza de este crustáceo. Las técnicas moleculares, como PCR y qPCR, se utilizan para la identificación de agentes patógenos. Estas técnicas facilitan la detección y cuantificación de un agente infeccioso a partir de una muestra que contiene sus ácidos nucleicos. Sin embargo, los cultivos camaronícolas pueden ser infectados por más de un patógeno y estas técnicas moleculares no están diseñadas para identificar simultáneamente a todos los patógenos presentes en una muestra. Recientemente, la tecnología de secuenciación masiva de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) ha captado la atención de los patólogos, debido a que facilitan la obtención de los genomas de toda una comunidad microbiana a partir de una muestra de ADN o ARN ambiental (agua, sedimento, etc.). La NGS tiene un alto potencial como herramienta para la identificación de agentes patógenos. El objetivo de este proyecto fue evaluar la utilidad de la NGS para identificar ADN de agentes patógenos asociados con el camarón *P. vannamei*, a partir de muestras de agua y sedimento colectadas en los estanques de cultivo de dos granjas camaronícolas del Noroeste de México. Se identificó por PCR convencional al virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), *Baculovirus penaei* (BP), *Monodon baculovirus* (MB), virus de los decápodos 1 (DIV1), a *Candidatus Hepatobacter penaei* causante de la necrosis hepatopancreática (NHP) y, a *Vibrio parahaemolyticus* causante de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND). La identidad de estos patógenos fue corroborada por Secuenciación Sanger. Mediante NGS se confirmó la presencia de AHPND. Se especula que las concentraciones bajas de ADN obtenidas de agua y sedimento en combinación con la utilización de reactivos para la amplificación genómica total pudieron haber inferido en los resultados. Sin embargo, el presente trabajo es el primero en utilizar un protocolo universal de PCR convencional para la detección de múltiples patógenos en comparación con NGS.

Palabras clave: Técnica de detección, agente patógeno, camarón, secuenciación de masiva de nueva generación, ADN ambiental.

Abstract of the thesis presented by **Mriya Michele Celeste López Galicia** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Detection of pathogens in the culture environment of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) through next-generation sequencing

Abstract approved by:

Dr. Roberto Cruz Flores
Thesis Codirector

Dr. Laurence Stéphanie Mercier
Thesis Codirector

The Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) is an aquaculture species of high economic value in Mexico and globally. High production rates, inappropriate farming practices, and various environmental factors contribute to the emergence and spread of different diseases that affect the cultivation of this crustacean. Molecular techniques, such as PCR and real-time qPCR, are conventionally used for the diagnosis of pathogenic agents. These techniques facilitate the identification and quantification of an infectious agent from a sample containing its nucleic acids. However, shrimp farms can be infected by more than one microorganism, and these molecular techniques are not designed to simultaneously identify all the pathogenic agents present in a sample. Recently, next-generation sequencing (NGS) technology has caught the attention of pathologists because it enables the acquisition of whole microbial community genomes from environmental DNA or RNA samples (water, sediment, etc.). NGS has significant potential as a tool for pathogen detection. The objective of this project was to evaluate the sensitivity of next-generation sequencing for identifying DNA pathogens infecting *P. vannamei* shrimp, based on water and sediment samples collected from the cultivation ponds of two shrimp farms in Northwest Mexico. By conventional PCR we detected the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), decapod iridescent virus 1 (DIV1), *Baculovirus penaei* (BP), *Monodon baculovirus* (MB), *Candidatus Hepatobacter penaei*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis (NHP-B) and *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). The identity of these pathogens was confirmed by Sanger sequencing. Using NGS, only the presence of AHPND could be confirmed. It is speculated that the low DNA concentrations obtained from water and sediment samples, combined with the use of reagents for whole genomic amplification, may have limited the results of NGS. However, this study is the first to use a universal conventional PCR protocol for the detection of multiple pathogens.

Keywords: Detection technique, pathogen agent, shrimp, next-generation sequencing, environmental ADN.

Dedicatoria

A mi persona, por su autenticidad y determinación

A mis padres, que me formaron como individuo

A mis hermanas, que me enseñaron a creer en mí misma

A mi Zeni, por su compañía y amor

**“Quien no encaja en el mundo, está siempre
cerca de encontrarse a sí mismo”**

Hermann Hesse

Agradecimientos

Este trabajo no hubiese sido posible de no haber contado con el apoyo de instituciones y personas para su realización.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías por otorgarme la beca 1136096 como apoyo económico para poder realizar mis estudios de maestría en la ciudad de Ensenada. Así como, al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al posgrado de Acuicultura por aceptarme dentro del programa de posgrado y contribuir a mi formación profesional.

Agradezco especialmente a las granjas camaronícolas, así como, a sus técnicos encargados y personal por recibirnos, permitirnos y apoyarnos en los muestreos de agua y sedimento de los estanques de cultivo. Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S. C. (CIBNOR) por todas las facilidades otorgadas para el uso de sus instalaciones y equipo, así como, facilitarnos el uso de los vehículos para los muestreos de campo.

Al Dr. Roberto Cruz-Flores por ser un asesor y profesor dedicado, por tener paciencia para explicarme y resolver mis dudas como estudiante y tesista. Por tener confianza en mí para colaborar en este proyecto. Por sus consejos y consideración hacia mi persona.

A la Dra. Laurence Mercier, por ser una asesora dedicada, por brindarme su confianza y tiempo para poder realizar este proyecto. Por su paciencia, consejos y consideración hacia mi persona.

Al Dr. Eduardo Quiroz por su interés, disposición y participación como miembro de mi comité sinodal. Así como, en el muestreo de las granjas y en el laboratorio.

Al Dr. Cáceres por su interés, tiempo y paciencia como profesor y miembro de mi comité sinodal. Así como a la Dra. Ernestina Castro por su interés y comentarios que enriquecieron el trabajo de tesis.

A la Dra. Celia Vázquez Boucard por el uso del Laboratorio de Proteómica y Toxicología Genética del CIBNOR.

Agradezco infinitamente a la técnico Gabriela Mendoza Carrión del Laboratorio de Genómica y Bioinformática del CIBNOR, por apoyarnos en la disposición del equipo para la extracción de ADN.

A la técnico Susana Ávila Álvarez del laboratorio de Genética Acuícola, por su disposición para el uso del equipo nanodrop para la cuantificación de ADN.

Al Dr. Ricardo Vázquez y al Dr. Dariel Tovar, por facilitarnos el uso de las instalaciones y equipos de los Laboratorios de Genómica y Bioinformática, y el laboratorio de Fisiología Comparada y Genética Funcional.

Agradezco infinitamente a la técnico Yanet Guerrero del laboratorio de Biología y Patología de organismos acuáticos del CICESE, por apoyarnos en la disposición del material y equipo requerido para trabajar en el laboratorio 207. Así como, profesora de laboratorio para la materia de Patología. Muchas gracias por su paciencia y alegría hacia los estudiantes.

A la técnico Carmen E. Vargas del Laboratorio de Genética Acuícola, Dr. Del Río y Dra. Lafarga por facilitarnos el uso de los equipos de nanodrop, termociclador y fotodocumentador.

Al personal administrativo del posgrado de Acuicultura por facilitarnos todos los trámites y darles seguimiento durante la maestría y proceso de titulación.

A mis amados padres Ma. de los Angeles Galicia Cortés y Rodrigo López Medina, por brindarme su apoyo, confianza, cariño y amor en todo momento. Gracias por creer en mí.

A mis hermosas, neurodivergentes y geniales hermanas Desireth y Florence por su constante apoyo, comprensión, motivación, amor y ejemplo profesional.

A mi precioso gato naranja Zenitsu, por su amor, compañía, travesuras y alegrías.

A mi querido amigo y hermanito Naoki Kawamoto, por su amistad desde el primer momento, confianza, apoyo, lealtad, honestidad, comprensión, alegría, risas, viajes y boberías en este camino de la maestría, así como de la vida.

A mi bebé espacial Guillermo Chin, por tu amistad, cariño, risas, comprensión y tiempo de convivencia incluso estando a la distancia. A la roomie más chida y linda Jocelyne García, por tu apoyo con mi Zeni, comprensión, risas y días embatadas.

A todos mis compañeros de generación del posgrado en Acuicultura por su tiempo, dedicación, esfuerzo y vivencias colectivas durante los cursos en el proceso de la maestría. Mucho éxito a todos ustedes.

A mis queridos amigos de la vida Beto Espinosa, Fer Sandoval, Juan Beltrán, Dulce Ramírez, Criss Tapia, por sus constantes porras, apoyo y cariño a la distancia.

A todas aquellas personas que tuvieron un lugar en mi vida y salieron de ella, gracias por su tiempo y vivencias juntos. A Alexandra Elbakyan por no rendirte y persistir con la lucha por la difusión del conocimiento para todos de forma gratuita.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas.....	xv
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Generalidades del camarón blanco del Pacífico.....	2
1.1.2 Ciclo de producción en la industria camaronícola en México.....	3
1.1.3 Principales agentes patógenos en el cultivo de camarón.....	4
1.1.3.1 El virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV).....	5
1.1.3.2 <i>Baculovirus penaei</i> (BP) y <i>Monodon baculovirus</i> (MB).....	6
1.1.3.3 El virus iridiscente de los decápodos 1 (DIV1).....	6
1.1.3.4 El virus de la mancha blanca (WSSV).....	7
1.1.3.5 Necrosis hepatopancreática (NHP).....	8
1.1.3.6 Necrosis hepatopancreática aguda (AHPND).....	9
1.1.3.7 <i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> (EHP).....	9
1.1.4 Métodos de identificación de agentes patógenos en acuicultura y diagnóstico de enfermedades.....	11
1.1.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	11
1.1.5 Secuenciación masiva de nueva generación (NGS).....	12
1.1.6 Detección de agentes patógenos en muestras de ADN ambiental (ADNe) en organismos acuáticos.....	13

1.2	Justificación	13
1.3	Hipótesis.....	14
1.4	Objetivos	14
1.4.1	Objetivo general	14
1.4.2	Objetivos específicos.....	14
Capítulo 2. Metodología.....		16
2.1	Muestreo.....	16
2.2	Extracción de ADN y cuantificación	17
2.3	Evaluación de la presencia de patógenos de ADN por PCR punto final	18
2.4	Mapeo y anotación	19
Capítulo 3. Resultados.....		20
3.1	Control positivo y negativo de los oligonucleótidos	20
3.2	Detección de ADN de los agentes patógenos por PCR punto final.....	20
3.2.1	Detección de ADN de agentes patógenos en los estanques de cultivo de la granja 1.....	22
3.2.2	Detección de ADN de agentes patógenos en los estanques de cultivo de la granja 2.....	23
3.3	Presencia de los agentes patógenos en las muestras de agua y sedimento.....	25
3.4	Alineamiento de las secuencias obtenidas por el método de Sanger.....	26
3.5	Análisis de BLAST de la Secuenciación Sanger.....	27
3.6	Mapeo de las secuencias obtenidas de la secuenciación masiva	28
Capítulo 4. Discusión.....		37
4.1	Detección de ADN de agentes patógenos en el ambiente	37
4.2	Presencia del ADN de los patógenos detectados	41
4.3	Identificación de AND de patógenos específicos mediante NGS	43

4.4 Importancia del desarrollo de metodologías de diagnóstico de enfermedades para el cultivo camaronícola.....	45
Capítulo 5. Conclusiones	48
Capítulo 6. Recomendaciones.....	49
Literatura citada	50
Anexos.....	63

Lista de figuras

- Figura 1. Ciclo de vida de un camarón peneido (Fuente: Méndez, 1981). Donde 1. Reproducción y desove de huevos en mar, 2. Etapa naupliar, 3. Etapa protozoal, 4. Etapa de mysis, 5. Etapa postlarval, 6. Camarón juvenil en aguas estuarinas y 7. Camarón adulto en aguas oceánicas. 3
- Figura 2. Cuerpos intranucleares eosinófilos Cowdry tipo A (flechas) en tejido conectivo de *Penaeus stylirostris* provocadas por el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética. Tinción H&E, escala de 20 μ m. 5
- Figura 3. *Baculovirus penaei* y *Monodon baculovirus*. A, cuerpos de oclusión tetraédricos intranucleares eosinófilos en las células del hepatopáncreas e intestino medio de *Penaeus vannamei* (flechas). B, cuerpos de oclusión esféricos intranucleares eosinófilos en un túbulo del hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* (flechas). Tinción H&E, escala de 20 μ m. 6
- Figura 4. Cuerpos de inclusión basófilos (flechas negras) y picnosis (flechas blancas) en el tejido hematopoyético de branquias de *Penaeus vannamei* (Fuente: Qiu et al., 2017). 7
- Figura 5. Cuerpos de inclusión intranucleares basófilos (flechas) en el epitelio del estómago de *Penaeus vannamei*. Tinción H&E, escala de 20 μ m. 8
- Figura 6. Túbulo del hepatopáncreas con una infección severa en fase aguda por hepatopancreatitis necrotizante. Se observan masas bacterianas citoplasmáticas (flechas) causando una hipertrofia de las células hospederas. Tinción H&E, escala de 20 μ m. 9
- Figura 7. Hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. Se observa una descamación masiva de las células epiteliales que recubren a los túbulos del hepatopáncreas, así como, una infiltración hemocítica masiva y melanización de la gran mayoría de los túbulos (flechas). Tinción H&E, escala de 20 μ m. 10
- Figura 8. Células epiteliales de un túbulo del hepatopáncreas con un plasmodio tardío que contiene un gran número de esporas de *Enterocytozoon hepatopenaei*. Tinción H&E, escala de 20 μ m. 10
- Figura 9. Mapas de las granjas. A, corresponde a la Granja 1 y los números indican a los estanques muestreados, siendo el orden: 32, 37, 43, 54, 57, 59, 94, 104 y 112. B, corresponde a la Granja 2 y los números indican a los estanques muestreados, siendo el orden: 17, 26, 33, 57, 87 y 103.. 16
- Figura 10. Muestreo de agua. A. Colecta de agua en un punto del estanque de cultivo, B. Mezcla del agua de al menos dos puntos de muestreo y C. Muestra final de 500 mL. 17
- Figura 11. Muestreo de sedimento de un estanque de cultivo. A. Colecta de sedimento con un tubo PVC de 1 in de grosor, B. Mezcla del sedimento de al menos dos puntos de muestreo del estanque y C. Muestra final de 500 mL de sedimento. 17
- Figura 12. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se observa la amplificación de los productos de PCR del tamaño esperado para cada patógeno. Donde IHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; WSSV-Virus del síndrome de la mancha blanca; DIV1-Virus iridiscente de los decápodos 1; MB-*Monodon baculovirus*; BP-*Baculovirus penaei*; NHP-

Hepatopancreatitis necrotizante; AHPND-Necrosis aguda del hepatopáncreas y EHP- <i>Enterocytozoon hepatopenaei</i>	20
Figura 13. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de agua que amplificaron para el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.	21
Figura 14. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de sedimento que amplificaron para el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.	21
Figura 15. Mapa de la granja 1 indicando todos los estanques positivos a la presencia de ADN de los diferentes agentes patógenos. Donde el color azul indica positivo a IHHNV; el gris positivo a BP; el rosa positivo a MB; el verde positivo al DIV1; el rojo positivo a NHP y el naranja positivo a AHPND.	24
Figura 16. Mapa de la granja 2 con todos los estanques positivos a la presencia de ADN de los diferentes agentes patógenos. Donde el color azul indica positivo a IHHNV; el gris positivo a BP; el rosa positivo a MB; el rojo positivo a NHP y el naranja positivo a AHPND.....	24
Figura 17. Porcentaje de muestras de ADNe de agua positivas a agentes patógenos en los estanques de la granja 1.	25
Figura 18. Porcentaje de muestras de ADNe de sedimento positivas a agentes patógenos en los estanques de la granja 1.	25
Figura 19. Porcentaje de muestras de ADNe de agua positivas a agentes patógenos en los estanques de la granja 2.	26
Figura 20. Porcentaje de muestras de ADNe de sedimento positivas a agentes patógenos en los estanques de la granja 2.	26
Figura 21. Alineamiento de las secuencias “forward” y “reverse” de IHHNV (A), MB (B) y AHPND (C). En la parte superior se observa la secuencia consenso, la cual indica el número de secuencias utilizadas para formarla. Por otro lado, la línea de color verde indica el porcentaje de identidad entre la secuencia “forward” y “reverse”.....	27
Figura 22. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de agua que amplificaron para <i>Baculovirus penaei</i> . La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.	67
Figura 23. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de agua que amplificaron para <i>Monodon baculovirus</i> . La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.	67
Figura 24. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de agua que amplificaron para el virus iridiscente de los decápodos tipo 1. La primera hilera	

- corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2..... 68
- Figura 25. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde la ausencia de flechas negras en las muestras de agua que son negativas para el virus de la mancha blanca. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2. 68
- Figura 26. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde la ausencia de flechas negras en las muestras de agua indica que son negativas para *Candidatus hepatobacter penaei* causante de la necrosis hepatopancreática. La primer hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2. 69
- Figura 27. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde la ausencia de flechas negras en las muestras de agua indica que son negativas para la necrosis aguda hepatopancreática La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2..... 69
- Figura 28. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde la ausencia de flechas negras en las muestras de agua indica que son negativas para *Enterocytozoon hepatopenaei*. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2..... 70
- Figura 29. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de sedimento que amplificaron para *Baculovirus penaei*. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2. 70
- Figura 30. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de sedimento que amplificaron *Monodon baculovirus*. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2. 71
- Figura 31. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de sedimento que amplificaron para el virus iridiscente de los decápodos tipo 1. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2..... 71
- Figura 32. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde la ausencia de flechas negras en las muestras de sedimento indica que son negativas para el virus de la mancha blanca. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2..... 72
- Figura 33. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de sedimento que amplificaron para *Candidatus hepatobacter penaei* causante de la necrosis hepatopancreática. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2. 72
- Figura 34. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de sedimento que amplificaron para la necrosis aguda hepatopancreática. La primera hilera

- corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2..... 73
- Figura 35. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde la ausencia de flechas negras en las muestras de sedimento indica que son negativas para *Enterocytozoon hepatopenaei*. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2..... 73
- Figura 36. Alineamiento de las secuencias “forward” y “reverse” de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética. En la parte superior se observa la secuencia consenso, la cual indica el número de secuencias utilizadas para formarla. Por otro lado, la línea de color verde indica el porcentaje de identidad entre la secuencia “forward” y “reverse”. 74
- Figura 37. Alineamiento de las secuencias “forward” y “reverse” de *Monodon baculovirus*. En la parte superior se observa la secuencia consenso, la cual indica el número de secuencias utilizadas para formarla. Por otro lado, la línea de color verde indica el porcentaje de identidad entre la secuencia “forward” y “reverse” 74
- Figura 38. Alineamiento de las secuencias “forward” y “reverse” del virus iridiscente de los decápodos tipo 1. En la parte superior se observa la secuencia consenso, la cual indica el número de secuencias utilizadas para formarla. Por otro lado, la línea de color verde indica el porcentaje de identidad entre la secuencia “forward” y “reverse” 75
- Figura 39. Alineamiento de las secuencias “forward” y “reverse” de la necrosis hepatopancreática. En la parte superior se observa la secuencia consenso, la cual indica el número de secuencias utilizadas para formarla. Por otro lado, la línea de color verde indica el porcentaje de identidad entre la secuencia “forward” y “reverse” 75

Lista de tablas

Tabla 1. Identificación taxonómica del camarón blanco del Pacífico (Pérez-Farfante y Kensley, 1997).	3
Tabla 2. Métodos de detección no moleculares y moleculares (Pantoja y Ligthner, 2004).	11
Tabla 3. Secuencias génicas de los oligonucleótidos.	18
Tabla 4. Detección de ADN de agentes patógenos por medio de PCR punto final en muestras de agua y sedimento del primer muestreo en la granja 1.	22
Tabla 5. Detección de ADN de agentes patógenos por medio de PCR punto final en muestras de agua y sedimento del segundo muestreo en la granja 1.	22
Tabla 6. Detección de ADN de agentes patógenos por medio de PCR punto final en muestras de agua y sedimento del primer muestreo en la granja 2.	23
Tabla 7. Detección de ADN de agentes patógenos por medio de PCR punto final en muestras de agua y sedimento del segundo muestreo en la granja 2.	23
Tabla 8. Análisis de BLAST de la secuenciación Sanger. Para cada muestra se indica el patógeno detectado, porcentajes de identidad y cobertura, así como, el número del acceso del resultado más cercano en Genbank y el país de origen.	28
Tabla 9. Mapeo de la muestra 57M2G1. Se indican los resultados de la detección de patógenos por medio de PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank.	29
Tabla 10. Mapeo de la muestra 59M2G1. Se indican los resultados de la detección de patógenos por medio de PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank.	30
Tabla 11. Mapeo de la muestra 94M2G1. Se indican los resultados de la detección de patógenos por PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank.	31
Tabla 12. Mapeo de la muestra 104M2G1. Se indican los resultados de la detección de patógenos por PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank.	32
Tabla 13. Mapeo de la muestra 103M1G2. Se indican los resultados de la detección de patógenos por PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank.	33

Tabla 14. Mapeo de la muestra 43M2G1. Se indican los resultados de la detección de patógenos por PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank..... 34

Tabla 15. Mapeo de la muestra 112M2G1. Se indican los resultados de la detección de patógenos por PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank..... 35

Capítulo 1. Introducción

La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos como peces, crustáceos, moluscos y plantas de aguas dulces y saladas (Platas-Rosado y Vilaboa-Arroniz, 2014). En la última década, se ha convertido en el sector de producción alimentaria de más rápido crecimiento, así como, una de las mejores opciones para satisfacer la demanda de productos de origen marino destinados al consumo humano (FAO, 2022). La producción de crustáceos en el mundo sobrepasó los 11.2 millones de toneladas en el año 2020, generando un ingreso de 81 mil millones de dólares americanos (FAO, 2022). El camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) es la especie de crustáceo de mayor producción en la acuicultura. En 2020, su producción alcanzó los 5.8 millones de toneladas con un valor aproximado de 42 mil millones de dólares americanos (FAO, 2022). Dicha producción se concentró principalmente en el oriente y sudoeste asiáticos y América Latina, particularmente en China, Vietnam, India, Indonesia, Ecuador, Tailandia, México, Brasil, Venezuela, Perú y Honduras (FAO, 2022; CONAPESCA 2021).

En México, los cultivos comerciales de camarón iniciaron a partir de los años 80s y la actividad ha tenido un crecimiento exponencial desde entonces. Las actividades de cultivo se concentran primordialmente en el Noroeste del país, en la costa de los estados de Sinaloa y Sonora (CONAPESCA, 2021). En 2021, el cultivo de camarón representó el 73% de la producción acuícola nacional total, con un volumen de aproximadamente 182 mil toneladas y un valor estimado en más de 18 mil millones de pesos mexicanos (CONAPESCA, 2021).

El sector camaronícola se ha visto severamente afectado por enfermedades existentes y emergentes que amenazan la rentabilidad, sostenibilidad y crecimiento de la industria (Cruz-Flores et al., 2020). Las tasas altas de producción, la ausencia de medidas de bioseguridad, el manejo inadecuado de los estanques (p. ej. mala calidad del agua, distribución de alimento en exceso), el uso indiscriminado de antibióticos, y algunos factores ambientales contribuyen a la presencia de diferentes enfermedades en las granjas de camarón (Peña-Navarro y Varela-Mejías, 2016). El diagnóstico oportuno de los agentes patógenos permite desarrollar y aplicar medidas de prevención y control para estos (Cruz-Flores et al., 2021).

Las herramientas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y PCR en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés) facilitan la identificación y cuantificación de los agentes infecciosos a partir de muestras de ADN o ARN tomadas de diferentes órganos y tejidos (De la Rosa-Vélez y Bonami, 2006). Los organismos acuáticos en un cultivo están interactuando constantemente con un

consorcio extremadamente variado de microorganismos y es posible que algunos de estos actúen como patógenos primarios y/u oportunistas (Harvell et al., 2002). En un estanque de cultivo pueden estar presentes una elevada diversidad de patógenos (virus, bacterias, hongos) que pueden afectar la salud de los camarones y rentabilidad del cultivo (Chayaburakul et al., 2004). Sin embargo, la mayoría de las técnicas de PCR y qPCR no están diseñadas para detectar o identificar simultáneamente a todos los agentes patógenos de una muestra.

La tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) surge años posteriores a la secuenciación de Sanger y permite secuenciar una mayor cantidad de fragmentos de ADN a un costo más bajo (Rodríguez-Santiago y Armengol, 2012). Adicionalmente, dependiendo de la profundidad de la secuenciación, es posible obtener los genomas de toda la comunidad microbiana a partir de una muestra de ADN ambiental (ADNe, por environmental DNA en inglés) de agua o sedimentos (Taberlet et al., 2012; Thomsen y Willerslev, 2015; Deiner et al., 2017). El análisis metagenómico brinda un panorama más completo sobre la biodiversidad y la dinámica de todas las especies presentes en una comunidad (Hernández-De Lira et al., 2014). En los últimos años, el uso del análisis metagenómico se ha extendido debido a la facilidad y rapidez para el procesamiento de muestras (Saavedra-Olivos, 2016), además de ser una potente herramienta para la detección de agentes patógenos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue detectar por medio de los análisis derivados de NGS a potenciales agentes patógenos en agua y sedimento de estanques de cultivo de camarón.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Generalidades del camarón blanco del Pacífico

El camarón blanco del Pacífico, *Penaeus vannamei* Boone 1931 (o *Litopenaeus vannamei* Pérez-Farfante, 1969) pertenece al filum de los artrópodos y la familia *Penaeidae* (Tabla 1). Se distribuye de manera natural desde el extremo norte del Golfo de California, México hasta Tumbes, Perú (Méndez, 1981). Su ciclo de vida se desarrolla entre dos hábitats; los adultos llevan a cabo su reproducción en mar abierto mientras que los estadios postlarvales permanecen en aguas interiores, como son los estuarios y canales de marea, hasta los últimos estadios de juvenil (Méndez, 1981; Figura 1).

Tabla 1. Identificación taxonómica del camarón blanco del Pacífico (Pérez-Farfante y Kensley, 1997).

Phylum	<i>Arthropoda</i>
Clase	<i>Malacostraca</i>
Suborden	<i>Dendobrachiatata</i>
Superfamilia	<i>Penaeoidea</i>
Familia	<i>Penaeidae</i>
Género	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>vannamei</i>

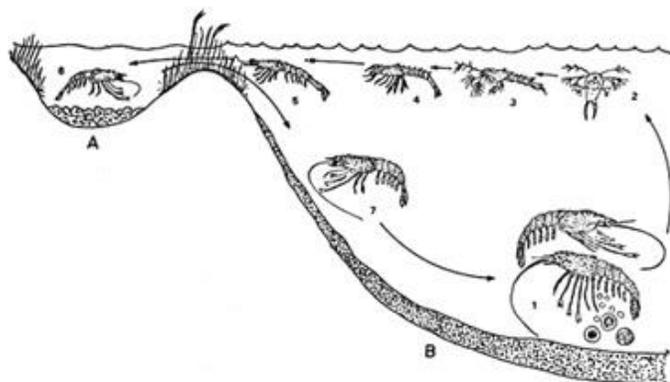


Figura 1. Ciclo de vida de un camarón peneido (Fuente: Méndez, 1981). Donde 1. Reproducción y desove de huevos en mar, 2. Etapa naupliar, 3. Etapa protozoal, 4. Etapa de mysis, 5. Etapa postlarval, 6. Camarón juvenil en aguas estuarinas y 7. Camarón adulto en aguas oceánicas.

1.1.2 Ciclo de producción en la industria camaronícola en México

El ciclo productivo dentro de la industria camaronícola se concentra en dos etapas principalmente: (1) la cría larvaria y (2) la pre-cría (también llamada maternización o pre-engorda) y (3) la engorda. El proceso de maduración de los reproductores y desove se contempla dentro de la etapa de cría y desarrollo larvario. Los reproductores son seleccionados y aclimatados en tanques de maduración donde permanecen hasta alcanzar su madurez sexual. Posteriormente, una vez que las hembras han sido fecundadas, se trasladan a tanques de desove donde pueden liberar hasta 230 mil huevos (Figueredo et al., 2019). De los huevos eclosionan nauplios de camarón, los cuales sufren un proceso de metamorfosis y desarrollo larvario, pasado por los estadios de protozoa, mysis y postlarva (Méndez, 1981).

La pre-cría empieza generalmente cuando las postlarvas pesan aproximadamente 0.03 g y termina cuando los organismos alcanzan entre 1 y 2g. Esta etapa permite distintos beneficios como es incrementar la talla de siembra de los camarones en los estanques de engorda y otorgarles una mayor protección contra enfermedades durante su etapa juvenil (Gervais y Zeigler, 2014), así como acortar el ciclo de cultivo. Esta etapa es facultativa, es decir, no se realiza en todo el país y puede desarrollarse en los laboratorios de

producción de postlarvas o en un área acondicionada para ello. La fase de engorda puede llevarse a cabo en cuatro tipos de sistemas de producción. El sistema extensivo es rústico y de baja tecnificación (García-Hernández et al., 2011). Los estanques suelen tener una superficie de hasta 3 ha y los organismos se alimentan principalmente de fitoplancton y zooplancton. La densidad de siembra es de 4 a 10 postlarvas/m² (INAPESCA, 2018) y la cantidad de camarones cosechados oscila entre los 20 a 90 kg/ha (Appleford et al., 2012).

En el sistema semi-intensivo, la siembra se realiza a una densidad de 10 a 30 postlarvas por metro cuadrado (INAPESCA, 2018). Por lo general, la alimentación consiste en un 50% de alimento comercial y el otro 50% de alimento natural, como menciona García-Hernández et al. (2011). Los estanques en este sistema son de tierra y tienen una baja aireación, pero es posible cosechar hasta 900 kg por hectárea, según Appleford et al. (2012). Por otro lado, en el cultivo intensivo los estanques tienen una superficie de 1 ha y aunque generalmente son de tierra se encuentran recubiertos por membranas. La densidad de siembra es de 60 hasta 300 postlarvas/m² (INAPESCA, 2018). Los estanques cuentan con aireación y la alimentación se basa principalmente en alimento comercial (García-Hernández et al., 2011). La cosecha puede oscilar entre 6,000 a 15,000 kg/ha (Appleford et al., 2012). El sistema hiperintensivo se caracteriza por su eficiencia de recursos y manejo de protocolos de bioseguridad (Ray et al., 2011). La densidad de siembra es de 200 hasta 400 postlarvas/m² y se pueden cosechar hasta 40 ton/ha/ciclo productivo. Los estanques de concreto se encuentran cubiertos por geomembrana y están dentro de invernaderos (Miranda Baeza et al., 2018).

En México, el sistema de producción semi-intensivo es el predominante. Según datos de 2013, se registraron 746 unidades en el estado de Sinaloa y 548 unidades en el resto del país. El sistema extensivo es el segundo más popular en el país, con 49 unidades en total, de las cuales 34 se encontraban en el estado de Chiapas. El sistema intensivo es el menos común en México, con solo 28 unidades en 2013 (SAGARPA, 2015).

1.1.3 Principales agentes patógenos en el cultivo de camarón

En las últimas décadas, el sector camaronícola se ha visto severamente afectado por una gran variedad de agentes patógenos conocidos y emergentes que amenazan la rentabilidad, sostenibilidad y el crecimiento de esta industria (Cruz-Flores et al., 2020). Los camarones pueden ser blanco de virus causantes de importantes enfermedades, entre los principales, por el impacto negativo que tienen en el cultivo de

camarón están: el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), parvovirus hepatopancreático (HPV), *Baculovirus penaei* (BP), *Monodon baculovirus* (MB), virus iridiscente de los decápodos 1 (DIV1) y virus de la mancha blanca (WSSV). De igual manera, pueden ser afectados por enfermedades causadas por agentes bacterianos, como son la necrosis hepatopancreática (NHP) y la necrosis aguda hepatopancreática (AHPND). Más recientemente, enfermedades de origen fúngico como la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) generan grandes problemas en el cultivo de camarón a nivel global (OMSA, 2023).

1.1.3.1 El virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV)

La necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV) es provocada por un virus de ADN monocatenario perteneciente a la familia *Parvoviridae* y a la subfamilia *Hamaparvovirinae* (Bonami et al., 1990; Péntzes et al., 2020). Los viriones tienen un diámetro de 23 nm y la longitud de su genoma es de aproximadamente 4.1 kpb. El genoma de IHHNV tiene tres marcos abiertos de lectura u ORFs (del inglés Open Reading Frame) que codifican para las dos proteínas no estructurales NS1, NS2 y una proteína estructural (Dhar et al., 2019). El IHHNV se replica en tejido ectodérmico, por lo que se pueden observar cuerpos intranucleares eosinófilos Cowdry tipo A en el tejido hipodérmico y hematopoyético a nivel histológico (Figura 2). Este virus causa deformidad, enanismo y afecta a todos los estadios de vida de *P. vannamei* (Kalagayan et al., 1991). Los juveniles del camarón blanco del Pacífico infectados con una alta carga viral, en ocasiones, pueden presentar un rostrum deforme, antenas arrugadas y un caparazón rugoso, así como una disminución en su crecimiento (Pantoja y Lightner, 2014). El virus de IHHNV se transmite de forma horizontal y vertical (Dhar et al., 2019); es una enfermedad que debe reportarse ante la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA) (OMSA, 2023) y se encuentra enlistada en las enfermedades y plagas endémicas en México (DOF, 2018).

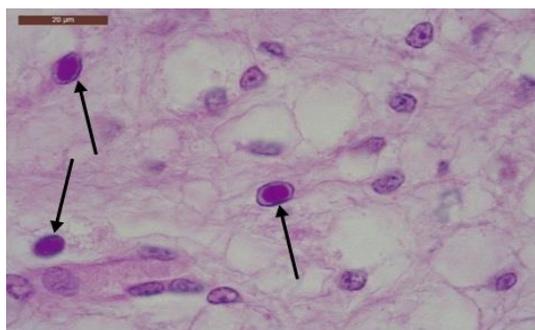


Figura 2. Cuerpos intranucleares eosinófilos Cowdry tipo A (flechas) en tejido conectivo de *Penaeus stylirostris* provocadas por el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética. Tinción H&E, escala de 20 μ m.

1.1.3.2 *Baculovirus penaei* (BP) y *Monodon baculovirus* (MB)

El virus de la poliedrosis nuclear (VPNs) se clasifica de acuerdo con la forma de los cuerpos de oclusión. A nivel histológico, se puede identificar *Baculovirus penaei* (BP) en camarones por la presencia de cuerpos tetraédricos intranucleares eosinófilos en el hepatopáncreas (Figura 3 A), mientras que, cuerpos intranucleares eosinófilos esféricos son propios de *Monodon baculovirus* (MB) (Figura 3 B). El BP se conforma por ADN bicatenario circular que tiene una longitud de 134 kpb (Summers, 1977); los viriones tienen forma de bastón con un diámetro de 87nm (Bonami et al., 1995). El MB pertenece a la familia *Nudiviridae* y al género *Gammanudivirus*; posee un genoma de ADN bicatenario circular de 119.6 kpb y 115 ORFs (Yang et al., 2014) y los viriones tienen un diámetro de 79 nm (Lightner et al., 1983). El BP daña a las células epiteliales del hepatopáncreas y del intestino medio, afectando principalmente a las larvas y ocasionando altas mortalidades (Brock y Lightner, 1990; Cuéllar-Anjel, 2015). Por otro lado, el MB infecta a todos los estadios de vida de *P. monodon*, siendo más susceptibles los estadios larvarios; provoca letargia, reducción del consumo de alimento y disminución en el crecimiento de los camarones (Rajendran et al., 2012). Ambas enfermedades son exóticas de reporte obligatorio en México (DOF, 2018).

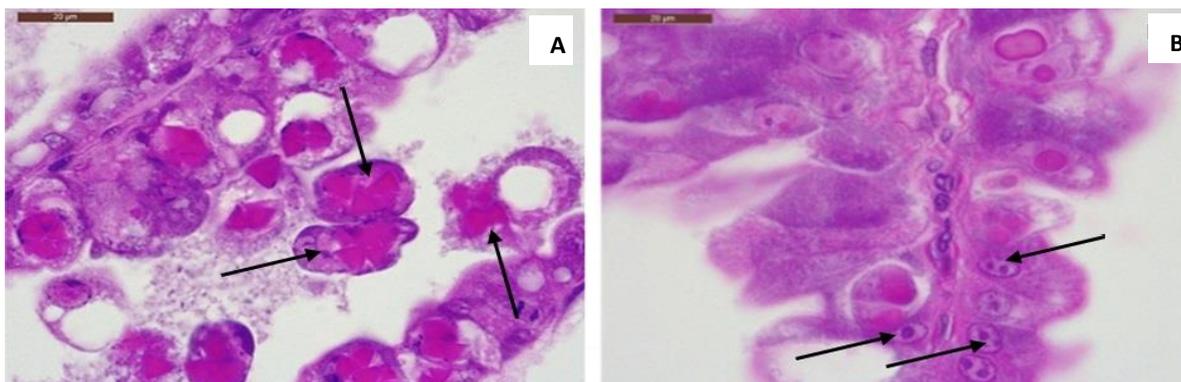


Figura 3. *Baculovirus penaei* y *Monodon baculovirus*. A, cuerpos de oclusión tetraédricos intranucleares eosinófilos en las células del hepatopáncreas e intestino medio de *Penaeus vannamei* (flechas). B, cuerpos de oclusión esféricos intranucleares eosinófilos en un túbulo del hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* (flechas). Tinción H&E, escala de 20 µm.

1.1.3.3 El virus iridiscente de los decápodos 1 (DIV1)

El virus iridiscente del hematocito de camarón (SHIV) actualmente es conocido como el virus iridiscente de los decápodos tipo 1 (DIV 1) (Xu et al., 2016; Qiu et al., 2017). El DIV1 es un virus de ADN de doble cadena lineal perteneciente a la familia *Iridoviridae* y al género *Decapodiridovirus*. Su genoma tiene una longitud de 165 kb y contiene 170 ORFs (Qiu et al., 2018(a); Qiu et al., 2018(b)). Los viriones son icosaédricos y tienen un diámetro de 150 hasta 158 nm (Chen et al., 2019; Qiu et al., 2019). Algunos

decápodos susceptibles al DIV 1 son: *P. vannamei*, *Cherax quadricarinatus*, *Macrobrachium rosenbergii* y *Procambarus clarkii* (Xu et al., 2016; Qiu et al., 2017; Chen et al., 2019). Histológicamente se observan cuerpos de inclusión basófilos y picnosis en el tejido hematopoyético, branquias, hepatopáncreas y pereiópodos (Qiu et al., 2017) (Figura 4). Los ejemplares de *P. vannamei* infectados con el DIV1 mostraron tener un estómago vacío, pérdida de color del hepatopáncreas y un exoesqueleto flácido. La enfermedad se encuentra listada por la OMSA y debe de ser notificada (OMSA, 2023).

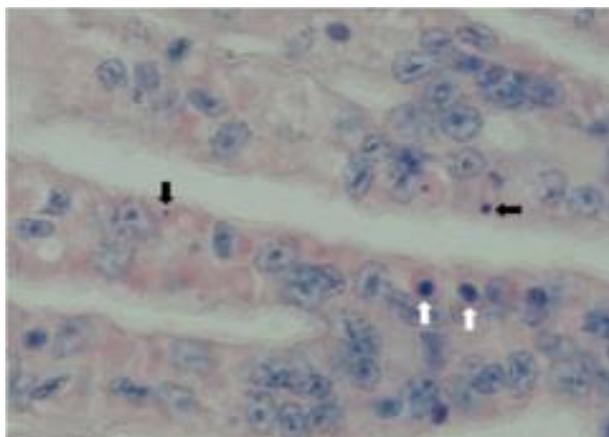


Figura 4. Cuerpos de inclusión basófilos (flechas negras) y picnosis (flechas blancas) en el tejido hematopoyético de branquias de *Penaeus vannamei* (Fuente: Qiu et al., 2017).

1.1.3.4 El virus de la mancha blanca (WSSV)

La enfermedad de la mancha blanca es producida por un virus de ADN bicatenario circular perteneciente a la familia *Nimaviridae* y al género *Whispovirus* (Lightner et al., 2012; Dey et al., 2019). Su genoma tiene una longitud de 280 a 310 kpb y contiene 180 ORFs (Van Hulten et al., 2001; Oakey et al., 2019). En una etapa temprana de la infección a nivel histológico se observan cuerpos de inclusión eosinófilos en las células infectadas, mientras que, en una etapa más avanzada de la infección, se observan los núcleos hipertrofiados con cuerpos de inclusión basófilos (Figura 5). Este virus afecta a todos los estadios del camarón blanco del Pacífico y a muchas otras especies de crustáceos (Pantoja y Lightner, 2014). Se transmite de forma horizontal (agua contaminada, zooplancton, depredación, canibalismo) y vertical; la probabilidad de que un organismo se infecte es mayor cuando experimenta una condición de estrés térmico (Vidal et al., 2001). Los organismos infectados muestran una marcada reducción en su consumo de alimento, son letárgicos y la cutícula se desprende con facilidad. Adicionalmente, en algunas ocasiones presentan manchas blancas de 0.5 a 2 mm de diámetro en su exoesqueleto (Pantoja y Lightner, 2014). Las poblaciones de camarón infectadas presentan un alto índice de mortalidad en pocos días (Cuéllar-Anjel,

2023). En México, esta enfermedad figura dentro del listado de las enfermedades y plagas endémicas (DOF, 2018) y tiene que ser reportada ante la OMSA (OMSA, 2023).

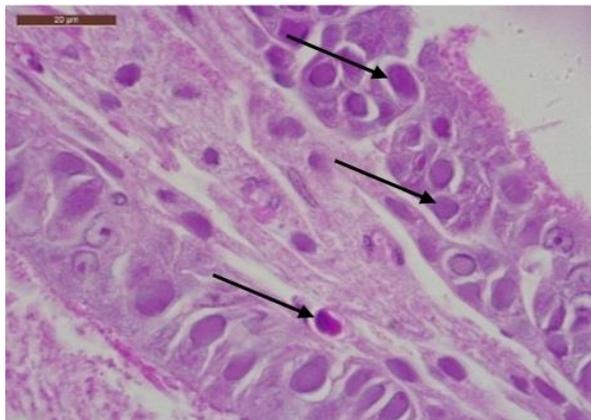


Figura 5. Cuerpos de inclusión intranucleares basófilos (flechas) en el epitelio del estómago de *Penaeus vannamei*. Tinción H&E, escala de 20 μ m.

1.1.3.5 Necrosis hepatopancreática (NHP)

La necrosis hepatopancreática o hepatopancreatitis necrotizante es una enfermedad ocasionada por una α -proteobacteria gram negativa denominada *Candidatus Hepatobacter penaei* (Morales-Covarruvias y Gómez-Gil, 2014). Se pueden diferenciar histológicamente tres fases de la enfermedad, la fase aguda se caracteriza por la atrofia del hepatopáncreas y células hipertróficas y epiteliales separadas del resto de las células (Figura 6); en la fase de transición, las células epiteliales tubulares se atrofian y se visualizan nódulos hemocíticos, por otro lado, en la fase crónica se observan zonas con fibrosis, túbulos melanizados, algunas células hipertrofiadas con masas bacterianas y pocos nódulos hemocíticos (OMSA, 2023).

Esta enfermedad se transmite de forma horizontal (consumo de organismos infectados) (Morales-Covarruvias y Gómez-Gil, 2014) y su proliferación en los cultivos de camarón puede ser favorecida por la combinación de una temperatura elevada (desde 29°C hasta 35°C) con una salinidad de 20 a 38 ppm. Provoca altas tasas de mortalidad y atrofia de las branquias y hepatopáncreas (Morales-Covarruvias y Gómez-Gil, 2014). Los juveniles y adultos de camarón presentan un consumo bajo de alimento y coloración del cuerpo café/amarillenta. Es una enfermedad endémica de reporte obligatorio en México y ante la OMSA (DOF, 2018; OMSA, 2023).

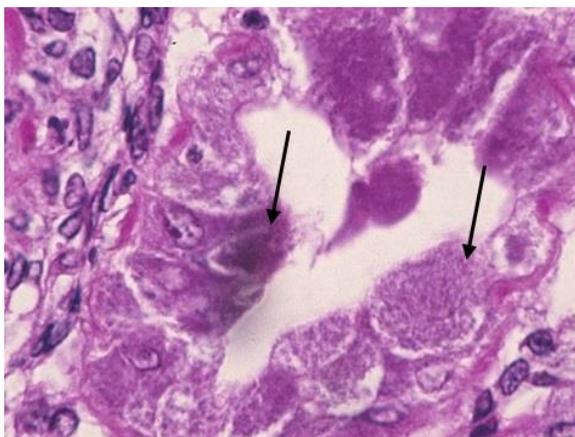


Figura 6. Túbulo del hepatopáncreas con una infección severa en fase aguda por hepatopancreatitis necrotizante. Se observan masas bacterianas citoplasmáticas (flechas) causando una hipertrofia de las células hospederas. Tinción H&E, escala de 20 μ m.

1.1.3.6 Necrosis hepatopancreática aguda (AHPND)

La necrosis hepatopancreática aguda inicialmente conocida como síndrome de mortalidad temprana (EMS) en larvas de camarón, es provocada por bacterias del género *Vibrio*. Hasta el momento, la infección es atribuida principalmente al *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. campbelli*; las bacterias tienen la capacidad de producir una toxina binaria que viaja desde el estómago hasta el hepatopáncreas para causar su necrosis (Tran et al., 2013).

Durante la fase aguda de la infección, se observa una degeneración masiva y progresiva de los túbulos del hepatopáncreas, así como el desprendimiento de las células epiteliales, mientras que, en la fase terminal, se presenta una inflamación hemocítica intratubular y necrosis (Soto-Rodríguez et al., 2015) (Figura 7). Los camarones juveniles presentan nado errático, baja tasa de crecimiento y el hepatopáncreas adquiere una tonalidad blanquecina. La mortalidad puede ser hasta de un 100% de los organismos (Morales-Covarrubias y Gómez-Gil, 2014). Es una enfermedad de reporte obligatorio ante la OMSA y en México se encuentra dentro del listado de enfermedades exóticas (DOF, 2018; OMSA, 2023).

1.1.3.7 *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

La microsporidiosis hepatopancreática es una enfermedad causada por el hongo *Enterocytozoon hepatopenaei* que pertenece a la familia *Enterocytozoonidae* y al filum microsporidia (Tourtip et al., 2009; Vávra y Lukes, 2013). Es un parásito intracelular formador de esporas que afecta al hepatopáncreas de

especies como *P. vannamei*, *P. monodon* y *P. stylirostris* (Tang et al., 2015; Thitamadee et al., 2016). Sus esporas son monocarióticas de forma ovalada, en un extremo presenta un tubo polar que tiene alrededor de 5 bobinas, mientras que, en el otro extremo tiene un disco de anclaje (Tourtip et al., 2009). Histológicamente se observan inclusiones basófilas citoplasmáticas que contienen esporas en las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas (Figura 8). Provoca una disminución del crecimiento y se transmite vía horizontal (Tourtip et al., 2009; Tang et al., 2016). Se ha observado que puede actuar como un factor de ingreso para otras enfermedades (Aranguren et al., 2017). Es una enfermedad clasificada como emergente por la OMSA y de notificación obligatoria (OMSA, 2023).

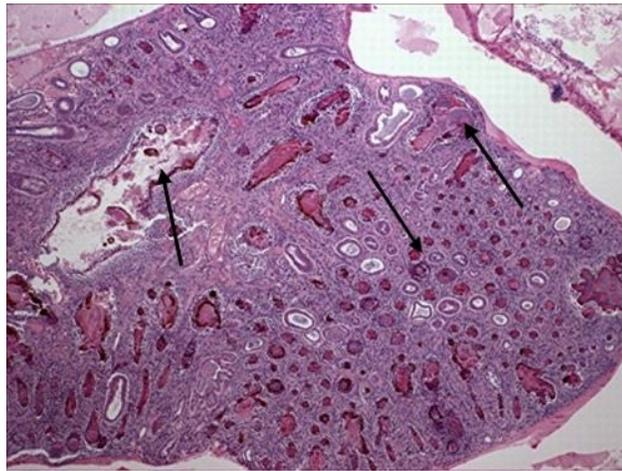


Figura 7. Hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. Se observa una descamación masiva de las células epiteliales que recubren a los túbulos del hepatopáncreas, así como, una infiltración hemocítica masiva y melanización de la gran mayoría de los túbulos (flechas). Tinción H&E, escala de 20 μ m.

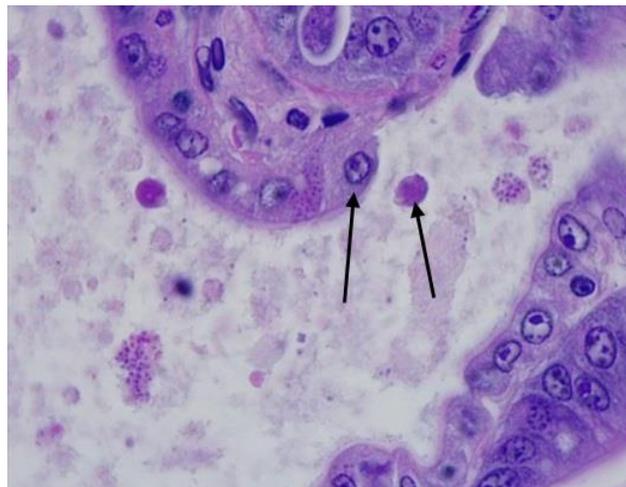


Figura 8. Células epiteliales de un túbulo del hepatopáncreas con un plasmodio tardío que contiene un gran número de esporas de *Enterocytozoon hepatopenaei*. Tinción H&E, escala de 20 μ m.

1.1.4 Métodos de identificación de agentes patógenos en acuicultura y diagnóstico de enfermedades.

El proceso para establecer un diagnóstico de una enfermedad conlleva herramientas de laboratorio utilizadas para la identificación de agentes patógenos, se pueden dividir en dos: las primeras corresponden a los métodos no moleculares, los cuales pueden ser muy específicos y/o sensitivos para obtener un diagnóstico definitivo (Tabla 2); por otra parte, los métodos moleculares son utilizados en caso de que los primeros no sean suficientemente concluyentes (Pantoja y Lightner, 2014).

Los métodos no moleculares de identificación implican el desarrollo del “ojo clínico” para que el procedimiento sea exitoso. Las técnicas de laboratorio como la observación de tejido fresco al microscopio de contraste de fases o de campo claro, histología, histoquímica y microscopía electrónica de transmisión son ampliamente utilizadas en la actualidad. No obstante, requieren de bastante tiempo para el procesamiento de las muestras y pueden verse limitadas por el material y equipo (De la Rosa y Bonami, 2006). Un ejemplo de ello es la microscopía electrónica de transmisión que al ser combinada con técnicas de concentración del virus es un método muy eficiente para el diagnóstico; pese a ello, esta técnica no se utiliza de manera rutinaria debido al alto costo de este tipo de microscopio y del material que se necesita para realizar el análisis. El conocimiento de los genomas de los virus que infectan a los camarones cultivados en las granjas permite utilizar métodos de detección moleculares (De la Rosa y Bonami, 2006).

Tabla 2. Métodos de detección no moleculares y moleculares (Pantoja y Ligthner, 2004).

Métodos no moleculares	Métodos moleculares
Historial del caso	Anticuerpos fluorescentes (AF)
Apariencia externa y signos clínicos	ELISA
Examen directo al microscopio	Hibridación tipo “dot blot” (membrana de nylon)
Microbiología (aislamiento y cultivo)	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
Histología y pruebas histoquímicas	qPCR tiempo real
Hibridación “ <i>in situ</i> ” (cortes histológicos)	
Microscopía electrónica	

1.1.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha demostrado ser una herramienta molecular esencial en el diagnóstico de patógenos en los últimos 20 años (Sandoval-Rodríguez et al., 2013). La PCR se clasifica como una técnica cualitativa que, en comparación con la PCR en tiempo real (qPCR), presenta una

sensibilidad más limitada y requiere el uso de electroforesis para la visualización de sus resultados. Una de las limitaciones de esta técnica es su incapacidad para detectar cambios en la concentración de productos, lo que reduce la precisión del resultado (Sandoval-Rodríguez et al., 2013). En los estanques de las granjas camaronícolas, es común encontrar una diversidad de agentes patógenos conocidos, incluyendo aquellos mencionados previamente por Harvell et al. (2002). A pesar de que la PCR presenta ventajas, como su especificidad, sensibilidad, prontitud y rapidez (De la Rosa y Bonami, 2006), su utilidad se ve restringida cuando se trata de detectar simultáneamente varios patógenos, ya que solo puede identificar de dos a tres productos por reacción, lo que se conoce como PCR-multiplex o PCR múltiple.

1.1.5 Secuenciación masiva de nueva generación (NGS)

Inicialmente, la secuenciación de Sanger automatizada se destacó como el método predominante para la secuenciación de fragmentos de material genético, como señala Pinilla-Bérmudez (2019). Esta técnica permitía obtener lecturas de aproximadamente 1000 pares de bases con una alta precisión. No obstante, presentaba limitaciones en términos de la cantidad de secuencias que podía generar y era susceptible a alteraciones en las señales fluorescentes debido a errores en la movilidad o intensidad de emisión (Pinilla-Bérmudez, 2019).

Con la necesidad de secuenciar un mayor número de fragmentos con una longitud superior y a un costo más reducido, se desarrollaron las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS). Estas tecnologías emplean secuenciadores que posibilitan la generación de una mayor cantidad de lecturas sin requerir un conocimiento previo del genoma (Pinilla-Bérmudez, 2019). Además, la NGS se caracteriza por su alto rendimiento y menor costo en comparación con la secuenciación de Sanger (Pinilla-Bérmudez, 2019). Dentro de los secuenciadores empleados en NGS, destacan varias plataformas, como el 454 Roche, Illumina (MiSeq/HiSeq/NextSeq), SOLiD e Ion Torrent, junto con otras tecnologías como nanopore, PacBio y Helicos. Las plataformas de Illumina e Ion Torrent gozan de una gran popularidad en la detección de la diversidad bacteriana en muestras comunitarias, como han destacado estudios previos (Clooney et al., 2016; Lahens et al., 2017). De hecho, en comparaciones entre estas plataformas, se han observado resultados similares en la identificación de cambios en la biología de los tratamientos, como señala Peters et al. (2018). Hasta el año 2010, la tecnología NGS se había empleado para detectar bacterias en abejas, como documentó Cox-Foster et al. (2007), y virus en plantas, como señaló Adams et al. (2009), utilizando el ADN de estos organismos como fuente. Sin embargo, la NGS, al permitir la obtención de material

genético de diversas fuentes, como suelo, agua y aire, posee el potencial de identificar y analizar la presencia de cada microorganismo en una muestra específica, como ha destacado Jones (2010).

A través NGS, se ha logrado la reconstrucción completa del genoma del virus de la mancha blanca en *P. vannamei* a partir de tejidos fijados en parafina (Cruz-Flores et al., 2020). De manera similar, se ha logrado la reconstrucción del genoma del virus del síndrome de Taura (Cruz-Flores et al., 2021).

1.1.6 Detección de agentes patógenos en muestras de ADN ambiental (ADNe) en organismos acuáticos

En un trabajo del año 2019, se utilizó el ADN de muestras de 103 cuerpos de agua en Canadá para establecer la prevalencia del Ranavirus, un virus que causa enfermedades en distintas especies de anfibios (Torres Vilaça et al., 2019). En 2020, se publicó un estudio que evaluó la confiabilidad del ADNe de muestras de agua para detectar el hongo dulceacuícola *Batrachochytrium dendrobatidis* y el parásito mixozoario *Tetracapsuloides bryosalmonae*, ambos de los cuales afectan la producción de salmónidos (Sieber et al., 2020). Además, el parásito protozoario *Bonamia ostrae* se encontró en poblaciones de ostras mediante la obtención de ADNe a partir de agua de mar, según el estudio de Mérou et al. en 2020.

Hasta el año 2022, el ADNe obtenido de muestras de agua y sedimento se utilizó para la detección del parásito *Perkinsus olseni* en moluscos bivalvos. Cabe destacar que se realizaron pruebas de qPCR, y se empleó la plataforma de Illumina para secuenciar el gen 18S ARNr, como se informa en el trabajo de Ríos Castro et al. en 2022. Más recientemente, se han publicado dos estudios sobre el uso del ADNe para la detección temprana del virus de la caída de las escamas en un cultivo experimental del pez barramundi (Jun-Kiat et al., 2023), así como para identificar el microsporidio *Pseudoloma neurophilia* en un cultivo de pez cebra (Schuster et al., 2023).

1.2 Justificación

La tecnología de NGS ha revolucionado el campo de la biología molecular abriendo la posibilidad de secuenciar el genoma o transcriptoma completo de todo tipo de muestras. La NGS podría convertirse en un parteaguas como una herramienta de hallazgo de ADN de agentes patógenos presentes en muestras

de agua y sedimentos en el cultivo de camarón a nivel mundial ya que el mercado es significativo y reduciría en tiempo y costo el número de análisis requeridos para detectar posibles patógenos reportables en el mundo. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar la afinidad y utilidad de esta técnica para detectar virus de ADN, bacterias y hongos en el cultivo del camarón *P. vannamei*. El presente trabajo busca utilizar la secuenciación masiva de nueva generación como herramienta para la identificación confiable y de bajo costo del ADN de agentes patógenos en el agua y sedimentos en estanques de cultivo del camarón blanco del Pacífico. Este acercamiento metodológico para el hallazgo de ADN de patógenos en el ambiente podría aplicarse para complementar el diagnóstico de enfermedades infecciosas de organismos acuáticos en general.

1.3 Hipótesis

El análisis de las secuencias derivadas de la secuenciación masiva de nueva generación de muestras de agua y sedimentos permitirá la identificación simultánea de ADN de virus, bacterias y hongos asociados con enfermedades infecciosas de *Penaeus vannamei* en cultivo.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Utilizar la secuenciación masiva de nueva generación para identificar ADN de agentes patógenos, en muestras de agua y sedimento de estanques de cultivo del camarón *Penaeus vannamei*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Recolectar muestras de agua y sedimento de los estanques de cultivo de dos granjas camaronícolas del Noroeste de México.
- Estandarizar la técnica de extracción de ADN a partir de muestras de agua y sedimento.

- Determinar la presencia de ADN de agentes patógenos por PCR punto final y secuenciación Sanger en muestras de agua y sedimento.
- Determinar la presencia del ADN de agentes patógenos en cada muestra de agua y sedimento proveniente de cultivos del camarón *Penaeus vannamei*.
- Identificar agentes patógenos específicos a partir de muestras de agua y sedimento provenientes de cultivos del camarón *Penaeus vannamei* utilizando la NGS.
- Determinar el número de secuencias mapeadas a los genomas de referencia de los patógenos específicos del camarón *Penaeus vannamei*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Muestreo

Se visitaron dos granjas camaronícolas en el Noroeste de México para la recolección de muestras de agua y sedimento de los estanques de cultivo. La superficie total de la primera granja es de aproximadamente 150 hectáreas y cuenta con más de 120 estanques de engorda, de los cuales, se seleccionaron nueve para ser muestreados (Figura 9 A). Se realizaron dos muestreos; el primero de ellos en septiembre y el segundo en el mes de octubre. Por otro lado, la segunda granja visitada comprende una superficie total de más de 350 hectáreas y posee alrededor de 120 estanques de engorda. Se seleccionaron seis estanques para ser muestreados (Figura 9 B). De igual manera, se llevaron a cabo dos muestreos, el primero de ellos en octubre y el segundo en el mes de noviembre.

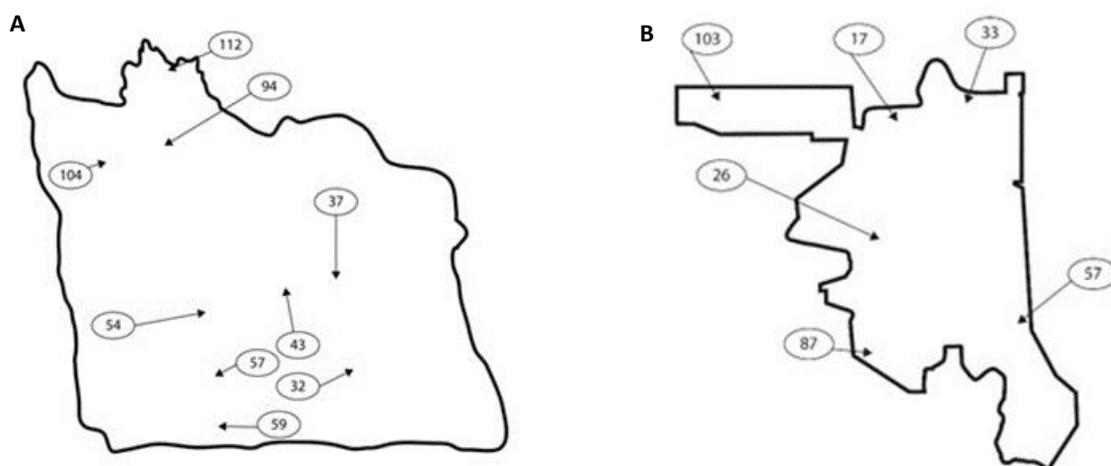


Figura 9. Mapas de las granjas. A, corresponde a la Granja 1 y los números indican a los estanques muestreados, siendo el orden: 32, 37, 43, 54, 57, 59, 94, 104 y 112. B, corresponde a la Granja 2 y los números indican a los estanques muestreados, siendo el orden: 17, 26, 33, 57, 87 y 103.

Para la obtención de muestras de agua, se recolectaron aproximadamente 5 L de agua de al menos dos puntos en cada estanque. Posteriormente, el agua recolectada se mezcló en una cubeta de 10 L y se tomaron dos muestras de 500 mL de agua en bolsas de plástico estériles (Figura 10). Por lo que se refiere a la obtención de muestras de sedimento, se utilizó un tubo de PVC de 1 pulgada de grosor y de 2.5 m de longitud. Se utilizó el tubo de PVC para hacer vacío dentro del sedimento y poder recolectarlo. Al menos

se muestrearon dos puntos de cada estanque y el sedimento fue mezclado dentro de un contenedor de plástico para poder obtener una muestra de 500 mL de sedimento, la cual se guardó en una bolsa de plástico estéril (Figura 11). Todas las muestras de agua y sedimento se colocaron dentro de una hielera con hielo a tope para su transporte al laboratorio. Posteriormente, las muestras se almacenaron en un ultracongelador a -80°C , donde permanecieron unos días hasta realizar la extracción de ADN. Cabe destacar, que las muestras de agua no fueron filtradas para su posterior procesamiento.



Figura 10. Muestreo de agua. A. Colecta de agua en un punto del estanque de cultivo, B. Mezcla del agua de al menos dos puntos de muestreo y C. Muestra final de 500 mL.



Figura 11. Muestreo de sedimento de un estanque de cultivo. A. Colecta de sedimento con un tubo PVC de 1 in de grosor, B. Mezcla del sedimento de al menos dos puntos de muestreo del estanque y C. Muestra final de 500 mL de sedimento.

2.2 Extracción de ADN y cuantificación

Las muestras se descongelaron con un día de anticipación y posteriormente se guardaron en un congelador a -20°C . De cada muestra de agua se tomaron 5 mL y se colocaron en tubos “beat” de 6 mL junto con 1 mL de buffer (Solución 1) para ser vortexeados durante 10 minutos. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit comercial PowerWater® DNA Isolation Kit Sample (MO BIO Laboratories Inc, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Anexo A). Por otro lado, de cada muestra se colocaron 500 mg de sedimento en un tubo PowerBead Pro junto con 800 μL de la solución CD1. Para la extracción de ADN, se utilizó el kit comercial DNAeasy® PowerSoil Pro Kit (50) (QIAGEN, NL) siguiendo las

recomendaciones del fabricante (Anexo B). La cantidad y pureza del ADN obtenido de agua y sedimento se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®, USA). Para ello, se empleó el coeficiente de absorbancia registrada a 260 nm sobre la obtenida a 280 nm y se consideró como ADN de buena calidad a las muestras que tenían un coeficiente entre 1.6 a 2.0.

2.3 Evaluación de la presencia de patógenos de ADN por PCR punto final

Para corroborar la presencia de los patógenos IHNV, BP, MB, AHPND, EHP y DIV1 (Tabla 3) se realizó la técnica de PCR punto final siguiendo las metodologías reportadas por Tang et al. (2007), OIE (2019), OIE (2019), Han et al. (2015), Tang et al. (2015) y Qiu et al. (2018 (a)), respectivamente. Por otra parte, para los patógenos de WSSV se siguió la metodología descrita por Durand y Lightner (2002) (Tabla 3).

Se utilizó una reacción de PCR universal a un volumen de 12.5 µL donde solo variaron los primers. Los componentes son los siguientes: 5x MyTaqBuffer (2.5 µL), primer Forward/Reverse (varía dependiendo del patógeno) (0.5µl), MyTaq DNA Polymerase 5u/µL (0.15 µL) (Bioline, meridianBIOSCIENCE®, USA) y agua de grado molecular (Mediatech, Inc®, USA) (8.35 µL). El programa fue universal para todos los patógenos y constó de 45 ciclos con el perfil de temperatura siguiente: 95°C durante 2 min, 95°C durante 15 s, 60°C durante 15 s, 72°C durante 15 s y una extensión de 72°C durante 2 min. Se utilizó un termociclador APOLLO ATC-201 Thermal Cycler (NYX Technik, USA). El producto de PCR se visualizó por medio de una electroforesis desnaturizante en un gel de agarosa al 2% con buffer TAE 1X y GELRED®.

Tabla 3. Secuencias génicas de los oligonucleótidos.

Gen	Secuencia 5' - 3'		Amplicon (bp)
	Sentido	Antisentido	
IHNV	TCCAACACTTAGTCAAACCAA	TGCTGCTACGATGATTATCCA	309
BP	TGTAGCAGCAGAGAAGAG	CACTAAGCCTATCTCCAG	644
MB	AATCCTAGGCGATCTTACCA	CGTTCGTTGATGAACATCTC	261
DIV1	AGGAGA GGGAAATAACGGGAAAAC	CGTCAGCATTGGTTCATCCATG	188
WSSV	TGGTCCCCTCCTCATCTCAG	GCTGCCTTGCCGAAATTA	70
NHP	CGTTGGAGGTTCTCCTTCAGT	GCCATGAGGACCTGACATCATC	379
AHPND PIRB	TCACGGCTTTGAACATATGC	CATCTCCGTACCTGTAGCA	149
EHP	GCCTGAGAG ATGGCTCCACGT	GCGTACTATCCCCAGAGCCCGA	510

IHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; BP-*Baculovirus penaei*; MB-*Monodon baculovirus*; DIV1-Virus iridiscente de los decápodos 1; WSSV-Virus del síndrome de la mancha blanca, NHP- Hepatopancreatitis necrotizante; AHPND toxina PIRB- que provoca la Necrosis aguda del hepatopáncreas y EHP- *Enterocytozoon hepatopenaei*.

2.4 Mapeo y anotación

La secuenciación masiva de última generación se realizó utilizando la plataforma Illumina HiSeq 2500 (PE 2X150 bp). El ADN de siete muestras se envió a Omega Bioservices, (USA) para su secuenciación. La librería para las muestras de ADN se generó en Omega Bioservices utilizando el kit KAPA Hyper prep for WGS (Roche, USA). La profundidad de la secuenciación fue de 20 millones de secuencias por muestra. Las lecturas de ADN se emparejaron y las secuencias duplicadas se eliminaron utilizando el “Plug-in” Dedupe en el programa Geneious Prime (Kearse et al., 2012; Cruz-Flores et al., 2020). La calidad de las secuencias se verificó utilizando BBDuk para remover todas las secuencias menores a 50 pb y los adaptadores (Kearse et al., 2012; Cruz-Flores et al., 2020). Se descargaron los genomas de referencia de IHHNV (Número de acceso de Genbank: AF273215.1) (Shike et al., 2000), WSSV (Número de acceso de Genbank: MN840357) (Cruz-Flores et al., 2020), BP (Genbank: OM066077.1), MB (Genbank: KJ184318); DIV1 (Qiu et al., 2017; Genbank: NC_055165); AHPND (Número de acceso de Genbank: KM067908.1); NHP (Número de acceso de Genbank: SSAZ01000001.1) y EHP (Número de acceso de Genbank: SAMN05936804). Todas las muestras fueron mapeadas a los genomas de referencia utilizando Mapper del programa Geneious Prime con los parámetros predeterminados.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Control positivo y negativo de los oligonucleótidos

Para corroborar el funcionamiento correcto de los oligonucleótidos se corrieron PCRs utilizando como controles positivos fragmentos clonados de los patógenos correspondientes en el vector plasmídico p-drive de QIAGEN. Se obtuvo una amplificación positiva para todos los patógenos con excepción del virus de la mancha blanca (Figura 12).

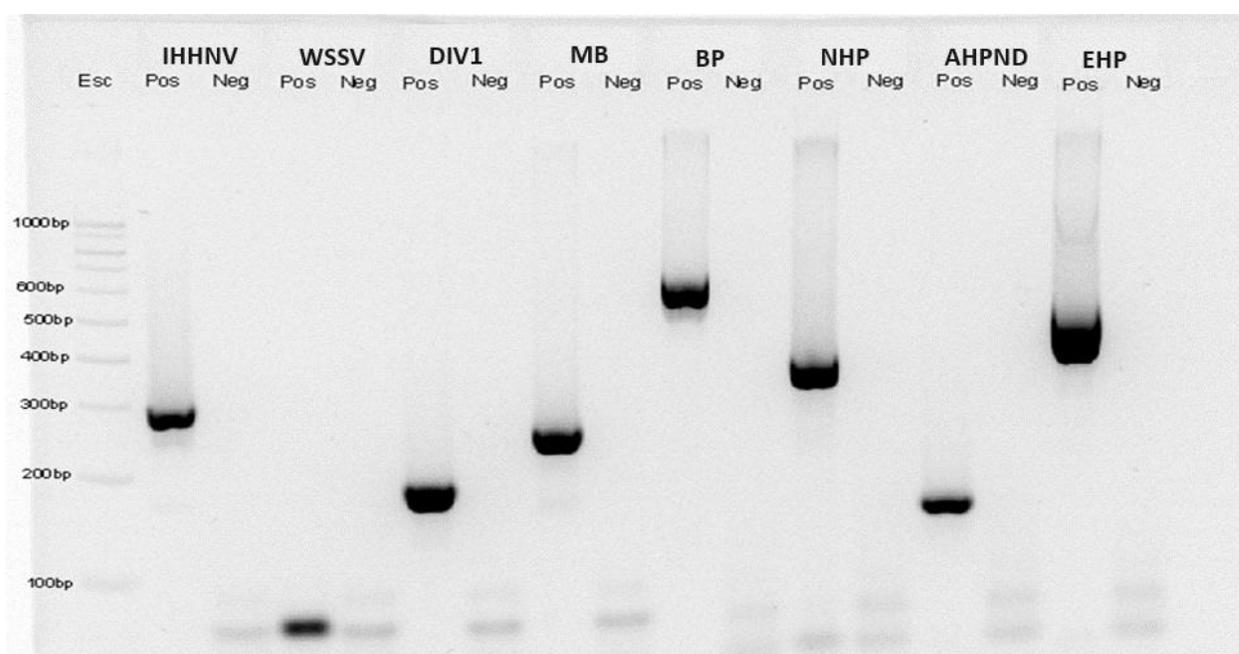


Figura 12. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se observa la amplificación de los productos de PCR del tamaño esperado para cada patógeno. Donde IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; WSSV-Virus del síndrome de la mancha blanca; DIV1-Virus iridiscente de los decápodos 1; MB-*Monodon baculovirus*; BP-*Baculovirus penaei*; NHP-Hepatopancreatitis necrotizante; AHPND-Necrosis aguda del hepatopáncreas y EHP-*Enterocytozoon hepatopenaei*.

3.2 Detección de ADN de los agentes patógenos por PCR punto final

El ADN de las muestras de agua y sedimento mostró la presencia de ADN de diferentes agentes patógenos en la mayoría de los estanques muestreados de ambas granjas. La granja 1 mostró una alta diversidad de patógenos (Tablas 4 y 5) con respecto a la granja 2 (Tablas 6 y 7). Los estanques positivos a la presencia de ADN de los diferentes patógenos fueron identificados tras visualizar los gels de agarosa al 2% teñidos con

GelRED para cada agente patógeno (Anexo C). En las Figuras 13 y 14, se aprecian algunas muestras de las granjas 1 y 2 que amplificaron para el IHNV.

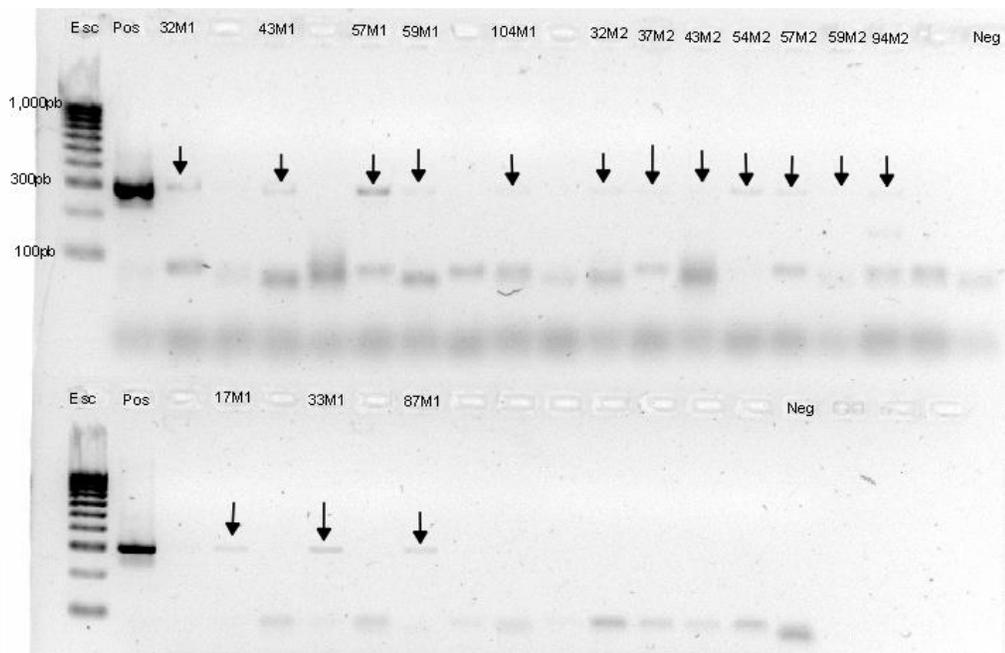


Figura 13. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de agua que amplificaron para el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

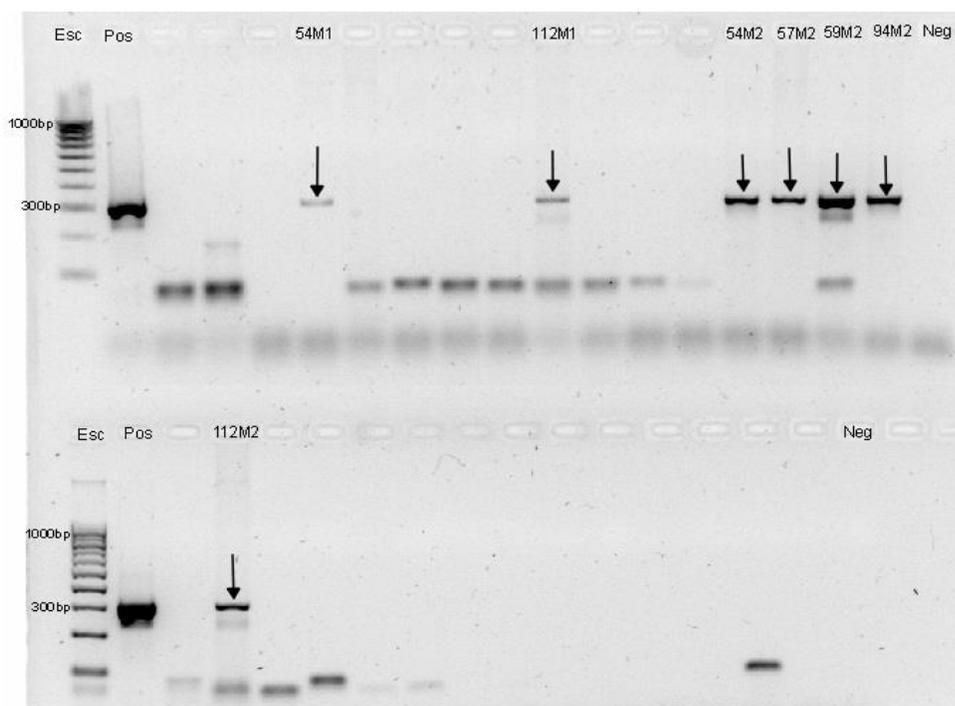


Figura 14. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de sedimento que amplificaron para el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

3.2.1 Detección de ADN de agentes patógenos en los estanques de cultivo de la granja 1

Se obtuvo un mayor número de estanques positivos a la presencia de ADN de los diferentes patógenos utilizando el ADNe a partir de muestras de sedimento (Tablas 4 y 5). Se detectaron más estanques positivos a los diversos patógenos en el segundo muestreo (Tabla 5). El ADNe de las muestras de agua y sedimento de los estanques 43 y 112 mostraron la presencia de IHHNV, MB y NHP (Tablas 4 y 5); por otro lado, los estanques 43, 57 y 112 fueron positivos a la presencia del ADN del virus que provoca DIV1 (Tabla 5). La mayoría de los estanques fueron positivos a más de un patógeno. Los nueve estanques de cultivo muestreados fueron positivos al agente viral IHHNV, mientras que, siete de ellos dieron positivo a la bacteria NHP. En menor medida, cuatro estanques mostraron la presencia del ADN de la bacteria causal de AHPND. Tres de los estanques fueron positivos a la presencia del ADN de DIV1. Sólo dos estanques dieron positivo a la presencia del ADN de MB y un estanque amplificó solo para BP (Figura 15).

Tabla 4. Detección de ADN de agentes patógenos por medio de PCR punto final en muestras de agua y sedimento del primer muestreo en la granja 1.

Enfermedad	Muestra de Agua	Muestra de Sedimento
IHHNV	32, 43, 57, 59 y 104	54 y 112
BP	Negativo	112
MB	43	Negativo
DIV1	Negativo	112
WSSV	Negativo	Negativo
NHP	Negativo	37, 43, 54, 57, 59, 104 y 112
AHPND	Negativo	Negativo
EHP	Negativo	Negativo

IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; BP-*Baculovirus penaei*; MB-*Monodon baculovirus*; DIV1-Virus iridiscente de los decápodos 1; WSSV-Virus del síndrome de la mancha blanca, NHP- Hepatopancreatitis necrotizante; AHPND-Necrosis aguda del hepatopáncreas y EHP-*Enterocytozoon hepatopenaei*.

Tabla 5. Detección de ADN de agentes patógenos por medio de PCR punto final en muestras de agua y sedimento del segundo muestreo en la granja 1.

Enfermedad	Muestra de Agua	Muestra de Sedimento
IHHNV	32, 37, 43, 54, 57, 59 y 94	54, 57, 59, 94 y 112
BP	Negativo	Negativo
MB	43	104
DIV1	43	57 y 112
WSSV	Negativo	Negativo
NHP	Negativo	54, 57, 59, 94 y 104
AHPND	Negativo	54, 57 y 112
EHP	Negativo	Negativo

IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; BP-*Baculovirus penaei*; MB-*Monodon baculovirus*; DIV1-Virus iridiscente de los decápodos 1; WSSV-Virus del síndrome de la mancha blanca, NHP- Hepatopancreatitis necrotizante; AHPND-Necrosis aguda del hepatopáncreas y EHP-*Enterocytozoon hepatopenaei*.

3.2.2 Detección de ADN de agentes patógenos en los estanques de cultivo de la granja 2

El sedimento fue el tipo de muestra que permitió una detección más sensible mediante la técnica de PCR y la mayoría de los estanques fueron positivos a un patógeno utilizando este tipo de muestra (Tablas 6 y 7). Se detectaron más estanques positivos en el primer muestreo, con respecto al segundo (Tabla 6). El ADN de las muestras de agua y sedimento del estanque 17 fueron positivas a IHHNV, BP y AHPND (Tablas 6 y 7). Además, el estanque 103 fue positivo a la presencia del ADN de MB y NHP, mientras que, el ADN de agua y sedimento del estanque 57 sólo amplificó para la presencia de MB (Tabla 7). La mitad de los estanques muestreados obtuvieron un resultado positivo al ADN de IHHNV y sólo dos estanques fueron positivos para la presencia del ADN de MB y NHP. Por otro lado, sólo un estanque resultó positivo para el ADN de BP y AHPND (Figura 16).

Tabla 6. Detección de ADN de agentes patógenos por medio de PCR punto final en muestras de agua y sedimento del primer muestreo en la granja 2.

Enfermedad	Muestra de Agua	Muestra de Sedimento
IHHNV	17, 33 y 87	Negativo
BP	Negativo	17
MB	Negativo	103
DIV1	Negativo	Negativo
WSSV	Negativo	Negativo
NHP	Negativo	103
AHPND	Negativo	17
EHP	Negativo	Negativo

IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; BP-*Baculovirus penaei*; MB-*Monodon baculovirus*; DIV1-Virus iridiscente de los decápodos 1; WSSV-Virus del síndrome de la mancha blanca, NHP-Hepatopancreatitis necrotizante; AHPND-Necrosis aguda del hepatopáncreas y EHP-*Enterocytozoon hepatopenaei*.

Tabla 7. Detección de ADN de agentes patógenos por medio de PCR punto final en muestras de agua y sedimento del segundo muestreo en la granja 2.

Enfermedad	Muestra de Agua	Muestra de Sedimento
IHHNV	Negativo	Negativo
BP	Negativo	Negativo
MB	57	57
DIV1	Negativo	Negativo
WSSV	Negativo	Negativo
NHP	Negativo	26 y 103
AHPND	Negativo	17
EHP	Negativo	Negativo

IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; BP-*Baculovirus penaei*; MB-*Monodon baculovirus*; DIV1-Virus iridiscente de los decápodos 1; WSSV-Virus del síndrome de la mancha blanca, NHP-Hepatopancreatitis necrotizante; AHPND-Necrosis aguda del hepatopáncreas y EHP-*Enterocytozoon hepatopenaei*.

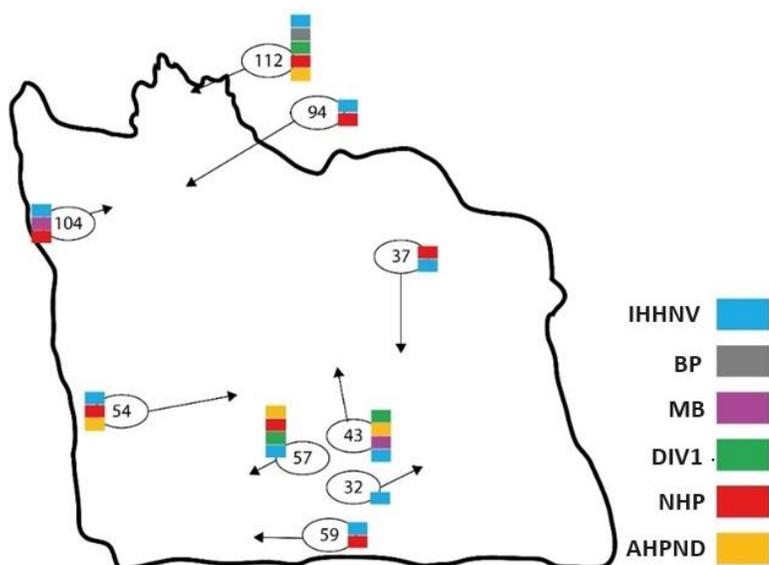


Figura 15. Mapa de la granja 1 indicando todos los estanques positivos a la presencia de ADN de los diferentes agentes patógenos. Donde el color azul indica positivo a IHHNV; el gris positivo a BP; el rosa positivo a MB; el verde positivo al DIV1; el rojo positivo a NHP y el naranja positivo a AHPND.

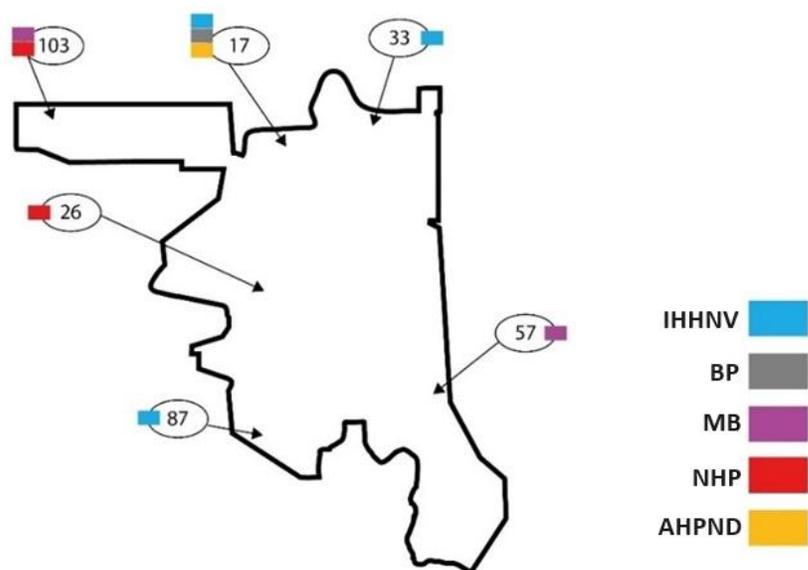


Figura 16. Mapa de la granja 2 con todos los estanques positivos a la presencia de ADN de los diferentes agentes patógenos. Donde el color azul indica positivo a IHHNV; el gris positivo a BP; el rosa positivo a MB; el rojo positivo a NHP y el naranja positivo a AHPND.

3.3 Presencia de los agentes patógenos en las muestras de agua y sedimento

En la primera granja, se observó una mayor presencia de ADN de los agentes patógenos en las muestras de agua y sedimento. El porcentaje de muestras positivas al ADN de IHHNV fue más elevado en el segundo muestreo, mientras que, el porcentaje de muestras positivas al ADN de MB permaneció constante (Figura 17). Durante el segundo muestreo el porcentaje de muestras donde se detectó DIV1 y AHPND fue mayor en sedimento. Adicionalmente, el porcentaje de muestras positivas al ADN de NHP fue más alto en el primer muestreo (Figura 18).

La mayoría de los patógenos identificados en la segunda granja fue en el ADN de sedimento y la presencia del ADN de BP y AHPND fue igual en el primer muestreo (Figura 20). Por otro lado, el porcentaje de muestras donde se detectó el ADN de NHP fue mayor en el segundo muestreo. El MB permaneció constante en los dos muestreos independientemente del ADN. Sólo se identificó IHHNV en las muestras de ADN de agua indicando que al menos en la mitad de los estanques muestreados se encuentra (Figura 19).

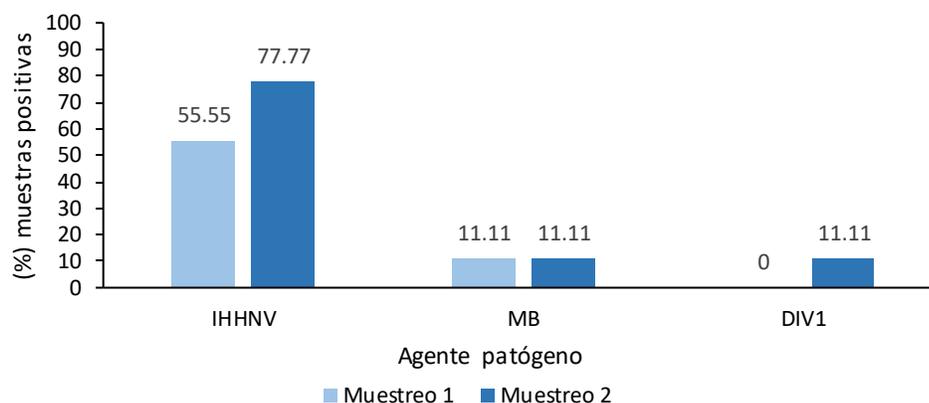


Figura 17. Porcentaje de muestras de ADN de agua positivas a agentes patógenos en los estanques de la granja 1.

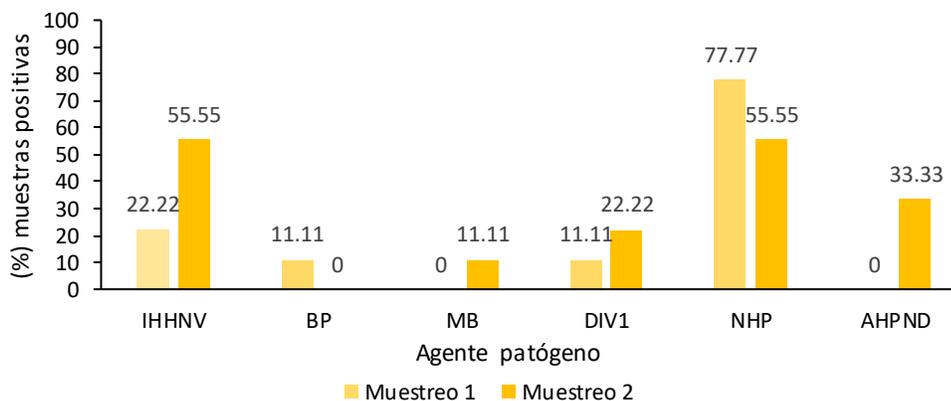


Figura 18. Porcentaje de muestras de ADN de sedimento positivas a agentes patógenos en los estanques de la granja 1.

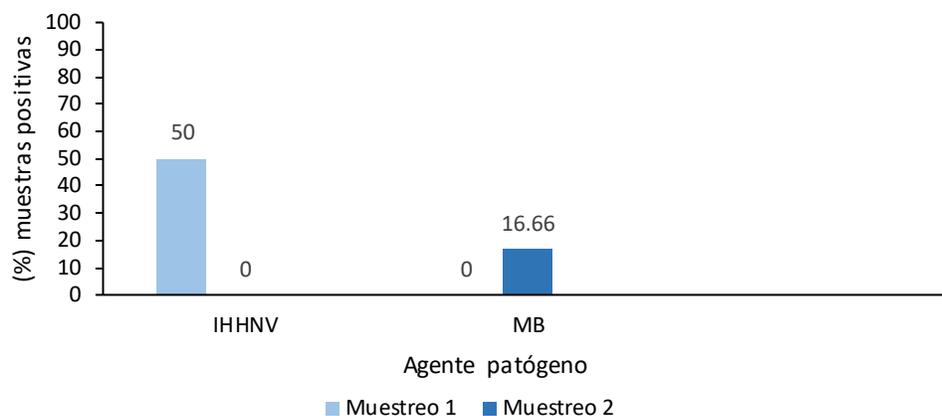


Figura 19. Porcentaje de muestras de ADNe de agua positivas a agentes patógenos en los estanques de la granja 2.

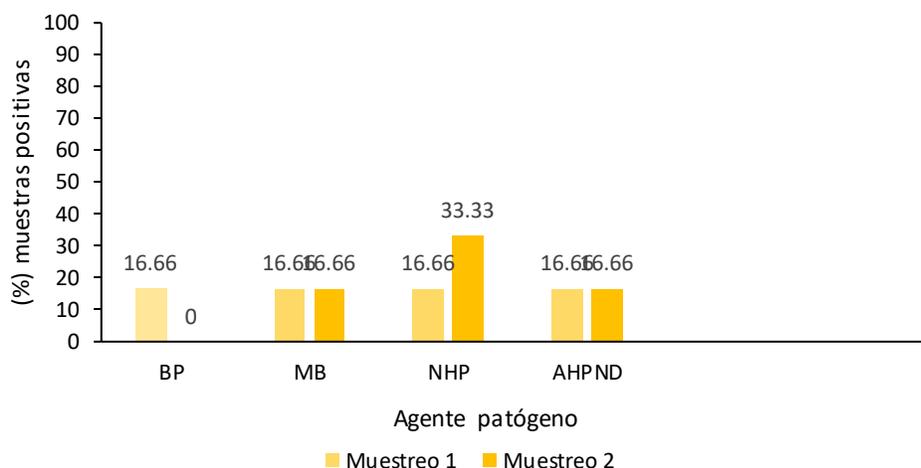


Figura 20. Porcentaje de muestras de ADNe de sedimento positivas a agentes patógenos en los estanques de la granja 2.

3.4 Alineamiento de las secuencias obtenidas por el método de Sanger

Se obtuvieron 13 secuencias consenso de los patógenos detectados mediante PCR. Se alinearon las secuencias “forward” y “reverse” para obtener consensos del tamaño esperado de IHHNV (N=3), MB (N=3), DIV1 (N=3), NHP (N=3) y AHPND (N=1). Los fragmentos consensos para IHHNV fueron de 267 bp, 270 bp y 296 bp. El tamaño de los fragmentos consensos para MB fue de 244 bp, 249 bp y 240 bp; mientras que, para DIV1 fueron de 188 bp. Para los patógenos bacterianos los tamaños de los fragmentos consensos fueron de 368 bp, 369 bp y 431 bp para NHP y de 149 bp para AHPND. En la Figura 21, se muestran los cromatogramas representativos de tres patógenos, mientras que el resto se puede consultar en el Anexo D.

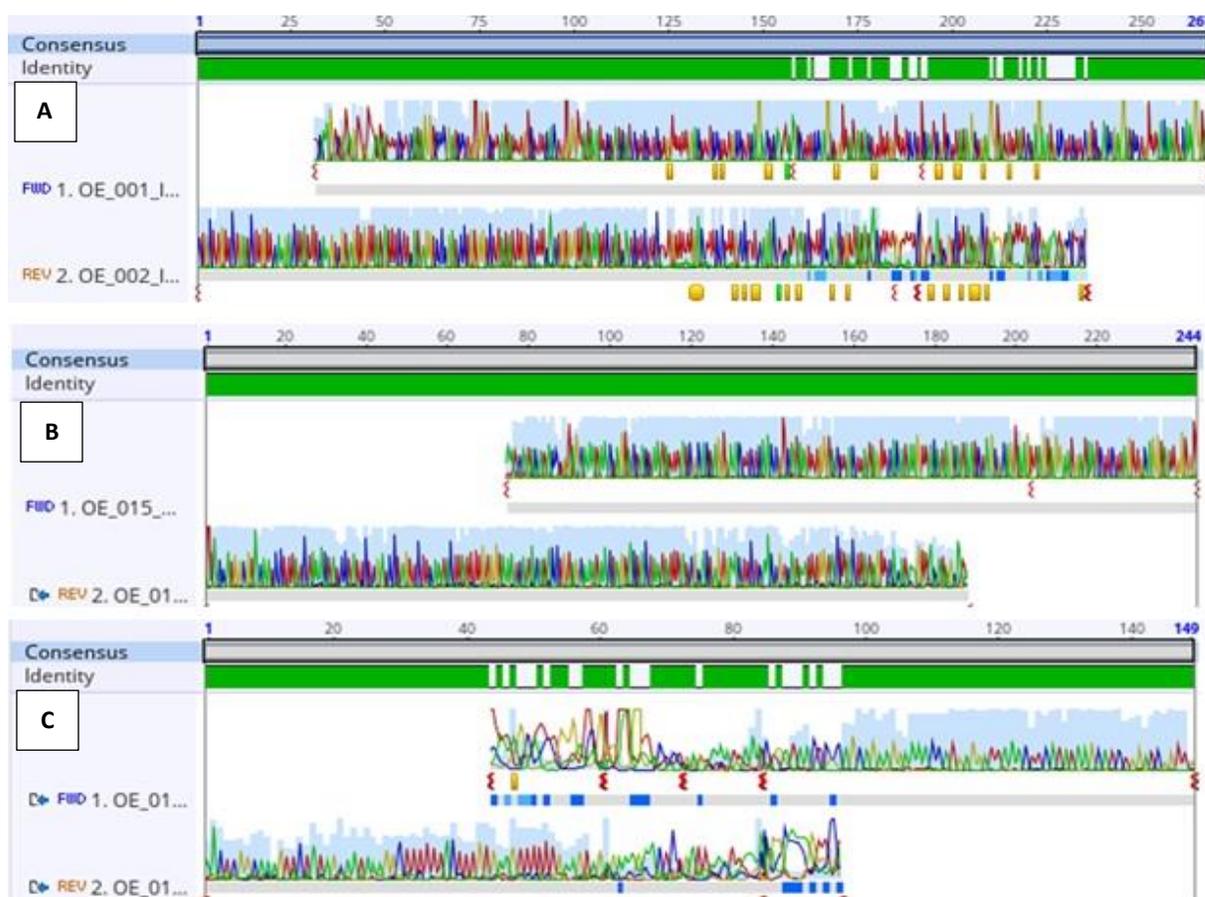


Figura 21. Alineamiento de las secuencias “forward” y “reverse” de IHHNV (A), MB (B) y AHPND (C). En la parte superior se observa la secuencia consenso, la cual indica el número de secuencias utilizadas para formarla. Por otro lado, la línea de color verde indica el porcentaje de identidad entre la secuencia “forward” y “reverse”.

3.5 Análisis de BLAST de la Secuenciación Sanger

Los resultados adquiridos mediante los análisis de BLAST confirman que las secuencias obtenidas por el método de Sanger corresponden a los patógenos identificados. En la Tabla 8, se denota el porcentaje de identidad, el cual, corresponde al número de pares de bases que son iguales entre la secuencia de una muestra y una secuencia de referencia. Mientras que, la cobertura señala el porcentaje de la secuencia de la muestra que se superpone a la secuencia de referencia.

Todas las muestras para los diferentes patógenos se encuentran dentro un rango de 100% y 92.91% de identidad. Adicionalmente, las coberturas de consulta oscilan entre 100% y 60%. Con esta información se puede sugerir un origen tentativo para estos patógenos (Tabla 8).

Además, se indica el país de procedencia de las secuencias de referencia. Con esta información, podemos señalar que para IHHNV, MB, DIV1 y AHPND, las cepas detectadas en las granjas 1 y 2 podría ser originarias de Asia, mientras que, para NHP, pueden proceder de Ecuador.

Tabla 8. Análisis de BLAST de la secuenciación Sanger. Para cada muestra se indica el patógeno detectado, porcentajes de identidad y cobertura, así como, el número del acceso del resultado más cercano en Genbank y el país de origen.

Enfermedad	Muestra	Porcentaje de identidad (%)	Cobertura de consulta (%)	Número de acceso	País
IHHNV	94M2G1	99.63	100	KY273368.1	Filipinas
	54M1G1	100	100	KY273368.1	
	112M1G1	92.91	100	KY273386.1	
MB	103M1G2	99.59	100	AY819785.2	Taiwán
	57M2G2	100	100	AY819785.2	
	104M2G1	99.17	100	AY819785.2	
DIV1	112M1G1	98.53	99	KY681040.1	China
	43M2G1	94.18	86	KY681040.1	
	57M2G1	100	60	KY681040.1	
NHP	104M1G1	100	100	MH230909.1	Ecuador
	59M2G1	99.46	100	MH230909.1	
	103M1G2	99.48	88	MH230908.1	USA
AHPND	57M2G1	97.32	100	MN480428.1	Vietnam

IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; MB-*Monodon Baculovirus*; DIV1-Virus iridiscente de hemocitos de camarón, NHP-Hepatopancreatitis necrotizante y AHPND-Necrosis aguda del hepatopáncreas.

3.6 Mapeo de las secuencias obtenidas de la secuenciación masiva

La secuenciación masiva de segunda generación generó 26846820, 22124540, 16548580, 21872324, 8363606, 1365109 y 1147460 lecturas para las muestras 103M1G2, 104M2G1, 57M2G1, 59M2G1, 94M2G1, 43M2G1 y 112M2G1, respectivamente. A las secuencias se les removieron los adaptadores y las secuencias de baja calidad generando 26778344, 22041064, 16498130, 21790400, 8351638, 2730218 y 2294920 lecturas para las muestras 103M1G2, 104M2G1, 57M2G1, 59M2G1, 94M2G1, 43M2G1 y 112M2G1. Después de realizar el mapeo a los patógenos correspondientes solamente se obtuvieron resultados positivos para AHPND y NHP. Un resultado no esperado fue el no detectar agentes virales.

Tabla 9. Mapeo de la muestra 57M2G1. Se indican los resultados de la detección de patógenos por medio de PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank.

Muestra	Enfermedad/patógeno	Resultado PCR	Número de secuencias mapeadas	Resultado del mapeo	Porcentaje de identidad (%)	Cobertura de Consulta (%)	Número de acceso
57M2G1	IHHNV	Pos	0	Neg			
	MB	Neg	554	Región repetida	-----	-----	-----
	BP	Neg	0	Neg			
	DIV1	Pos	0	Neg			
	<i>Vibrio</i>	Pos	152	<i>Vibrio parahemolyticus</i> plasmid pv	100	50	CP034308.1
				<i>Vibrio parahemolyticus</i> plasmid pv	100	100	CP034308.1
				<i>Vibrio parahemolyticus</i> plasmid pv	100	100	CP034308.1
	NHP	Pos	1052	<i>Rodospirillaceae bacterium</i>	82.91	97	CP030885.1
			Sulfitobacter	83.07	49	CP018076.1	

IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; MB-*Monodon Baculovirus*; BP-*Baculovirus penaei*, DIV1-Virus iridiscente de los decápodos 1, NHP-Hepatopancreatitis necrotizante.

Tabla 10. Mapeo de la muestra 59M2G1. Se indican los resultados de la detección de patógenos por medio de PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank.

Muestra	Enfermedad/patógeno	Resultado PCR	Número de Secuencias mapeadas	Resultado del mapeo	Porcentaje de identidad (%)	Cobertura de consulta (%)	Número de acceso
59M2G1	IHHNV	Pos	0	Neg			
	MB	Neg	238	Región repetida	-----	-----	-----
	BP	Neg	0	Neg			
	DIV1	Neg	0	Neg			
	<i>Vibrio</i>	Neg	3	<i>Vibrio parahemolyticus</i> pirB	100	50	MK368635.1
				<i>Vibrio parahemolyticus</i> plasmid pv			CP034308.1
	NHP	Pos	41	<i>Candidatus hydrogenosomobacter</i>	98.39	40	AP025225.1
			<i>Candidatus paracaedimonas</i>	78.79	41	CP008936.1	

IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; MB-*Monodon Baculovirus*; BP-*Baculovirus penaei*, DIV1-Virus iridiscente de los decápodos 1, NHP-Hepatopancreatitis necrotizante.

Tabla 11. Mapeo de la muestra 94M2G1. Se indican los resultados de la detección de patógenos por PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank.

Muestra	Enfermedad/patógeno	Resultado PCR	Número de secuencias mapeadas	Resultado del mapeo	Porcentaje de identidad (%)	Cobertura de Consulta (%)	Número de acceso
94M2G1	IHHNV	Pos	0	Neg			
	MB	Neg	197	Regiones repetidas	-----	-----	-----
	BP	Neg	0	Neg			
	DIV1	Neg	0	Neg			
	<i>Vibrio</i>	Neg	6	<i>Vibrio maritimus</i> plasmid	92.86	100	CP090440.1
				<i>Vibrio parahemolyticus</i> plasmid	100	100	CP064043.1
				<i>Vibrio parahemolyticus</i> plasmid pv	100	100	CP034308.1
	NHP	Pos	492	<i>Candidatus manganitrophus</i>	82.07	97	CP114561.1

IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; MB-*Monodon Baculovirus*; BP-*Baculovirus penaei*, DIV1-Virus iridiscente de los decápodos 1, NHP-Hepatopancreatitis necrotizante.

Tabla 12. Mapeo de la muestra 104M2G1. Se indican los resultados de la detección de patógenos por PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank.

Muestra	Enfermedad/patógeno	Resultado PCR	Número de secuencias mapeadas	Resultado del mapeo	Porcentaje de identidad (%)	Cobertura de consulta (%)	Número de acceso
104M2G1	IHHNV	Neg	0	Neg			
	MB	Pos	0	Neg			
	BP	Neg	677	Regiones repetidas	-----	-----	-----
	DIV1	Neg	0	Neg			
	<i>Vibrio</i>	Neg	2	<i>Enterovibrio norvegicus</i>	96.92	100	KP795652.1
				<i>Vibrio parahemolyticus</i>	100	98	CP034308.1
	NHP	Pos	0	Neg			

IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; MB-*Monodon Baculovirus*; BP-*Baculovirus penaei*, DIV1-Virus iridiscente de los decápodos, NHP-Hepatopancreatitis necrotizante.

Tabla 13. Mapeo de la muestra 103M1G2. Se indican los resultados de la detección de patógenos por PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank.

Muestra	Enfermedad/patógeno	Resultado PCR	Número de secuencias mapeadas	Resultado del mapeo	Porcentaje de identidad (%)	Cobertura de consulta (%)	Número de acceso
103M1G2	IHHNV	Neg	0	Neg			
	MB	Neg	437	Región repetida	-----	-----	-----
	BP	Pos	0	Neg			
	DIV1	Neg	0	Neg			
	Vibrio	Neg	4	Vibrio maritimus plasmid	92.92	100	CP090440.1
				Vibrio parahemolyticus plasmid	99.58	51	CP064043.1
				Vibrio parahemolyticus plasmid	100	100	CP034308.1
	NHP	Pos	2	No se encontró significativamente similar			
Granulibacter bethesdensis				73.49	97	CP018192.1	

IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; MB-Monodon Baculovirus; BP-Baculovirus penaei, DIV1-Virus de los decápodos 1, NHP-Hepatopancreatitis necrotizante.

Tabla 14. Mapeo de la muestra 43M2G1. Se indican los resultados de la detección de patógenos por PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank.

Muestra	Enfermedad/patógeno	Resultado PCR	Número de secuencias mapeadas	Resultado del mapeo	Porcentaje de identidad (%)	Cobertura de consulta (%)	Número de acceso
43M2G1	IHHNV	Neg	0	Neg			
	MB	Neg	0	Neg			
	BP	Neg	0	Neg			
	DIV1	Neg	0	Neg			
	<i>Vibrio</i>	Neg	1	<i>Vibrio parahemolyticus</i> plasmid	92.80	82	CP034308.1
	NHP	Pos	1	No se encontró significativamente similar			

IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; MB-*Monodon Baculovirus*; BP-*Baculovirus penaei*, DIV1-Virus iridiscente de los decápodos 1, NHP-Hepatopancreatitis necrotizante.

Tabla 15. Mapeo de la muestra 112M2G1. Se indican los resultados de la detección de patógenos por PCR y del mapeo. Se proporcionan el número de secuencias mapeadas, los porcentajes de identidad y cobertura de consulta, así como, el número de acceso de la secuencia más cercana en Genbank.

Muestra	Enfermedad/patógeno	Resultado PCR	Número de secuencias mapeadas	Resultado del mapeo	Porcentaje de identidad (%)	Cobertura de consulta (%)	Número de acceso		
112M2G1	IHHNV	Pos	0	Neg					
	MB	Neg	0	Neg					
	BP	Neg	0	Neg					
	DIV1	Pos	0	Neg					
	<i>Vibrio</i>		Neg	13	<i>Vibrio</i>	95.21	97	CP069236.1	
					<i>parahemolyticus</i>				
					<i>Vibrio</i>	100	84	CP034308.1	
					<i>parahemolyticus</i>				
					plasmid				
	<i>Vibrio</i>	98.31	78	CP034308.1					
<i>parahemolyticus</i>									
plasmid									
<i>Vibrio</i>	97.16	94	CP034308.1						
<i>parahemolyticus</i>									
plasmid									
<i>Vibrio</i>	95.05	100	CP034567.1						
<i>parahemolyticus</i>									
plasmid P1									
NHP	Neg	6	No se encontró significativamente similar						

IHHNV-Virus de necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética; MB-*Monodon Baculovirus*; BP-*Baculovirus penaei*, DIV1-Virus iridiscente de los decápodos 1, NHP-Hepatopancreatitis necrotizante.

Se confirmó la presencia de AHPND en las muestras considerando que las secuencias mapeadas al plásmido de virulencia presentaban una similitud en un rango de 100% a 92.92%. El número de secuencias mapeadas al plásmido de virulencia de AHPND varió de 152 a 1. Considerando que el porcentaje de similitud de las secuencias mapeadas al genoma de NHP fue variable no se puede confirmar mediante esta técnica la presencia del patógeno en las muestras. En la muestra 59M2G1 se mapearon 41 secuencias que presentaron un porcentaje de identidad del 98.39% con NHP y se puede considerar como positiva para este patógeno. Por otro lado, para la muestra 103M1G2 donde se mapearon 2 secuencias con un porcentaje de identidad del 73.49% se puede considerar como negativa para NHP utilizando esta técnica.

En las muestras 112M2G1 y 43M2G1 se mapearon 6 y 1 secuencias donde no se encontró una similitud significativa con otras. En las Tablas 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 se muestran los resultados del mapeo para cada una de las muestras.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Detección de ADN de agentes patógenos en el ambiente

Las muestras de agua y sedimento revelaron una compleja amalgama de material genético, la cual permitió la identificación de ADN de distintos patógenos en los estanques de cultivo de las dos granjas camaronícolas muestreadas. El ADNe se erige como una herramienta de gran potencial para contribuir al proceso de detección de agentes patógenos, al mismo tiempo que facilita la evaluación del riesgo asociado al desarrollo de enfermedades y su monitoreo en el ámbito de la acuicultura (Bass et al., 2015). El ADNe engloba tanto el ADN celular como el extracelular presentes en el entorno acuático (Pietramellara et al., 2009). En el caso específico de los estanques de cultivo, el ADNe presente en el agua se encuentra predominantemente conformado por material genético proveniente de macroorganismos (animales cultivados o presentes en los estanques), microorganismos pertenecientes a la microbiota (bacterias, microalgas), y también por el ADN derivado de la muerte celular de estos junto con sus productos de desecho (Creer et al., 2016). Por otra parte, el ADNe en sedimento se compone principalmente del ADN de materia orgánica, tales como restos de organismos (cadáveres de camarones muertos, zooplancton, nematodos), alimento no consumido, heces y antibióticos profilácticos (Barraza-Guardado et al., 2014; Musiazari et al., 2014). Este complejo mosaico genético brinda una visión integral de la diversidad biológica y de las interacciones en el ecosistema acuático, destacando la relevancia del ADNe como una herramienta clave en la gestión de la salud y la bioseguridad en la acuicultura. Considerando la disponibilidad de ADN proveniente de diferentes fuentes en dichos ambientes, es factible la detección de agentes patógenos como parásitos, bacterias, virus y microsporidios en el ambiente de cultivo del camarón (Bastos-Gomes et al., 2017; Sieber et al., 2020; Jun-Kiat et al., 2023; Schuster et al., 2023).

Los mecanismos de transmisión de agentes patógenos propician la presencia y persistencia de su material genético en los estanques dedicados al cultivo de camarón. Todos los patógenos considerados en este estudio exhiben la capacidad de transmisión horizontal, es decir, a través de prácticas como el canibalismo, la contaminación del agua y la excreción de heces (Lightner et al., 1996; Aranguren et al., 2010; Soto-Rodríguez et al., 2015; Qiu et al., 2017). Sin embargo, IHNV, BP y WSSV también se transmiten verticalmente, es decir, de hembras reproductoras infectadas a sus descendientes (transovárica) (Motte et al., 2003; Cuéllar-Anjel, 2015). En menor medida, existe la posibilidad de transmisión a través de

reservorios como son los nauplios de *Artemia* sp. durante el cultivo larvario, o el zooplancton y aves en la etapa de engorda (Vanpatten et al., 2004; Cuéllar-Anjel, 2015).

Es crucial señalar que los virus IHHNV, MB y WSSV demuestran una notoria resistencia y la capacidad de persistir en el entorno acuático (Shike et al., 2000; Cuéllar-Anjel, 2015). Un aspecto destacado radica en la presencia de bacterias del género *Vibrio* como parte integral de la flora microbiana en los estanques de cultivo de camarón, siendo importante reconocer que, en caso de cambios bruscos en los parámetros fisicoquímicos del agua, estas bacterias pueden fácilmente transformarse en patógenos oportunistas (Saulnier et al., 2000). En consideración de estos mecanismos de transmisión de agentes patógenos, es evidente que el ADN correspondiente a estos patógenos se encuentra de manera constante en el agua y el sedimento de los estanques de cultivo, subrayando la importancia de monitorear frecuentemente estos elementos para gestionar eficazmente la salud y bioseguridad en las granjas camaronícolas.

El ADN de los virus IHHNV, MB y DIV1 se identificó en muestras de agua y sedimento, mientras que, de BP, NHP y AHPND solamente se identificó en muestras de sedimento. El sedimento de los estanques aloja toda la materia orgánica e inorgánica del ciclo productivo en las granjas camaronícolas. Generalmente no es cambiado, ya que al terminar el período de producción únicamente es secado y en algunos casos, puede recibir tratamientos de cal para eliminar la existencia de microorganismos, incluyendo los patógenos (Boyd, 2017; Boyd, 2019). Por otro lado, el agua presente en los estanques está mayoritariamente compuesta por materia orgánica derivada de los propios individuos y sus subproductos de desecho. Este líquido experimenta renovaciones que oscilan entre el 10% y el 20% en sistemas de producción semi-intensivos (INAPESCA, 2018). Los ciclos de producción en ambas granjas tuvieron una duración en promedio de 5 meses; siendo que en la primera granja se realizaron dos ciclos productivos en el año y en la segunda uno. Asimismo, el período de secado de los estanques no fue idéntico entre ambas granjas y no se cuenta con información sobre la aplicación de algún tratamiento durante este tiempo. Considerando esta información, es viable pensar que el secado de los sedimentos de los estanques no fue suficiente para eliminar el ADN de los agentes patógenos que pudieron estar presentes durante el ciclo productivo anterior, a diferencia del agua, dónde al existir la práctica de recambio durante todo el ciclo de producción, la cantidad de ADN de los agentes patógenos pudo disminuir paulatinamente. De igual manera, debemos de considerar el tamaño de los viriones de IHHNV, MB y DIV1 que son de 0.02 μm , 0.079 μm , 0.15 μm (Lightner et al., 1983; Qiu et al., 2019; Pénczes et al., 2020) respectivamente, mientras que, las bacterias de NHP y AHPND tienen un diámetro de 0.32 μm y 0.8 μm (Frellet et al., 1992; UNAM, 2023), por lo que seguramente al ser partículas más grandes y de mayor peso se sedimentaron en la materia orgánica, mientras que, las partículas de los virus por ser más pequeñas se mantuvieron con más facilidad

suspendidas en el agua de los estanques. Los métodos empleados para obtener el ADN posiblemente influenciaron en los resultados; considerando que el ADN de los agentes patógenos se encontraba en menor proporción con respecto a otras partículas orgánicas en el agua no filtrada, mientras que, en el sedimento el ADN estaba en una mayor cantidad.

La cantidad de ADN ambiental (ADNe) obtenido de las muestras de agua y sedimento puede estar sujeta a diversas influencias. Pilliod y colaboradores (2013) registraron una concentración de ADNe inferior a 200 pg/L en muestras de salamandras de acuarios, sugiriendo que el ADNe extraído de las muestras de agua y sedimento de este estudio podría presentar concentraciones similares o inferiores. No obstante, la concentración de ADNe en el sedimento varió entre 4 y 14 ng/ μ l, mientras que en el agua osciló entre 10 y 30 ng/ μ l, con muestreos realizados de septiembre a noviembre. Es relevante señalar que estas concentraciones pueden variar a lo largo del año, como indican los hallazgos de Valdez-Moreno y colaboradores (2019), quienes reportaron cantidades comparables de ADNe en sedimento y agua durante diciembre y enero, pero observaron un incremento significativo en la cantidad de ADNe en sedimento en el mes de abril en comparación con el obtenido a partir de agua.

La cantidad de ADNe está influenciada por diversos factores, incluyendo su producción, transporte y degradación (Strickler et al., 2015), así como el método de muestreo y procesamiento de la muestra (Goldberg et al., 2016; Creer et al., 2016; Deiner et al., 2017). Aspectos adicionales, como la especie estudiada, la época del año, la ubicación del muestreo, la densidad de individuos y los factores ambientales, también desempeñan un papel significativo en la variabilidad de las concentraciones de ADNe (Pilliod et al., 2013; Strickler et al., 2015; Seymour et al., 2018; Valdez-Moreno et al., 2019). Considerar estos factores es crucial para interpretar con precisión los resultados y asegurar la validez de las conclusiones en estudios de ADNe.

Dentro de las ventajas de utilizar muestras de sedimento para la obtención de ADNe, podemos destacar, que se requieren máximo 2.5 g de sedimento fresco para los estudios dirigidos a la identificación de bacterias, protistas, hongos y virus (Gilbert et al., 2014; Pawloski et al., 2014; Creer et al., 2016). Mientras que, para obtener el ADNe a partir de muestras de agua se necesita al menos recolectar de 500 mL hasta 1 L de agua ya que generalmente se recomienda filtrar el agua para concentrar la materia orgánica (Sieber et al., 2020). Por otro lado, el método de muestreo utilizado en este estudio facilita la obtención de las muestras de sedimento, en cambio, la recolección de las muestras de agua se vio limitada a sólo muestrear la superficie de la columna a partir de las orillas de cada estanque. Las muestras de sedimento no requieren de un proceso de filtración para su procesamiento. La eficacia del kit DNAeasy PowerSoil para extraer

ADNe ha sido corroborada por Branelly y colaboradores (2020), ya que reportaron una mayor detección y cuantificación con respecto al uso de otros kits. Una desventaja considerable del uso de muestras de sedimento es que existe una gran posibilidad de contener el ADN de microorganismos que actualmente ya no se encuentran en el ambiente (Rouseel et al., 2015; Boyd, 2019). De igual manera, existen dos desventajas considerables del uso de muestras de agua, la primera es que, considerando los recambios de agua de los estanques de cultivo, la cantidad de ADN de los patógenos disminuye frecuentemente, y la segunda, es que el uso de bolsas de plástico estéril para recolectar las muestras represento la posibilidad de perder su contenido incluso en su totalidad durante el traslado al laboratorio. Pese a ello, se obtuvo ADNe de las muestras de agua con el que se pudo detectar ADN de diferentes patógenos exitosamente a partir de la técnica de PCR convencional.

La implementación del PCR convencional con condiciones universales se reveló como una estrategia eficiente para reducir significativamente el tiempo requerido en la detección de ADN de cada agente patógeno en este estudio. El diseño de los primers, en términos generales, se ajusta a su propósito específico y a la plataforma para la cual están destinados (Sandoval-Rodríguez et al., 2013). Un factor crucial en dicho diseño es la temperatura de fusión (T_m), la cual asegura la completa activación de los primers y su precisa unión a la cadena molde de ADN; una T_m similar entre los primers garantiza una eficiente amplificación de estos (Sandoval-Rodríguez et al., 2013). En el contexto de este estudio, los primers diseñados exhiben una T_m que abarca un rango de 54°C a 64°C; sin embargo, la T_m seleccionada para las pruebas de funcionalidad fue de 60°C, demostrando resultados positivos. Mantener una T_m alta aumenta la especificidad de la prueba reduciendo los resultados falsos positivos. La técnica de PCR convencional empleada apropiadamente (condiciones y diseño de los primers) puede ser hasta en un 100% sensible y específica (Sandoval-Rodríguez et al., 2013).

La estandarización del programa para la PCR se reveló como una estrategia eficaz, ya que permitió la ejecución simultánea de todas las muestras con los primers, independientemente de la enfermedad asociada con el ADN que se buscó detectar. Este enfoque no solo optimizó la eficiencia del proceso, sino que también generó un ahorro considerable de horas de trabajo en el laboratorio, simplificando notablemente el protocolo. Además, se destacó la alta sensibilidad de esta herramienta molecular frente al ADN proveniente de muestras de sedimento, obteniendo resultados positivos en la detección del ADN de diversos agentes patógenos en los cultivos de las granjas camaronícolas. La aplicación de esta técnica no solo aceleró la identificación de ADN patógenos específicos, sino que también resaltó su utilidad como una herramienta sensible y eficaz en el monitoreo de la salud en entornos camaronícolas.

4.2 Presencia del ADN de los patógenos detectados

Los estanques de engorda de camarón son ambientes donde interactúan diversos factores que favorecen la presencia de agentes patógenos. La temperatura, pH, salinidad, oxígeno disuelto pueden afectar la comunidad microbiana de los estanques, provocando un desajuste en su equilibrio y favoreciendo la aparición de agentes patógenos (Tenecota-Paucar et al., 2018). De forma general, un incremento en la temperatura del agua puede representar un estímulo estresor y generar un aumento del consumo de oxígeno disuelto por los camarones. Una condición estresante puede afectar el sistema inmune de los camarones, disminuyendo sus defensas ante un patógeno oportunista (Puente, 2009). De acuerdo con lo reportado por Montgomery-Brock y colaboradores (2007) y Cuellar-Anjel (2015) la replicación de los virus de IHNV, BP y WSSV puede ser favorecida por un rango de temperatura de 22°C hasta 24°C, mientras que, DIV1 persiste a una temperatura máxima de 32°C (Qiu et al., 2019). Por otro lado, las temperaturas superiores a 29°C durante periodos largos favorecen la presencia de NHP y AHPND (Morales-Covarrubias, 2008; NACA, 2014). Considerando que la temperatura es un factor ambiental que favorece la replicación y persistencia de los agentes patógenos, podemos determinar que en nuestro estudio la mayoría del ADN de los patógenos diana permanecieron en los estanques de cultivo al encontrarse en un rango de temperatura de 25°C a 29°C. Por otra parte, ante la detección de WSSV se consideró como una estrategia disminuir la salinidad de los estanques de cultivo camaronícolas para reducir su capacidad infecciosa, pese a ello, se demostró que aún a bajas concentraciones de salinidad (5 y 15 g/L), el virus seguía infectando a los organismos (Ochoa et al., 2006; Carbajal et al., 2008). No obstante, Godínez-Siorda y colaboradores (2012) reportaron que al combinar una temperatura de 33°C y una salinidad de 15 g/L en juveniles de *P. vannamei* expuestos a WSSV obtuvieron una supervivencia del 65%. Las bacterias causantes de NHP y AHPND de forma natural requiere de sal para su desarrollo (Rodríguez-Camacho et al., 2014), por lo que una salinidad de 20 ppm a 38 ppm favorece su presencia en el ambiente (Morales-Covarrubias, 2008; Estrada-Pérez et al., 2020) Para IHNV, BP, MB, DIV1 no existen estudios donde se correlacione directamente la salinidad con la presencia de las enfermedades. El porcentaje de muestras positivas al ADN de los seis agentes patógenos encontrados en la granja 1 fue superior de forma general con respecto a la granja 2, lo que puede atribuirse fácilmente a los factores ambientales presentes en los estanques de cultivo, además de las condiciones del manejo de cultivo al sólo existir un ciclo productivo en la segunda granja. Por otro lado, en la primera granja, existen dos ciclos anuales de cultivo. Otros factores por considerar son la presencia constante de aves e inclusive de ejemplares de camarón silvestres dentro de los cultivos.

Los agentes patógenos pueden diseminarse y permanecer fácilmente en los cultivos camaronícolas a través de factores externos a las condiciones del cultivo. La infección provocada por IHNV y BP puede presentarse de forma tardía, ocasionando que los organismos infectados no presenten signos y se conviertan en portadores pasivos que puedan infectar al resto de la población de los estanques de cultivo, así como, también en caso de ser reproductores puedan incluirse erróneamente en programas para su reproducción (Montgomery-Brock et al., 2007; Guevara y Alfaro, 2012; Durán-Cobo, 2016). Aunque los camarones afectados por el WSSV pueden presentar un estadio subclínico, resulta improbable que pasen desapercibidos durante su cultivo. Sin embargo, se ha corroborado la transmisión de este virus a través del plancton presente en los estanques hacia organismos sanos, como se evidenció en investigaciones previas (Hernández-López et al., 2020). Este fenómeno destaca la importancia de comprender la dinámica de la propagación del WSSV. Por otro lado, de forma general se puede contemplar la posibilidad de que todos estos agentes patógenos puedan encontrarse en ejemplares silvestres que tengan la facilidad de incorporarse en los estanques de cultivo de las granjas camaronícolas. De acuerdo con Overstreet y colaboradores (1988) el virus de BP puede infectar hasta seis especies diferentes de camarones peneidos, mientras que, para el virus de WSSV no se ha reportado a ningún crustáceo decápodo resistente a este (OMSA, 2023). Una variedad de especies dentro de los camarones, langostinos y langostas son susceptibles a la infección provocada por el virus de DIV1 (OMSA, 2023). Por otro lado, el *Vibrio parahaemolyticus* puede ser hospedado por una gran variedad de peces, moluscos y crustáceos (Su y Liu, 2007).

En este estudio se consideró el número de muestras positivas al ADN de cada patógeno en ambas granjas para poder determinar su presencia, por lo que, es ideal que los resultados obtenidos se discutan con investigaciones de la misma índole. Sin embargo, hasta la actualidad no hay literatura al respecto, así que nos enfocamos en el porcentaje de muestras positivas para cada agente patógeno. La prevalencia de IHNV puede variar de 0% hasta un 100%, sin embargo, los valores promedios reportados son de 46% y 57% en *P. stylirostris* para el golfo de California (Pantoja et al., 1999; Morales-Covarrubias et al., 1999). Considerando los resultados obtenidos en este estudio, podemos asumir que la carga viral haya sido alta en el ambiente y que el ADN de este patógeno persistió fuertemente. Además, las condiciones ambientales, así como, el manejo de los estanques favoreció su presencia. Durán-Cobo (2016) reportó que la prevalencia de BP en ejemplares adultos de *P. vannamei* de cinco granjas en Ecuador fue tan sólo del 2%; mientras que, en este estudio su presencia fue de hasta 16%. Por otro lado, se ha registrado una prevalencia de MB en granjas semi-intensivas de *Penaeus monodon* en India que oscila entre el 18% y el 42%, según investigaciones anteriores (Vijayan et al., 1995). No obstante, en el presente estudio, se observa un porcentaje de muestras positivas inferior, lo cual resulta relevante al considerar que se trata de una especie diferente de camarón peneido. De acuerdo con lo reportado por Morales-Covarrubias y

colaboradores (2011), la prevalencia de WSSV en ocho países latinoamericanos fue del 21.7%, obteniendo inclusive una máxima de 40% en Honduras. No hay estudios previos que aborden la prevalencia de DIV1. Sin embargo, en el curso de esta investigación, observamos porcentajes de presencia de ADN del 11% y 22%. Estas cifras podrían atribuirse a las condiciones ambientales y al manejo de reproductores/post-larvas. Es importante señalar que no existen estudios en Latinoamérica que aborden la presencia de este patógeno. Por ende, la obtención de resultados positivos mediante PCR convencional y confirmación mediante secuenciación Sanger confirma la presencia de su ADN en México. Aunque el porcentaje de muestras positivas para DIV1 es bajo en comparación con el ADN de otros patógenos detectados en este estudio, su hallazgo subraya la necesidad de confirmar su presencia (infección) en los camarones cultivados y estudios más extensos para comprender, en su caso, la dinámica de este agente patógeno en la región. Es destacable la presencia de ADN de NHP en nuestro estudio, ya que anteriormente se han reportado prevalencias de 15% y 17% en poblaciones silvestres (Aguirre-Guzmán et al., 2010) y tan sólo del 25% en el cultivo de *P. vannamei* en México (Morales-Covarrubias et al., 2011). Por último, Rubio-Limonta y colaboradores (2020) reportaron una prevalencia promedio del 29.3% de AHPND en granjas semi-intensivas camaronícolas en Cuba para los meses de septiembre a diciembre, mientras que, en este estudio la presencia del ADN de este patógeno se detectó en el 33% de las muestras.

4.3 Identificación de AND de patógenos específicos mediante NGS

La secuenciación Sanger de productos de PCR con ADNe es una herramienta molecular con potencial de apoyo para la gestión sanitaria en el campo de la camaronicultura. La secuenciación Sanger es un método estándar que desde 1977 se utiliza para identificar las variaciones en el ADN; sin embargo, actualmente no es tan popular como la NGS (Rubio et al., 2020). A pesar de sus limitaciones, la técnica molecular presenta una precisión notable y se destaca por su formato de análisis sencillo. No obstante, es importante tener en cuenta que su uso está condicionado por los costos operativos asociados y la cantidad relativamente reducida de lecturas en comparación con otras plataformas disponibles (Pinilla-Bermúdez, 2019). En la actualidad, la secuenciación de productos de PCR obtenidos de ejemplares con signos clínicos o sospechosos de tener una enfermedad en particular está indicada como una herramienta de diagnóstico confirmativo viable, sensible y específico por la OMSA para las enfermedades de IHHNV, BP, MB, WSSV, NHP y AHPND. En el caso de DIV1, sólo se considera para un diagnóstico presuntivo (OMSA, 2023). Los resultados de la secuenciación de los productos de PCR a partir de ADNe demostraron una concordancia con los resultados obtenidos por PCR punto final, lo que podría ser indicador de la confiabilidad y

especificidad de ambas herramientas para la identificación de ADN de agentes patógenos en los cultivos camaronícolas.

La NGS es una herramienta molecular que puede ser utilizada a partir de ADN como un método de identificación de ADN de patógenos bacterianos en el cultivo camaronícola. La NGS tiene la capacidad de secuenciar una gran cantidad de fragmentos de ADN, así como, de tener una baja tasa de error durante el proceso (Pinilla-Bermúdez, 2019). La plataforma de Illumina es de las dos más utilizadas hoy en día, ya que sus costos de operación son relativamente bajos, así como, que cuentan con una amplia gama de instrumentos (Rubio et al., 2020). No obstante, la precisión de su lectura es determinada por la intensidad de la señal y número de ciclos. La NGS puede verse limitada por la generación de errores en productos de PCR amplificados, principalmente en las regiones que tienen una gran cantidad de guanina-citosina (Ulahannan et al., 2013). De igual forma, la longitud corta de las secuencias dificulta su análisis (Vig y Wang, 2012). Los estudios que utilizan la NGS a partir de ADN y mapeo de genomas de referencia en ambientes marinos principalmente van dirigidos a la rama de la metagenómica, por lo que, son escasos aquellos que tienen una dirección al mismo enfoque que este estudio. En el caso de la acuicultura, de forma general, en los últimos cuatro años si bien han empezado a utilizar el ADN para poder detectar ADN de agentes patógenos, lo han hecho a través de herramientas moleculares como el PCR de gota digital (ddPCR) y qPCR (Sieber et al., 2020; Mérour et al., 2020; Jun-Kiat et al., 2023; Schuster et al., 2023) sin abordar el potencial del uso de la NGS. Por otro lado, Ríos-Castro y colaboradores (2022) reportaron la identificación de ADN del parásito *Perkinsus olseni* en muestras ambientales de agua y sedimento utilizando la NGS, sin embargo, para poder detectar su proliferación activa en los animales combinaron el ADN con el ADN obtenido de diferentes tejidos, siendo todavía más sensible y específica la técnica. En este estudio se logró identificar exitosamente a *V. parahaemolyticus* agente patógeno causante de AHPND en las granjas de camarón por medio del mapeo de genomas de referencia; sin embargo, para las enfermedades virales no se obtuvieron lecturas. Existen diferentes factores que pudieron influir directamente sobre los resultados, tales como los kits utilizados para la extracción del material genético y los kits de amplificación genómica completa, ya que están diseñados a partir de bacterias, generando un efecto sinérgico que tenga predilección por la detección de agentes bacterianos. Otros factores que pueden considerarse son la degradación del ADN ambiental, ya que comienza a descomponerse de forma inminente tras el muestreo, lo cual se atribuye a la actividad de las nucleasas, fuerzas mecánicas e inclusive reacciones químicas espontáneas (Nielsen et al., 2007). Además, los resultados de secuenciación por NGS pueden ser afectados por el método de muestreo, procesamiento de la muestra, amplificación, purificación, cuantificación y profundidad de secuenciación (Gihring et al., 2012; Clooney et al., 2016).

La aplicación de la secuenciación Sanger y la tecnología de NGS a partir de ADN ofrece una nueva perspectiva en la identificación de agentes patógenos en la acuicultura. En términos generales, estas dos herramientas moleculares aún no han sido exhaustivamente exploradas en el ámbito acuícola, lo que sugiere un amplio campo de investigación por descubrir. Aunque métodos de identificación convencionales, como el PCR y qPCR a partir de ADN o ARN directamente de los organismos, ofrecen resultados oportunos y eficientes, es importante considerar que sus protocolos pueden obstaculizar la cadena productiva y aumentar los costos asociados. En comparación, las técnicas de secuenciación ofrecen la capacidad de procesar simultáneamente múltiples muestras utilizando un único protocolo y equipo, si bien su principal limitación reside en el tiempo requerido para obtener un resultado. Los resultados de este estudio respaldan el potencial de estas herramientas; no obstante, al tratarse de ADN, no pueden considerarse indicativas de la presencia de una enfermedad en los camarones del cultivo (MacAulay et al., 2022). Sin embargo, la combinación de ADN extraído y tejido de organismos infectados podría permitir la identificación más precisa de la presencia activa de la infección.

4.4 Importancia del desarrollo de metodologías de diagnóstico de enfermedades para el cultivo camaronícola

Los avances tecnológicos de los métodos de diagnóstico de agentes patógenos que provocan enfermedades en la industria camaronícola han vuelto más segura la salud de los cultivos. El diagnóstico es el arte de identificar una enfermedad a través de los síntomas y signos clínicos que sufre un individuo (RAE, 2001; Coronado-Hurtado, 2015); sin embargo, al aplicarse en animales únicamente se consideran los signos clínicos detectados tras un examen físico general. La aplicación del diagnóstico en la acuicultura es un proceso diferente, donde en primera instancia se observa el comportamiento y apariencia de los especímenes cultivados. No obstante, las condiciones fisicoquímicas del agua, así como, los factores ambientales pueden dificultar este proceso (MacAuley et al., 2022). En el área de la camaronicultura, antes de 1993, solamente se utilizaban los métodos de diagnóstico de enfermedades tradicionales, tales como la observación de los signos clínicos, la observación al microscopio de tejidos frescos, microbiología, histología e histoquímica (De la Rosa-Vélez y Bonami, 2006). Los métodos de diagnóstico de enfermedades como la observación del comportamiento y condición corporal de los individuos tienden a tener una sensibilidad y especificidad bajas (Earle et al., 2014); pese a ello, son muy baratos de costear y el tiempo de detección es lento (Zeldis y Prescott, 2000). Por otra parte, los métodos como la microscopía, histología, histoquímica y actualmente la teledetección (Oh et al., 2017), son métodos que implican el desarrollo del

“ojo clínico” ya que requieren de personal capacitado y experimentado para tener un resultado certero (Shinin et al., 2010; Ferguson et al., 2014). La histología e histoquímica son métodos de diagnóstico de enfermedades con sensibilidad y especificidad bajas. La microscopía electrónica de transmisión, no obstante, tienen un menor costo de operación (De la Rosa-Vélez y Bonami, 2006). Así mismo, los métodos de identificación bacteriana como la microbiología son selectivos y susceptibles a la contaminación (Evelyn et al., 1987; Stewart et al.; 2017); además, también necesitan de un período largo de tiempo para su procedimiento. Adicionalmente, no todos los patógenos del camarón son cultivables en medios específicos o en líneas celulares. Otros métodos que forman parte de esta rama son los bioquímicos y de serología; sin embargo, no son muy empleados en el campo acuícola (Jaramillo et al., 2017; Pawluk et al., 2019). De forma general, estos métodos tradicionales pueden ser fácilmente burlados por agentes patógenos que tienen un largo período de incubación, así como, aquellos que pueden permanecer en los organismos de forma asintomática.

El uso de sondas genéticas moleculares para la identificación del parvovirus causante de HHNV fue el parteaguas para el diagnóstico de la enfermedad en el cultivo camaronícola (Mari et al., 1993). Las herramientas moleculares para contribuir en el diagnóstico de enfermedades tienen una gran variedad de ventajas sobre los métodos tradicionales, tales como, una sensibilidad, especificidad y eficacia altas; además con el paso de los años se han vuelto económicamente más accesibles (Ríos-Castro et al., 2021; JunKiat et al., 2023). La técnica de PCR convencional, así como el qPCR necesitan de cebadores específicos para que sea exitosa la identificación de los agentes patógenos (Ríos-Castro, et al., 2022), pese a ello, un efecto negativo de su aplicación es la presencia de inhibidores en muestras ambientales (Porter y Hajibabaei, 2018). Actualmente, la NGS facilita el análisis de miles de secuencias obtenidas, además de garantizar una identificación rápida y confiable de los microorganismos presentes en la muestra; incluso es más seguro para el operador al no exponerlo a reactivos químicos y disminuye el tiempo de su jornada laboral (Ercolini, 2013). El uso de ADNe para detectar ADN de patógenos en el ambiente es un método no invasivo que facilita la recolección de datos de su prevalencia (Hall et al., 2015; Branelly et al., 2020). El desarrollo de los métodos de detección de agentes patógenos en el campo de la camaronicultura a través de los años ha facilitado de forma dramática el diagnóstico oportuno, eficiente, preciso y ha permitido el desarrollo de medidas zoonosológicas, así como, de la vigilancia del estado de salud de los cultivos.

La importancia de este estudio radica en ser el primero en detectar ADN de agentes virales y bacterianos en el ambiente de cultivo de *P. vannamei* usando tres diferentes herramientas moleculares: PCR convencional, secuenciación Sanger y la NGS con mapeo a genomas de referencia. De forma general, el manual de diagnóstico para enfermedades de los animales acuáticos (OMSA, 2023) estipula los métodos

de detección aceptados mundialmente para cada uno de los agentes causales de las enfermedades presentes en este estudio. La forma más convencional de estas herramientas moleculares es el PCR punto final, el cual, se destacó por ser sensible y específico para las muestras de ADN_e a partir del sedimento. Además de ser un método de detección confiable, presenta la ventaja de ser menos costoso en cuanto a los insumos y más rápido de efectuar en tiempo. Es sumamente destacable que el programa estandarizado para el termociclador beneficia al operador, facilitando la corrida de las muestras y ahorrando tiempo en el laboratorio. Por otro parte, dentro de las desventajas de esta herramienta, es que pueden darse falsos positivos ya sea por la contaminación de las muestras con otras o de la contaminación de los reactivos. La secuenciación Sanger se realizó a partir de productos de PCR positivos con la finalidad de respaldar los resultados obtenidos por PCR convencional. Los resultados indicaron que ambas herramientas fueron eficientes y sensibles para detectar al ADN de los agentes patógenos en el agua y sedimento de los estanques en las granjas, pese a ello, debe de considerarse que la Secuenciación Sanger fue más costosa y tardada al depender del laboratorio Eton Bioscience (USA). Actualmente la única enfermedad que puede ser confirmada oficialmente por secuenciación de productos de PCR a partir de ADN_e es la Girodactilosis, la cual es provocada por el ectoparásito *Gyrodactylus salaris* que afecta a diferentes especies de peces (OMSA, 2022). Así que, este trabajo es un parteaguas para considerar la detección de agentes patógenos a partir de ADN_e en el ámbito acuícola y principalmente, dentro de la industria camaronícola.

La NGS y el mapeo a genomas de referencia a partir de ADN_e es una herramienta poco explorada para contribuir al diagnóstico acuícola. Hasta la fecha, los trabajos publicados sobre el uso de la NGS para detectar a un agente patógeno en organismos acuáticos a partir del ADN_e en combinación del ADN de tejido se dirigen principalmente a peces y moluscos bivalvos dejando de lado a los crustáceos; aunado a esto, varios de ellos no se dirigen a especies de alto valor comercial e impacto económico a nivel mundial. De tal manera, que existe un gran espacio para la investigación. La industria camaronícola es altamente rentable y de gran impacto a nivel mundial por lo que es necesario prescindir de estudios dirigidos a esa rama. En este estudio, el uso de la NGS junto con el mapeo de genomas de referencia obtuvo un resultado destacable al ser posible detectar a *V. parahaemolyticus* causante de AHPND a partir de ADN_e, pese a ello, la cantidad de lecturas obtenidas fue muy baja. Esto puede atribuirse a diferentes factores como son la degradación del ADN_e, los kits utilizados para su obtención e inclusive la plataforma de secuenciación utilizada. No obstante, representa un punto de partida para continuar investigando sobre su potencial como herramienta de apoyo al diagnóstico de enfermedades bacterianas en el cultivo camaronícola. Esta herramienta molecular representa la posibilidad de una identificación simultánea de ADN de diferentes agentes patógenos. Además, de que ser muy útil para la vigilancia zoonosológica de los cultivos, permitiendo una detección temprana de los posibles agentes patógenos y facilitando las medidas de control sanitario.

Capítulo 5. Conclusiones

Se estandarizó la extracción de ADN a partir de muestras de agua y sedimento. Es importante destacar que la concentración de ADN obtenido a partir de sedimento fue menor con respecto a las muestras de agua, lo cual, posiblemente se relacione con la cantidad de muestra utilizada para realizar la extracción.

La detección del ADN de un agente patógeno específico en muestras de agua y sedimento es factible mediante la aplicación de la técnica de PCR convencional y secuenciación Sanger. En términos generales, se logró identificar el ADN de seis agentes patógenos, observándose un número superior de detecciones en las muestras de sedimento en comparación con las muestras de agua. Esta disparidad podría atribuirse a la capacidad del sedimento, como un depósito no perturbado de materia orgánica e inorgánica en los estanques de cultivo, para preservar de manera más efectiva el ADN de los agentes patógenos.

La presencia del ADN de los agentes identificados en las granjas puede relacionarse con diversos factores, tales como las condiciones fisicoquímicas del agua, la presencia de alimento contaminado, la posible infección de las postlarvas sembradas, la introducción de organismos silvestres al cultivo y el proceso de secado de los estanques entre cada ciclo de producción. Es importante señalar que los porcentajes de presencia varían significativamente reflejando la influencia de factores locales y temporales en la distribución y propagación de estos agentes patógenos.

Los resultados derivados del mapeo a los genomas de referencia permitieron la confirmación de la presencia de ADN correspondiente al plásmido de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus*, el cual es el agente causal de la Necrosis Hepatopancreática Aguda.

No se logró la identificación simultánea de ADN de virus, bacterias y hongos a nivel de ADN, asociados a enfermedades en la acuicultura del camarón mediante la NGS.

Por último, contemplando los resultados obtenidos a partir de PCR convencional, secuenciación Sanger y NGS podemos concluir que estas técnicas al ser combinadas con ADN tienen el potencial de utilizarse para la detección temprana y seguimiento de ADN de agentes patógenos en agua y sedimentos de estanques de cultivo de camarón.

Capítulo 6. Recomendaciones

Para futuras investigaciones, se sugiere utilizar botellas de plástico estériles de 500 mL a 1 L para la toma de muestras de agua. Esta elección facilitará la recolección y transporte, al mismo tiempo que reducirá el riesgo de contaminación y pérdida del líquido. Además, se recomienda el uso de filtros para concentrar la materia orgánica de las muestras.

Se aconseja realizar la extracción de ADN en un plazo máximo de 24 horas después del muestreo para evitar su degradación. Además, se sugiere realizar dos o tres extracciones de ADN a partir de una muestra, con el objetivo de obtener una concentración más elevada para los procedimientos de PCR, secuenciación Sanger y NGS.

Para las granjas, es recomendable que el sedimento de los estanques de cultivo sea removido, al menos 10 cm, esto es con la finalidad de evitar la humedad durante el periodo de secado y que disminuya el contenido de materia orgánica e inorgánica presente (Boyd, 2019). Además, debe de alargarse el período de secado entre los ciclos productivos, de un mes hasta tres meses como mínimo. Y de ser posible económicamente, que se utilice el tratamiento de cal tras el periodo de secado de los estanques, de acuerdo con las recomendaciones de Boyd (2017).

Literatura citada

- Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M. y Boonham, N. (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 10(4), 537-545. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2009.00545.x>
- Aguirre-Guzmán, G., Sanchez-Martínez, J. G., Pérez-Castañeda, R. y Orta-Rodríguez, R. (2010). Detection of necrotizing hepatopancreatitis (nhp) in wild shrimp from Laguna Madre, Mexico by a multiplex polymerase chain reaction. *The Thai Journal of Veterinary Medicine* 40(3), 337–341. <https://he01.tj-thaijo.org/index.php/tjvm/article/view/35745>
- Appleford, P., Lucas, J. y Southgate, P. (2012). General Principles, intensity of aquaculture. Aquaculture, farming aquatic animals and plants (John S. Lucas y Paul C. Southgate, ed). Editorial Willey-Blackwell. (2da ed.).
- Aranguren, L. F., Tang, K. F. J. y Lightner, D. V. (2010). Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture* 307, 187–192. <https://www.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.022>
- Aranguren, L. F., Han, J. E., Tang, K. F. J. (2017). *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and septic hepatopancreática necrosis (SHPN) in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 471, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.038>
- Barraza-Guardado, R. H., Martínez-Cordova, L. R., Enríquez-Ocaña, L. F., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A. y Porchas-Cornejo, M. A. (2014). Efecto de efluentes de granjas camaronícolas sobre parámetros de la calidad del agua y del sedimento frente a la costa de Sonora, México. *Ciencias marinas* 40(4), 221-235. <https://doi.org/10.7773/cm.v40i4.2424>
- Bonami, J. R., Trumper, B., Mari, J., Brehelin, M. y Lightner, D. V. (1990). Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *Journal of General Virology* 71, 2657-2664. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-11-2657>
- Bonami, J. R., Bruce L., Poulos B. T., Mari J. y Lightner, D. V. (1995). Partial characterization and cloning of the genome of PvSNPV (= BP-type virus) pathogenic for *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23, 59–66.
- Boyd, C. E. (2017). La cal desempeña un papel crucial en el manejo de estanques acuícolas. Global Aquaculture Advocate. <https://www.globalseafood.org/advocate/la-cal-desempena-un-papel-crucial-en-el-manejo-de-estanques-acuicolas/>
- Boyd, C. E. (2019). La preparación del estanque de camarones es crucial para la producción y prevención de enfermedades. Global Aquaculture Advocate. <https://www.globalseafood.org/advocate/la-preparacion-del-estanque-de-camarones-es-crucial-para-la-produccion-y-prevencion-de-enfermedades/>
- Branelly, L. A., Wetzel, D. P., Ohmer, M. E. B., Zimmerman, L., Sáenz V. y Richards-Zawacki, C. L. (2020). Evaluating environmental DNA as a tool for detecting an amphibian pathogen using an optimized extraction method. *Oecologia* 194, 267-281. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04743-4>

- Brock, J. y Lightner, D. V. (1990). Diseases of Crustacea. In Diseases of Marine Animals, Vol III, Kinne O. (ed). Hamburg: Inter-Research.
- Carbajal, I., Castro, R. y Grijalva, M. (2008). Experimental white spot syndrome virus challenge of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone) at different salinities. *Aquaculture Research*. 39(15), 1588-1596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02030.x>
- Chayaburakul, K., Nash, G., Pratanpipat, P., Sriurairatana, S. y Withyachumnarnkul, B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms* 60(2), 89-96. <https://doi.org/10.3354/dao060089>
- Chen, X., Qiu, L., Wang, H., Zou, P., Dong, X., Li, F. y Huang, J. (2019). Susceptibility of *exopalaemon carinicauda* to the infection with shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV 20141215), a strain of decapod iridescent virus 1(DIV1). *Viruses* 11(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/v11040387>
- Clooney, A. G., Fouhy, F., Sleator, R. D., O Driscoll, A., Stanton, C., Cotter, P. D. y Claesson, M. J. (2016). Comparing apples and oranges? Next generation sequencing and its impact on microbiome analysis. *PLoS ONE* 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148028>
- CONAPESCA, Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. (2021). Anuario estadístico de acuicultura y pesca de México. Sinaloa, México. <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca>
- Coronado-Hurtado, T. (2016). Diagnóstico médico. *Biociencias* 11(1), 69-73. <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/biociencias/article/view/2872>
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, F. L., Briese, T., Horning, M., Geiser, D. M., Martinson, V., Vanengelsdorp, D., Kalkstein, A. L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui L., Hutchison, S., Simons, J. F., Egholm, M., Pettis, J. S. y Lipkin, W. I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283-287. <https://doi.org/10.1126/science.1146498>
- Creer, S., Deiner, K., Frey, S., Porazinska, D., Taberlet, P., Thomas, W. K., Potter, C. y Bik, H. M. (2016). The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution* 7(9), 1008-1018. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12574>
- Cruz-Flores, R., Mai, H. N., Kanrar, S., Aranguren, C. L. y Dhar, A.K. (2020). Genome reconstruction of White spot síndrome (WSSV) from archival Davidson's-fixed paraffin embedded shrimp (*Penaeus vannamei*) tissue. *Scientific reports nature research* 10, 13425. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.11.009>
- Cruz-Flores, R., Mai, H. N. y Dhar, A. K. (2021). Complete genome reconstruction and genetic analysis of Taura syndrome virus of shrimp from archival Davidson's-fixed paraffin embedded tissue. *Journal of Virology* 553, 117-121. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.11.009>
- Cuéllar-Anjel, J. (2023). Enfermedad de las manchas blancas. The Center for Food Security & Public Health. Institute for international Cooperation in Animal biologics. Iowa State University. <chrome-extension://efaidnbmnncnqepkpgkbfjnlcomgclgeahcnn/hhttps://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/white-spot-disease-es.pdf>
- Cuéllar-Anjel, J. (2015). Baculovirus tetraédrica. The Center for Food Security & Public Health. Institute for international Cooperation in Animal biologics. Iowa State University. <chrome-extension://efaidnbmnncnqepkpgkbfjnlcomgclgeahcnn/>

[extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tetrahedral-baculovirus-es.pdf](https://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tetrahedral-baculovirus-es.pdf)

- Deiner, K., Bik, H. M., Machler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A. y Altermatt, F. (2017). Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26, 5872-5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- De la Rosa-Vélez, J. y Bonami, J.R. (2006). Detección molecular de enfermedades virales que afectan el desarrollo del cultivo del camarón. *Hidrobiología* 16(3), 275-293. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-88972006000300009&script=sci_arttext
- Dey, B. K., Dugassa, G. H., Hinzano, S. M. y Bossier, P. (2019). Causative agent, diagnosis, and management of white spot disease in shrimp: A review. *Reviews in Aquaculture* 12, 822–865. <https://doi.org/10.1111/raq.12352>
- Dhar, A.K., Cruz-Flores, R., Caro, L. F. A., Siewiora, H. M., y Jory, D. (2019). Diversity of single-stranded DNA containing viruses in shrimp. *Virus Disease* 30, 43–57. <https://doi.org/10.1007/s13337-019-00528-3>
- Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2018). Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018
- Durán-Cobo, G. M. (2016). Evaluación patológica de *Litopenaeus vannamei* cultivados en granjas ubicadas en el estuario del Río Chone (Ecuador). *AquaTIC* 44, 30-42. https://www.redalyc.org/journal/494/49449812003/html/#redalyc_49449812003_ref8
- Durand, S. V. y Lightner, D. V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of White spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases* 25(7), 381-389. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00367.x>
- Earle, G. e Hintz, W. (2014). New approaches for controlling *Saprolegnia* parasitica, the causal agent of a devastating fish disease. *Tropical Life Sciences Research*, 25(2), 101. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4814142/>
- Estrada-Pérez, N., Ruíz-Velazco, J. M. J., Magallón-Barajas, F. J., Campa-Córdoba, Á. I. y Hernández-Llamas, A. (2020). Modelo de stock dinámico para analizar la producción semi-intensiva de camarón patiblanco *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* afectado por la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda: Evaluación de indicadores de gravedad de la enfermedad y relaciones con los parámetros de Calidad de agua del estanque. *Aquaculture Research* 51(1), 242-254. <https://doi.org/10.1111/are.14370>
- Evelyn, T., Bell, G., Prospero-Porta, L., Ketcheson, J. (1989). A simple technique for accelerating the growth of the kidney disease bacterium *Renibacterium salmoninarum* on a commonly used culture medium (KDM2). *Diseases of Aquatic Organisms* 7, 231–234. <https://www.doi.org/10.3354/dao007231>
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022). El estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. <https://www.fao.org/publications/home/fao-flagship-publications/the-state-of-world-fisheries-and-aquaculture/es>

- Ferguson, H. W, Kabuusu, R., Beltran, S., Reyes, E., Lince, J.A., y del Pozo, J. (2014). Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): a case report. *Journal of Fish Diseases*. 37(6), 583-589. <https://www.doi.org/10.1111/jfd.12142>.
- Figueredo, A., Patti, J. y De la Fuente, R. (2019). Evaluación del desempeño reproductivo de una cepa domesticada de *Penaeus vannamei* en una maduración comercial. *Aquatic* 53, 18-31. <https://www.redalyc.org/journal/494/49460634002/html/>
- Frelief, P. F., Sis, R. F., Bell, T. A. y Lewis, D. H. (1992). Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing Hepatopancreatitis in Pacific White shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Veterinary Pathology* 4. 269-277. <https://doi.org/10.1177/030098589202900401>
- García-Hernández, A., Chavacán-Ávila, M. L. y Castro-Fuentes, L. A. (2011). Capítulo 9 Zootecnia acuícola. Introducción a la zootecnia (María Trujillo-Ortega ed) UNAM. (2da ed.). México.
- Gervais, N. y Zeigler, T. (2014). Hyper-intensive nursery systems offer advantages for shrimp culture. *Global Aquaculture Advocate* 17(1), 26-29. <https://www.globalseafood.org/advocate/hyper-intensive-nursery-systems-offer-advantages-for-shrimp-culture/>
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K. y Knight, R. (2014). The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biology* 12(69). <https://www.doi.org/10.1186/s12915-014-0069-1>
- Gihring, T. M., Green, S. J. y Schadt, C. W. (2012). Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environmental microbiology*. 14(2), 285-290. <https://www.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02550.x>.
- Godínez-Siorda, D. E., González-Ochoa, O., Hernández-Díaz A., García-Triana, A., Gamboa-Delgado, J., Arce-Ibarra, J. G. y Godínez-Siorda, E. M. (2012). Principales patógenos virales de camarón en América y su relación con ambientes de baja salinidad. *Ra Ximhai Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable* 8(3), 61-69. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46125176005>
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thompsen, P. F., Murphy, M. A., Spear, F. S., Mckee, A., Oylar-McCance, S. J., Cornman, R. S., Laramie, M. B., Mahon, A. R., Lance, R. F., Pilliod, D. S., Strickler, K. M., Waits, L. P., Fremier, A. K., Takahara, T., Herder, J. E. y Taberlet, P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution* 7(11), 1299-1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>
- Guevara, M. y Alfaro, R. (2012). Patógenos introducidos al Perú en post larvas de *Litopenaeus vannamei* importadas. *Revista de Perú Biología*. 19(2), 181-186. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332012000200009&script=sci_abstract
- Hall, E. M., Crespi, E. J., Goldberg, C. S. (2015) Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations. *Molecular Ecology Resources* 16, 423-433. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12461>
- Han, J. E., Tang, K. F. J., Tran, L. H. y Lightner, D. V. (2015). Photorabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of aquatic organisms* 113(1), 33-40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>

- Harvell, C. D., Mitchell, C. E., Ward, J. R., Altizer, S., Dobson, A. P. y Ostfeld, R. S. (2002). Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296, 2158-2162. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1063699>
- Hernández De Lira, I.O., Huber, D., Luévanos-Escareño, M., Hernández-Terán, F., Sáenz-Mata, J. y Balagurusamy, N. (2014). Capítulo Metagenómica: *Concepto y Aplicaciones en el Mundo Microbiano. Fronteras en Microbiología Aplicada*. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila. México.
- Hernández-López, J., Coronado-Molina, D. E., Santos-Romo, Á. y Gollas-Galván, Teresa. (2020). Dinámica de transmisión de virus de la mancha blanca en estanques de cultivo de camarón. *Revista Ciencia, tecnología e innovación para el desarrollo de México* 178. <https://pcti.mx/articulos/dinamica-de-transmision-de-virus-de-la-mancha-blanca-en-estanques-de-cultivo-de-camaron/>
- Huver, J. R., Koprivnikar, J., Johnson, P. T. J. y Whyard, S. (2015). Development and application of an eDNA method to detect and quantify a pathogenic parasite in aquatic ecosystems. *Ecological Society of America* 25(4), 991-1002. <https://doi.org/10.1890/14-1530.1>
- INAPESCA, Instituto Nacional de Pesca (2018). Acuicultura camarón blanco del Pacífico. <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-camaron-blanco-del-pacifico>
- Jaramillo, D., Peeler, E. J., Laurin, E., Gardner, I. A., Whittington, R. J. (2017). Serology in finfish for diagnosis, surveillance, and research: a systematic review. *Journal of Aquatic Animal Health* 29(1), 1–14. <https://www.doi.org/10.1080/08997659.2016.1244577>
- Jones, W. J. (2010). High-Throughput sequencing and metagenomics. *Estuaries and Coasts* 33, 944-952. <https://doi.org/10.1007/s12237-009-9182-8>
- Jun-Kiat E. O., Nair, T., Sobana, M., Tze-Hann, Ng., Domingos, J. A. y Gomes-Bastos, G. (2023). Identification of scale drop disease virus based on environment DNA in an aquaculture facility of Singapore. *Aquaculture* 536, 738993. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738993>
- Kalagayan, H., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweeney, J., Wyban, J. y Brock, J. (1991). IHHN virus as an etiological factor in Runt-Deformity Syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society* 22(4), 235–243. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1991.tb00740.x>
- Kearse M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*.28(12), 1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Lahens, N. F., Ricciotti, E., Smirnova, O., Toorens, E., Kim, E. J., Baruzzo, G., Hayer, K. E., Ganguly, T., Schug, J. y Grant, G. R. (2017). A comparison of Illumina and Ion Torrent sequencing platforms in the context of differential gene expression. *BMC Genomics* 18, 602. <https://doi.org/10.1186/s12864-01740110>
- Lightner, D. V., Redman, R. M. y Bel, T. A. (1983). Observations on the geographic distribution pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 32(3 y 4), 209-233. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90220-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90220-X)
- Lightner, D.V. (1996). *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society 1st edition. USA.

- Lightner, D.V., Redman, R. M., Pantoja, C. R, Tang, K. F. J., Noble, B. L., Schofield, P., Mohny L. L., Nunan, L. M. y Navarro S. M. (2012). Historic emergence, impact, and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology* 110(2), 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.006>
- MacAulay, S., Ellison, A. R., Kille, P. y Cable, J. (2022). Moving towards improved surveillance and earlier diagnosis of aquatic pathogens: From traditional methods to emerging technologies. *Aquaculture* 14(14), 1813-1829. <https://doi.org/10.1111/raq.12674>
- Mari, J., Bonami, J. R. y Lightner, D. (1993). Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *Journal of General Virology* 74(12), 2637-2643. <https://doi.org/10.99/0022131774122637>
- Méndez, G. M. (1981). Claves de identificación y distribución de los langostinos y camarones (Crustacea: Decapoda) del mar y ríos de la costa del Perú. Instituto del mar del Perú. Boletín 5. <https://hdl.handle.net/20.500.12958/1028>
- Mérou, N., Lecadet, C., Pouvreau, S. y Arzul, I. (2020). An eDNA/eRNA-based approach to investigate the life cycle of non-cultivable shellfish micro-parasites: the case of *Bonamia ostreae*, a parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Microbial Biotechnology* 13(6), 1807-1818. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13617>
- Miranda-Baeza A., Huerta-Rábago, J. A. y Lizárraga-Armenta, J. A. (2018). Cultivo intensivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con tecnología de biofloc (BFT). En: Fundamentos de Innovación Tecnológica en Acuicultura Intensiva. Oficina de Generación del conocimiento y la información, Autoridad Nacional de Acuicultura y pesca AUNAP.
- Montgomery-Brock, D., Tacon, A. G. J., Poulos, B. y Lightner, D. V. (2007). Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture* 265, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.025>
- Morales-Covarrubias, M. S., Nunan, L. M., Lightner, D. V., Mota-Urbina, J. C., Garza-Aguirre, M. C. y Chavez-Sanchez, M. C. (1999). Prevalence of IHHNV in wild broodstock of *Penaeus stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health* 11, 296–301. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1999\)011<0296:POIHAH>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1999)011<0296:POIHAH>2.0.CO;2)
- Morales-Covarrubias, M. S. (2008). Capítulo 3: Enfermedades bacterianas. *Patología e Inmunología de Camarones* (Vielka Morales y Jorge Cuellar-Angel ed.) Programa CYTED Red II-D vannamei. Panamá.
- Morales-Covarrubias, M. S., Ruíz-Luna, A., Moura-Lemus, A. P., Solís-Montiel, V. T. y Conroy, G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. *Revista científica* 21(5), 434-446. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95919362010>
- Morales-Covarrubias, M. S. y Gómez-Gil B. (2014). Capítulo 3. Enfermedades bacterianas de camarones. Guía Técnica, Patología e Inmunología de camarones penaeidos (Vielka Morales y Jorge Cuéllar-Anjel, ed.) OIRSA. (2da ed.). Guatemala.
- Motte, E., Yugcha, E., Luzardo, J., Castro, F., Leclercq, G., Rodríguez, J., Miranda, P., Borja, O., Serrano, J., Terreros, M., Montalvo, K., Narváez, A., Tenorio, N., Cedeño, V., Mialhe, E. y Boulo, V. (2003).

- Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 219, 57–70. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572009000300012>
- Muziasari, W. I., Managaki, S., Pärnänen, K., Karkman, A., Lyra, C., Tamminen, M., Suzuki, S. y Virta, M. (2014). Sulphonamide and trimethoprim resistance genes persist in sediments at Baltic sea aquaculture farms but are not detected in the surrounding environment. *PLOS ONE* 9(3), e92702. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0092702>
- NACA, Network of aquaculture centres in Asia-Pacific (2014). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Card. <https://enaca.org/?id=722>
- Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D. y Daffonchio, D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research* 6(1-2), 37–53. <https://doi.org/10.1051/ebr:2007031>
- Oakey, J., Smith C., Underwood, D., Afsharnasab, M., Alday-Sanz, V., Dhar, A., Sivakumar, S., Hamed, A. S., Beattie, K. y Crook, A. (2019). Global distribution of white spot syndrome virus genotypes determined using a novel genotyping assay. *Archives of Virology* 164(8), 2061–2082. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04265-2>
- Ochoa, A., Santos, A. y Unzueta, M. (2006). Efecto del WSSV sobre camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado experimentalmente a bajas salinidades. *Industria acuícola* 2(3), 4-8.
- Oh, C. Y., Ahn, K., Park, J., Park, S. W. (2017). Coastal shallow-water bathymetry survey through a drone and optical remote sensors. *Journal Korean Society Coast Oceanology Engineering*. 29(3), 162-168. <https://www.doi.org/10.9765/kscoe.2017.29.3.162>
- OMSA, Organización Mundial de Sanidad Animal (2022). Uso de los métodos de AND Ambiental (ADNa) para la detección de las enfermedades de los animales acuáticos de la lista de la OMSA. <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.woah.org/app/uploads/2022/07/edna-final-esp.pdf>
- OMSA, Organización Mundial de Sanidad Animal (2023). Enfermedades animales. https://www.woah.org/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/enfermedades-animales/?tax_animal=acuaticos%2Ccrustaceos
- OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. (2019). Baculovirus esférica (Baculovirus de *Penaeus monodon*). https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/current/chapitre_spherical_baculovirus.pdf
- OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. (2019). Baculovirus tetraédrica (*Baculovirus penaei*). https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/current/chapitre_tetrahedral_baculovirus.pdf
- Overstreet, R. M., Stuck, K. C., Krol, R. A. y Hawkins, W. E. (1988). Experimental infections with *Baculovirus penaei* in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) as a bioassay. *Journal of the World Aquaculture Society* 19(4), 175-187. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1988.tb00778.x>

- Pantoja, C. R., Lightner, D. V. y Holtschmit, H. K. (1999). Prevalence and geographic distribution of IHNN parvovirus in wild penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of California, Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health* 11, 23–3.
- Pantoja, C. R. y Lightner, D. V. (2014). Capítulo 2. Enfermedades virales del camarón. *Guía Técnica, Patología e Inmunología de camarones penaeidos* (Vielka Morales y Jorge Cuéllar-Anjel, ed.) OIRSA. (2da ed). Guatemala.
- Pawlowski, J., Esling, P., Lejzerowicz, F., Cedhagen, T. y Wilding, T. A. (2014). Environmental monitoring through protist next-generation sequencing metabarcoding: assessing the impact of fish farming on benthic foraminifera communities. *Molecular Ecology Resources* 14, 1129–1140. <https://www.doi.org/10.1111/1755-0998.12261>.
- Pawluk, R. J., Stuart, R., Garcia De Leaniz, C., Cable, J., Morpew, R. M., Brophy, P. M. y Consuegra, S. (2019). Smell of infection: a novel, noninvasive method for detection of fish excretory-secretory proteins. *Journal of Proteome Research* 18(3), 1371–1379. <https://www.doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00953>
- Pénzes, J. J., Söderlund-Venermo, M., Canuti, M., Eis-Hübinger, A. M., Hughes, J., Cotmore, S. F. y Harrach, B. (2020). Reorganizing the family *Parvoviridae*: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Archives of Virology* 165 (9), 2133–2146. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04632-4>
- Peña-Navarro, N. y Varela-Mejías, A. (2016). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas en el camarón blanco *Penaeus vannamei* cultivado en el Golfo Nicoya, Costa Rica. *Revista de biología marina y Oceanografía* 51(3): 553-564. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-19572016000300007
- Pérez-Farfante, I. (1969). Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. *Fishery Bulletin*; 67(3), 461-591. <http://hdl.handle.net/1969.3/18940>
- Pérez-Farfante I. y Kensley, B. (1997). Keys and diagnoses for the families and genera. Penaeoid and sengeroid shrimps and prawns of the world. *Mémoires du Muséum National d' Histoire Naturelle*, 233.
- Peters, L., Spatharis S., Dario, M. A., Dwyer, T., Roca, I. J. T, Kintner, A., Kanstad-Hanssen, O., Llewellyn, M. S. y Praebel, K. (2018). Environmental DNA: A new low-cost monitoring tool for pathogens in salmonid aquaculture. *Frontiers in Microbiology* 9, 3009. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03009>
- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgoni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G y Nannipieri, P. (2009). Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils* 45, 219-235. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S. y Waits, L. P. (2013). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources* 14(1), 109-116. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12159>
- Pinilla-Bermúdez, G. (2019). *Biología Molecular: ADN recombinante y sus aplicaciones*. Editorial Manual Moderno. Bogotá, Colombia.

- Platas-Rosado, D. E. y Vilaboa-Arroniz, J. (2014). La Acuicultura mexicana: potencialidad, retos y áreas de oportunidad. *Revista Mexicana de Agronegocios* 35, 1065-1071. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14131676015>
- Porter, T. M. y Hajibabaei, M. (2018). Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular Ecology* 27(2), 313-338. <https://doi.org/10.1111/mec.14478>
- Qiu, L., Chen, M. M., Wan, X. Y., Li, C. y Zhang, Q. (2017). Characterization of a new member of Iridoviridae, Shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Scientific Reports* 7, 11834. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10738-8>
- Qiu, L., Chen, M. M., Wan, X. Y., Zhang, Q. L., Li C., Dong, X., Yang, B. y Huang, J. (2018a). Detection and quantification of shrimp hemocyte iridescent virus by Taq-Man probe based real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology* 154, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.04.005>
- Qiu, L., Chen, M. M., Wang, R. Y., Yuan, X., Chen, W., Qing, L., Zhang, L. y Dong, X. (2018b). Complete genome sequence of shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV) isolated from white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Archives of Virology* 163(3) 781–785. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3642-4>
- Qiu, L., Chen, X., Zhao, R., Li, C., Gao, W., Zhang, Q. y Huang, J. (2019). Description of a natural infection with Decapod Iridescent Virus 1 in farmed giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Viruses* 11(4), 354. <https://doi.org/10.3390/v11040354>
- Rajendran, K.V., Makesh, M., y Karunasagar, I. (2012). *Monodon baculovirus* of shrimp. *Indian Journal of Virology* 23(2), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s13337-012-0086-z>
- Ray, A. J., Dillon, K. S., y Lotz, J. M. (2011). Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. *Aquacultural Engineering*, 45 (3), 127-136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.09.001>
- Real Academia Española (2001). Diccionario de la lengua española (22va ed.). <https://www.rae.es/drae2001/diagn%C3%B3stico>
- Ríos-Castro, R., Aranguren, R., Romero, A., Banchi, E., Pallavicini, A., Novoa, B. y Figueras, A. (2022). Assessment of the environmental distribution of the protozoan parasite *Perkinsus olseni* by next-generation sequencing, qPCR and histopathology allows the identification of alternative bivalve hosts. *Aquaculture* 552, 737984. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737984>
- Ríos-Castro, R., Romero, A., Aranguren, R., Pallavicini, A., Banchi, E., Novoa, B. y Figueras, A. (2021). High-Throughput Sequencing of Environmental DNA as a Tool for Monitoring Eukaryotic Communities and Potential Pathogens in a Coastal Upwelling Ecosystem. *Frontiers in Veterinary Science* 8, 765606. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.765606>
- Ríos-Castro, R., Aranguren, R., Romero, A., Banchi, E., Pallavicini, A., Novoa, B. y Figueras, A. (2022). Assessment of the environmental distribution of the protozoan parasite *Perkinsus olseni* by next-generation sequencing, qPCR and histopathology allows the identification of alternative bivalve hosts. *Aquaculture* 552. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737984>

- Rodríguez-Santiago, B. y Armengol, L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico prenatal* 23(2), 56-66. <https://doi.org/10.106/j.diapre.2012.02.001>
- Rodríguez-Camacho, J. C., Méndez-Gómez, E., Rivas-Montaña, A. M. y Cortés-Ruiz, J. A. (2016). Evaluación de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. *Revista Bio Ciencias* 2(4), 282-292. <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.02.04.06>
- Roussel, J. M., Paillisson, J. M., Tréguier, A. y Petit, E. (2015). The downside of eDNA as a survey tool in water bodies. *Journal of Applied Ecology* 52(4), 823-826. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12428>
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Gómez, A. M., Perdomo, S. y García-Robles, R. (2020). DNA Next-Generation Sequencing (NGS): Present and future in clinical practice. *Universitas Medica* 61(2), 1-15. <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed61-2.sngs>
- Rubio-Limonta, M., Silveira-Coffigny, R., Hernández-Martínez, D. A., Pérez-Beloborodova, A. y Pozo-Escobar, M. (2020). Prevalencia de enfermedades en el camarón de cultivo *L. vannamei* en Cuba. *Revista cubana de investigaciones pesqueras* 37(2), 57-65. <http://hdl.handle.net/1834/41620>
- Saavedra-Olivos K. Y. (2016). Caracterización molecular de la microbiota bacteriana en la hemolinfa de langostinos (*Litopenaeus vannamei*), sanos y enfermos en base a técnicas de aislamiento, co-cultivo y metagenómica [tesis de maestría, Universidad Nacional de Tumbes]. Repositorio Institucional CONCYTEC. <https://hdl.handle.net/20.500.12390/212>
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (2015). Análisis de las cadenas productivas del sistema producto camarón en el litoral del pacífico mexicano. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/347534/Camaron_Reporte_Ejecutivo.pdf
- Sandoval-Rodríguez, A. S., Meza-Ríos, A. y Floresvillar-Mosqueda, J. F. (2013). Capítulo 16 Reacción en cadena de la polimerasa. *Biología molecular, fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (Salazar-Montes A. M., Sandoval-Rodríguez A. S. y Armendáriz-Borunda J. ed) Mc Graw Hill. México.
- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, P., Levy, P. y Ansquer, D. (2000). Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191, 133-144. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00423-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00423-3)
- Schuster, C. J., Murray, K. N., Sanders, J. L. y Kent, M. L. (2023). Application of an eDNA assay for the detection of *Pseudoloma neurophilia* (Microsporidia) in zebrafish (*Danio rerio*) facilities. *Aquaculture* 564, 739044. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739044>
- Seymour M, Durance I, Cosby, B. J., Ransom-Jones, E., Deiner, K., Ormerod, S. J., et al. (2018). Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications Biology* 1(4). <https://doi.org/10.1038/s42003-017-0005-3>
- Shike, H., Dhar, A. K., Burns, J., Shimizu, C., Jousset, F. X., Klimpel, K. R. y Bergoin, M. (2000). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses. *Virology* 277(1), 167-177. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0589>
- Shinn A. P., Collins, C., García-Vásquez, A., Nieve, M., Matějusková, I., Paladini, G., Longshawc, M., Lindenstrøm, T., Piedra, D. M., Turnbull, J. F., Picón-Camacho, S. M., Vazquez-Rivera, C., Duguid, R. A.,

- Mo, T. A., Hansen, H., Olstad, K., Cable, J., Harris, P. D., Kerr, R., Graham, D.,...Bron, J. E. (2010). Multi-centre testing and validation of current protocols for the identification of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea). *International Journal of Parasitology* 40(12), 1455-1467. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.04.016>
- Sieber, N., Hartikainen, H. y Vorburger, C. (2020). Validation of an eDNA-based method for detection of wildlife pathogens in water. *Diseases of Aquatic Organisms* 141, 171-184. <https://doi.org/10.3354/dao03524>
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M. y Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of culture shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Application Environment Microbiology* 81, 1689–1699. <https://doi.org/10.1128/AEM.03610-14>.
- Stewart, A., Jackson, J., Barber, I., et al. (2017). Hook, line and infection: a guide to culturing parasites, establishing infections and assessing immune responses in the three-spined stickleback. *Advances of Parasitology* 98, 39–109. <https://www.doi.org/10.1016/bs.apar.2017.07.001>
- Strickler, K. M., Fremier, A. K. y Golberg, C. S. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation* 183, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.038>
- Su, Y. C. y Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiology* 24(6), 549-558. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.005>.
- Summers, M. (1977). Characterization of shrimp baculovirus, (1st edn. Couch, J ed). *Ecological Research Series*. U.S. https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?Lab=ORD&dirEntryId=49590
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C. y Willersley, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 21(8), 2045-2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
- Tang, K. F. J., Pantoja, C. R., Redman, R. M., Han, J. E., Tran, L. H., Lightner, D. V. (2015). Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. *Journal Invertebrate Pathology* 130, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.009>
- Tang, K. F. J., Han J. W., Aranguren, L. F., White-Noble, B., Schmidt, M. M., Piamsomboon, P., Risdiana, E. y Hanggono, B. (2016). Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp. *Journal Invertebrate Pathology* 140, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.004>
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P. V., Sritunyalucksan, K., Flegel, T. W. y Itsathitphisarn, O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture* 452, 69–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.028>
- Thomsen, P. F. y Willersley, E. (2015). Environmental DNA-An emerging tool in conservation for 603 monitoring past and present biodiversity. *Biology Conservation* 183, 4-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>

- Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G., Bateman, K., Sriurairatana, S., Chavadej, J., Sritunyalucksana, K., Withyachumnarnkul, B. (2009). *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology* 102, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.004>
- Tran, L., Nunan L., Redman, R., Mohny, L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K. y Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 105, 45–55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>
- Torres Vilaça, S., Grant, S. A., Beaty, L., Brunetti, C. R., Congram, M., Murray, D., Wilson, C. y Kyle, C. J. (2019). Detection of spatiotemporal variation in ranavirus distribution using eDNA. *Environmental DNA* 2(2), 210-220. <https://doi.org/10.1002/edn3.59>
- Ulahannan, D., Kovac, M. B., Mulholland, P. J., Cazier, J-B. y Tomlinson, I. (2013). Technical and implementation issues in using next-generation sequencing of cancers in clinical practice. *British Journal of Cancer*. 109(4), 827-35. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.416>
- UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México. (2023). Características principales de *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista UNAM* 6(4). <https://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/art33.htm>
- Valdez-Moreno, M., Ivanova, N. V., Elías-Gutiérrez, M., Pedersen, S. L., Bessonov, K. y Hebert, P. D. N. (2019). Using eDNA to biomonitor the fish community in a tropical oligotrophic lake. *PLOS ONE* 14(4), e0215505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215505>
- Van Hulten, M. C. W., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R. K. y Vlak, J. M. (2001). The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286, 7–22. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1002>
- Vanpatten, K. A., Nunan, L. M., y Lightner, D. V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, 241(1-4), 31-46. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.012>
- Vávra, J. y Lukeš, J. (2013). Microsporidia and “the art of living together”. *Advances in Parasitology* 82, 254-298. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407706-5.00004-6>
- Vidal, O. M., Granja, C. B., Aranguren, F., Brock, J. A. y Salazar, M. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White Spot Syndrome Virus. *Journal World Aquaculture Society* 32(4), 364- 372. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00462.x>
- Vig, H. S. y Wang, C. (2012). The evolution of personalized cancer genetic counseling in the era of personalized medicine. *Familial Cancer* 11(3), 539-544. <https://doi.org/10.1007/s10689-012-9524-8>
- Vijayan, K. K., Alavandi, S. V., Rajendran, K. V. y Alagarswami, K. (1995). Prevalence and histopathology of *Monodon baculovirus* (MBV) infection in *Penaeus monodon* and *P. indicus* in shrimp farms in the South-East Coast of India. *Asian Fisheries Science* 8, 267-272. <http://eprints.cmfri.org.in/6834/>
- Wittwer, C., Nowak, C., Strand, D. A., Vrålstad, T., Thines, M. y Stoll, S. (2018). Comparison of two water sampling for eDNA-based crayfish plague detection. *Limnologica* 25634. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2018.03.001>

- Xu, L., Wang, T., Li, F. y Yang, F. (2016). Isolation and preliminary characterization of a new pathogenic iridovirus from redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 120, 17–26. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00462.x>
- Yang, Y. T., Lee, D. Y., Wang, Y., Hu, J. M., Li, W. H., Leu, J. H., Chang, G. D., Ke, H. M., Kang, S. T., Lin, S. S., Kou, G. H. y Lo, C. F. (2014). The genome and occlusion bodies of marine *Penaeus monodon* nudivirus (PmNV, also known as MBV and PemoNPV) suggest that it should be assigned to a new nudivirus genu that is distinct from the terrestrial nudiviruses. *BMC Genomics* 15, 628. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-628>
- Zeldis, D. y Prescott, S. (2000). Fish disease diagnosis program-problems and some solutions. *Aquacultural Engineering* 23(1-3), 3-11. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00047-9)

Anexos

Guía para la obtención de ADN utilizando el kit comercial Power Water DNA Isolation Kit Sample (MO BIO Laboratories)

Recomendaciones importantes: las soluciones PW1 y PW3 deben ser calentadas a 55°C durante 5 a 10 minutos y ser usadas mientras estén calientes.

1. Añadir 5 mL de agua dentro del PowerWater® Bead Tube de 6 mL.
2. Añadir 1 mL de la solución PW1 al PowerWater® Bead Tube.
3. Asegurar el PowerWater® Bead Tube horizontalmente a un adaptador de Vortex.
4. Vortexear a una velocidad máxima durante 5 minutos.
5. Centrifugar los tubos $\leq 4000 \times g$ por 1 minuto a temperatura ambiente. La velocidad dependerá de la capacidad de la centrifugadora.
6. Transferir todo el sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 mL. Extraer el sobrenadante con una punta de pipeta de 1 mL colocándolo hacia debajo en las perlas. Nota: Es necesario colocar la punta de la pipeta en las perlas. Pipetear más de una vez asegura la eliminación de todo el sobrenadante. Cualquier transferencia de cuentas no afectará los pasos posteriores. Recuperar entre 600-650 μL de sobrenadante dependiendo del tipo de la membrana filtrante utilizada.
7. Centrifugar a 13,000 $\times g$ por 1 minuto.
8. Evitando succionar el pellet, transferir el sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2mL.
9. Agregar 200 μL de la solución PW2 y vortexear. Incubar a 4°C durante 5 minutos.
10. Centrifugar los tubos 13,000 $\times g$ por 1 minuto.
11. Evitando el pellet, transfiera el sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2mL.
12. Añadir 650 μL de la solución PW3 y vortexear brevemente para mezclarlo.
13. Cargar 650 μL de sobrenadante en un filtro de centrifugación y centrifugar a 13,000 $\times g$ durante 1 minuto. Desechar el flujo y repeyir hasta que todo el sobrenadante se haya cargado en el filtro de centrifugado. Nota: Se requiere un total de dos cargas por cada muestra procesada.
14. Colocar la cesta del filtro en un tubo de recolección limpio de 2mL.
15. Sacudir hasta que se mezcle la solución PW4 antes de su uso. Añadir 650 μL de la solución PW4 y centrifugar a 13,000 $\times g$ por 1 minuto.
16. Retirar el flujo y añadir 650 μL de la solución PW5 y centrifugar a 13,000 $\times g$ por 1 minuto.
17. Desechar el flujo y centrifugar de nuevo a 13,000 $\times g$ por 2 minutos para eliminar el residuo.

18. Colocar la cesta del filtro en un tubo de recolección limpio de 2mL.
19. Añadir 30 μ L de la solución PW6 al centro del filtro blanco de la membrana.
20. Centrifugar a 13,000 x *g* por 1 minuto.
21. Retirar la cesta del filtro. El ADN está listo para cualquier aplicación.

Guía para la obtención de ADN utilizando el kit comercial DNeasy Power Soil Pro Kit 50 (QIAGEN)

Recomendaciones importantes:

- Asegúrese de que los tubos PowerBead Pro giran libremente en la centrifuga sin rozar.
- Si la solución CD3 ha precipitado, calentar a 60°C hasta que el precipitado se disuelva.
- Realizar todos los pasos de centrifugación a temperatura ambiente (15–25°C).

1. Girar el PowerBead Pro tube brevemente para asegurarse de que las perlas se hayan asentado en la parte inferior. Añadir hasta 250 mg de tierra y 800 μ L de solución CD1. Vortexear brevemente para mezclar.
2. Asegurar el PowerBead Pro tube horizontalmente en un adaptador de vortex para tubos de 1.5-2 mL. Vortexear a una velocidad máxima durante 10 minutos.
3. Centrifugar el PowerBead Pro tube a 15,000 x *g* por 1 minuto.
4. Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 2 mL.
5. Añadir 200 μ L de la solución CD2 y vortexear por 5 segundos.
6. Centrifugar a 15,000 x *g* por 1 minuto. Evitando succionar el pellet, transfiera hasta 700 μ L de sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 2 mL.
7. Añadir 600 μ L de la solución CD3 y vortexear durante 5 minutos.
8. Cargar 650 μ L de lisado en una columna de centrifugado MB. Centrifugar a 15,000 x *g* durante 1 minuto.
9. Descartar el sobrenadante y repetir el paso 8 hasta que todo el lisado pase a través de la columna de centrifugado MB.
10. Coloque con cuidado la columna de centrifugado MB en un tubo de recogida limpio de 2 mL. Evite salpicar cualquier flujo en la columna de giro MB.
11. Añadir 500 μ L de la solución EA a la columna de giro MB. Centrifugar a 15,000 x *g* durante 1 minuto.
12. Descartar el sobrenadante y vuelva a colocar la columna de centrifugado MB en el mismo tubo de recolección de 2 mL.
13. Añadir 500 μ L de la solución C5 a la columna de centrifugado MB. Centrifugar a 15,000 x *g* durante 1 minuto.
14. Descartar el sobrenadante y vuelva a colocar la columna de centrifugado MB en un nuevo tubo de recolección de 2 mL.
15. Centrifugar a 16,000 x *g* durante 2 minutos. Con cuidado coloque la columna de centrifugado MB en un nuevo tubo de elución de 1.5 mL.
16. Añadir 30 μ L de la solución C6 al centro de la membrana de filtrado.

17. Centrifugar a 15,000 x *g* durante 1 minuto. Descartar la columna de centrifugado MB. El ADN está listo para ser usado. Nota: Se recomienda guardar el ADN congelado a una temperatura de -30 a -15°C.

Geles de agarosa al 2% teñidos con GELRED

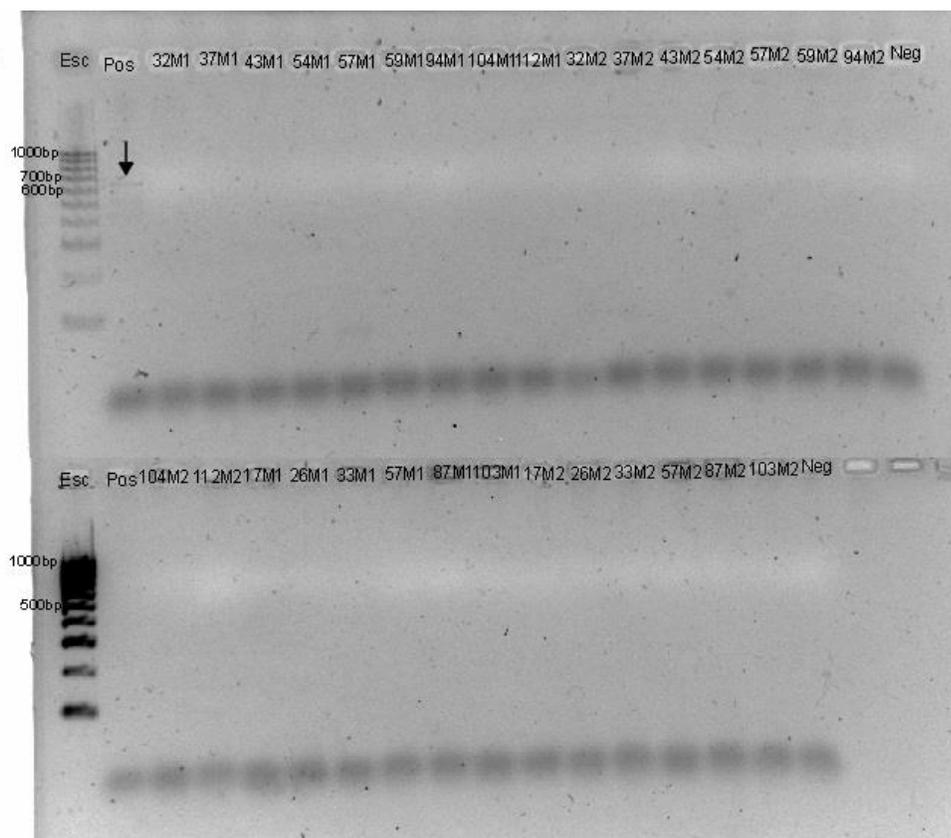


Figura 22. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de agua que amplificaron para *Baculovirus penaei*. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

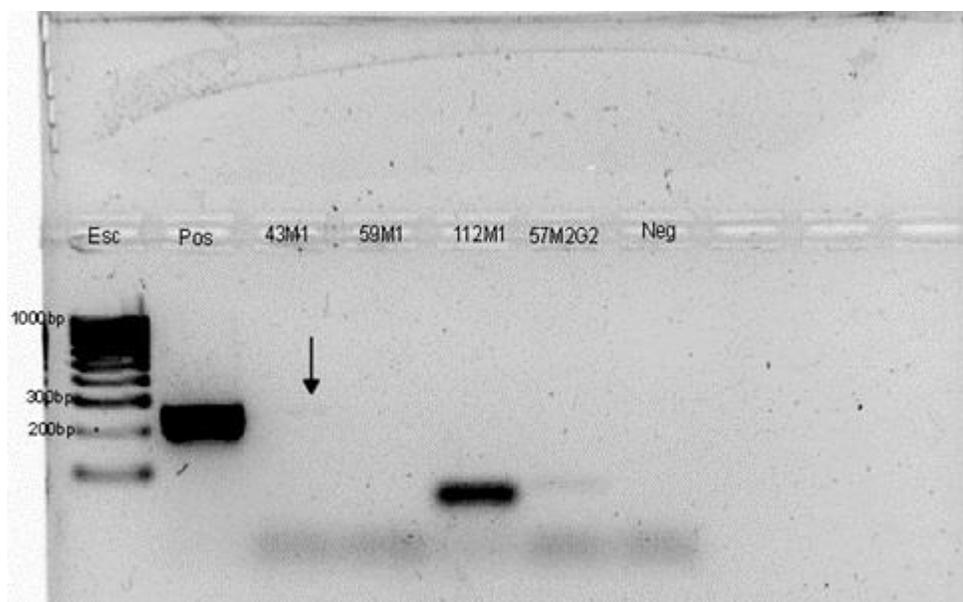


Figura 23. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de agua que amplificaron para *Monodon baculovirus*. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

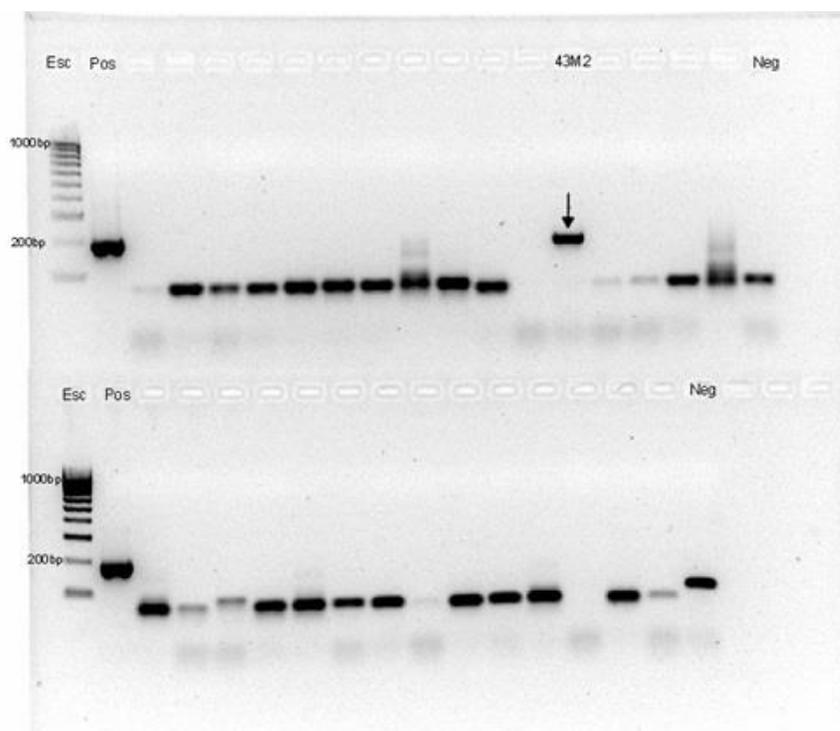


Figura 24. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de agua que amplificaron para el virus iridiscente de los decápodos tipo 1. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

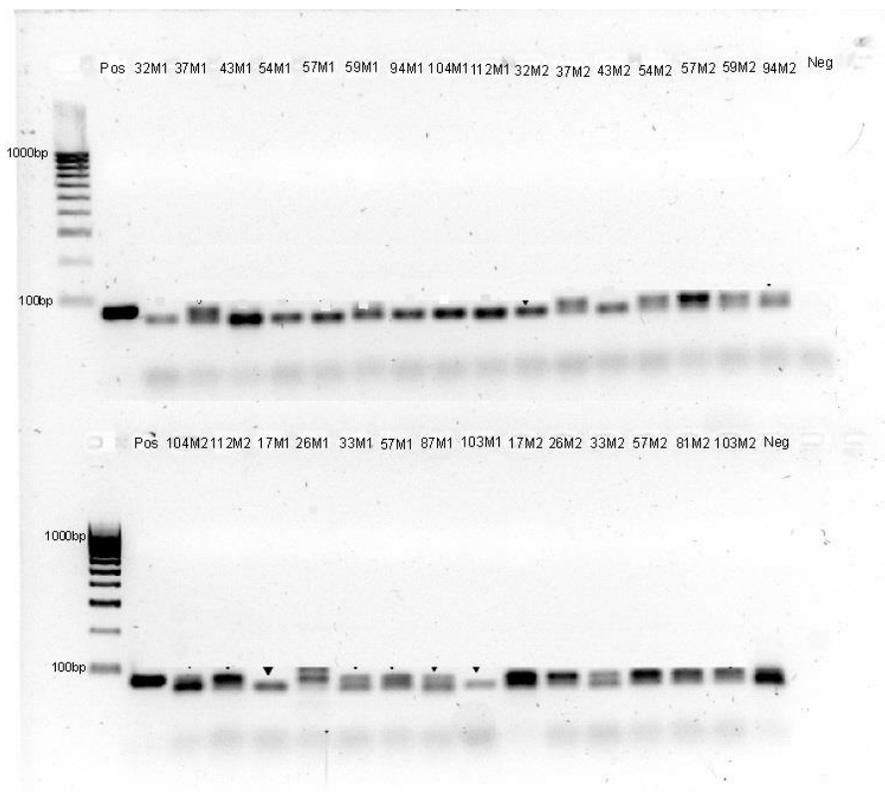


Figura 25. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde la ausencia de flechas negras en las muestras de agua que son negativas para el virus de la mancha blanca. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

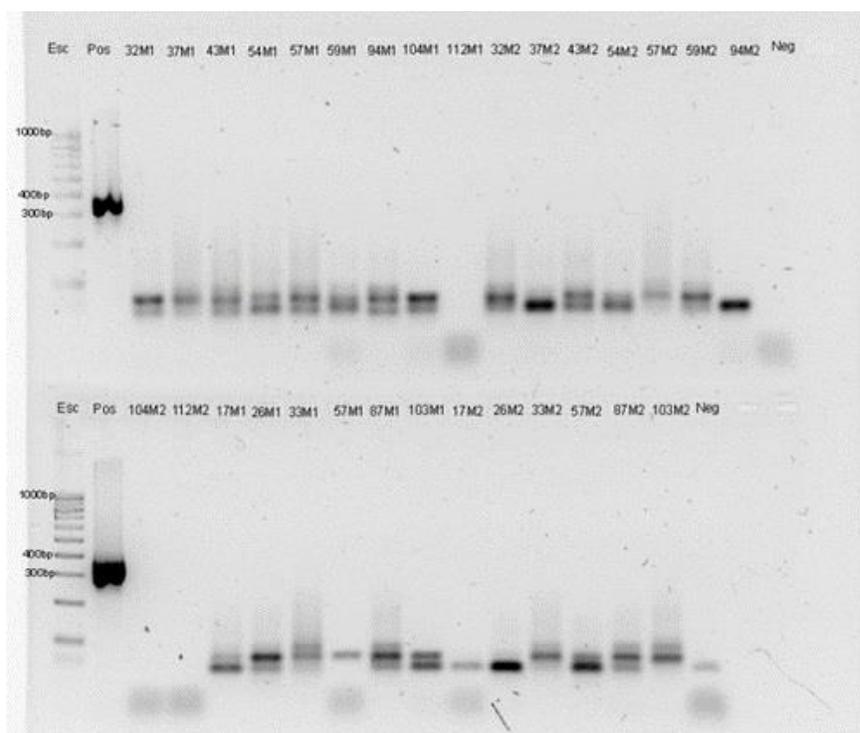


Figura 26. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde la ausencia de flechas negras en las muestras de agua indica que son negativas para *Candidatus hepatobacter penaei* causante de la necrosis hepatopancreática. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

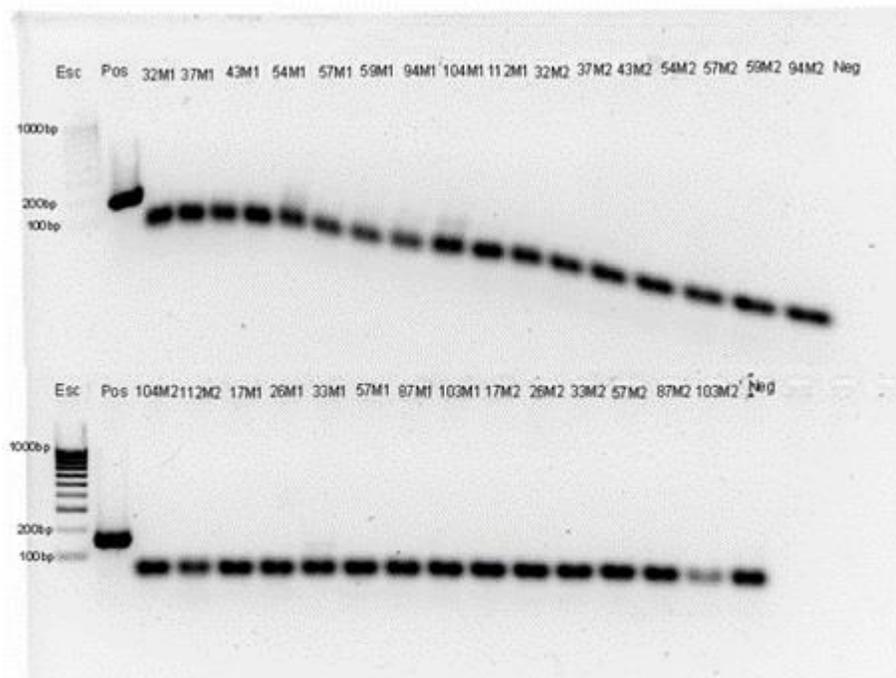


Figura 27. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde la ausencia de flechas negras en las muestras de agua indica que son negativas para la necrosis aguda hepatopancreática. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

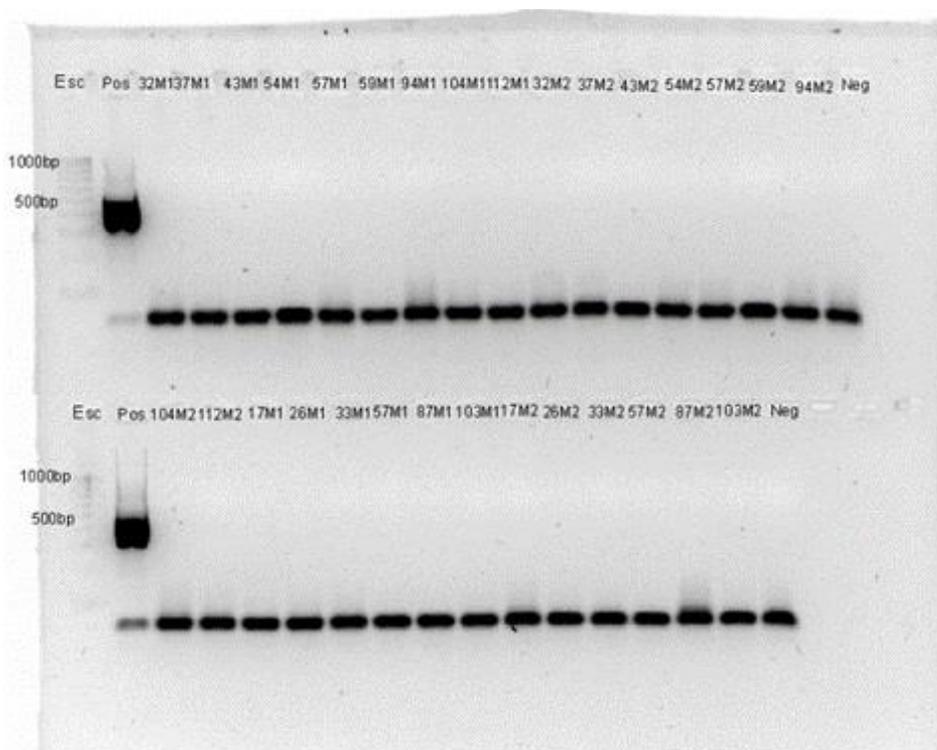


Figura 28. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde la ausencia de flechas negras en las muestras de agua indica que son negativas para *Enterocytozoon hepatopenaei*. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

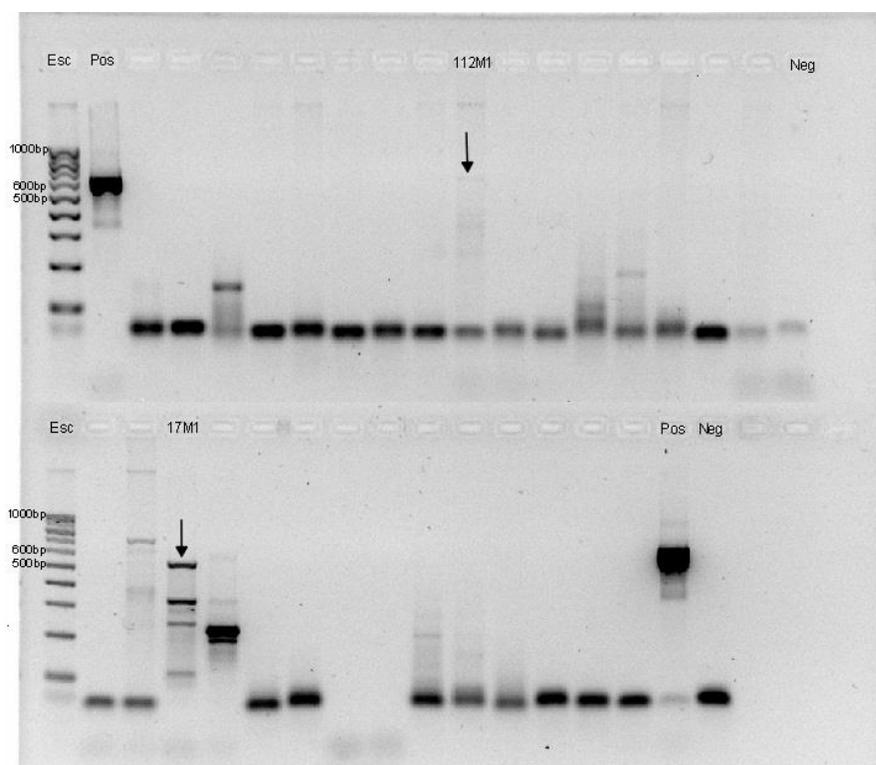


Figura 29. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de sedimento que amplificaron para *Baculovirus penaei*. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

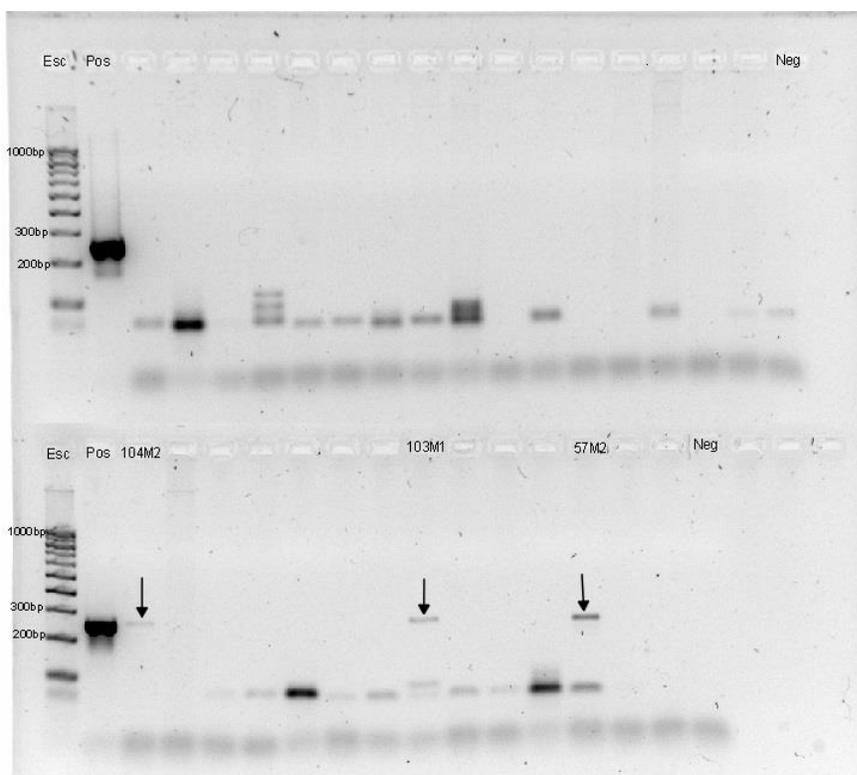


Figura 30. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de sedimento que amplificaron *Monodon baculovirus*. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

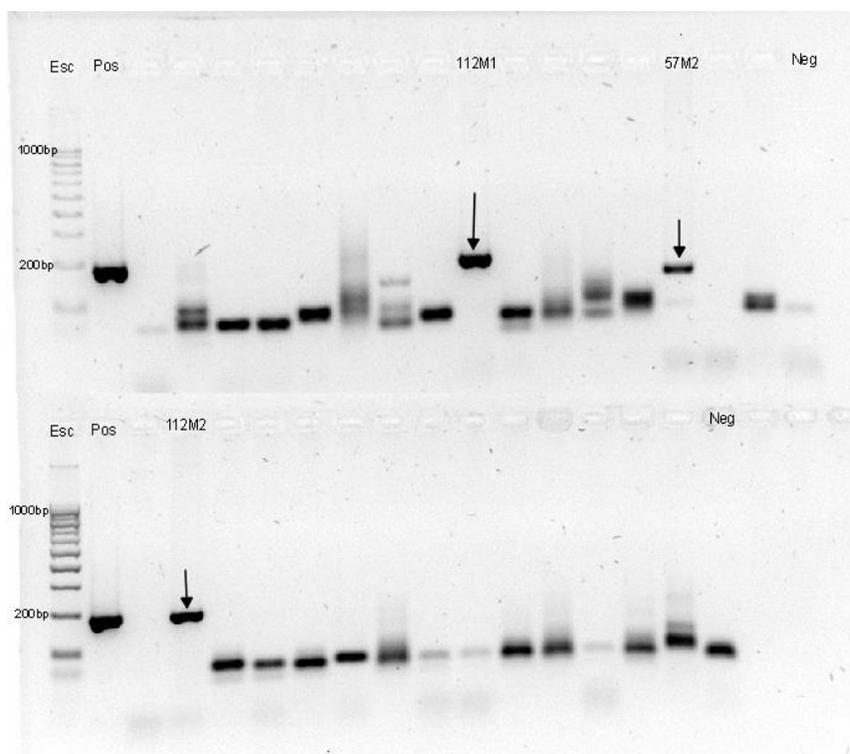


Figura 31. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de sedimento que amplificaron para el virus iridescente de los decápodos tipo 1. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

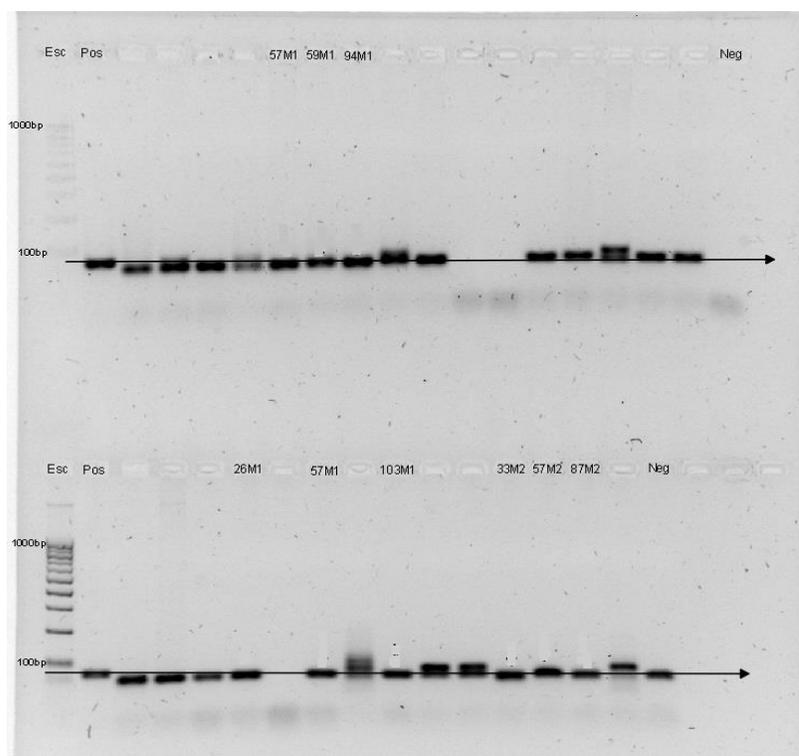


Figura 32. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde la ausencia de flechas negras en las muestras de sedimento indica que son negativas para el virus de la mancha blanca. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

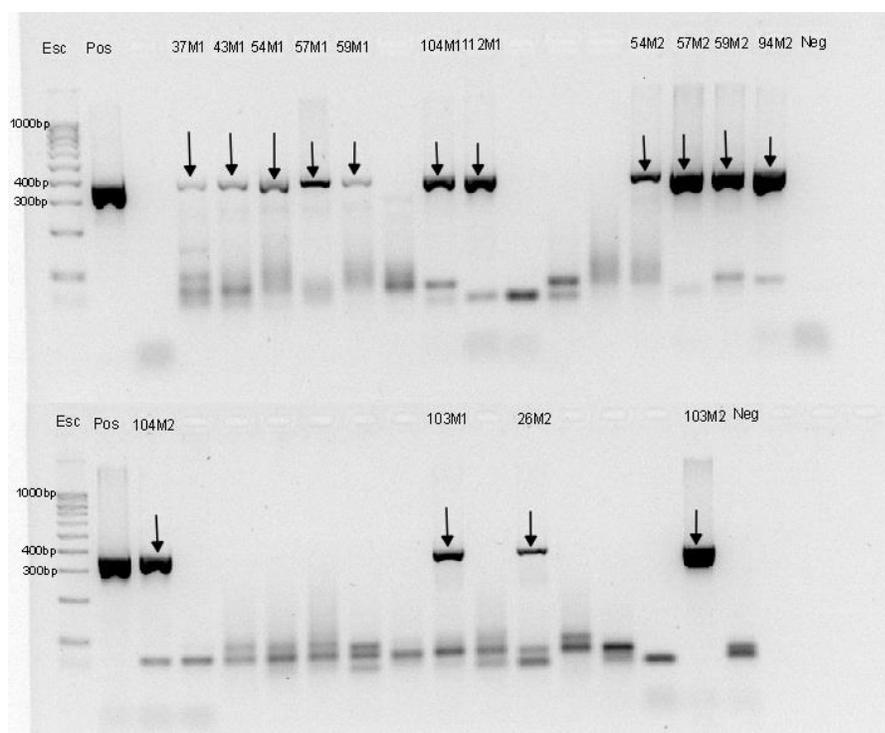


Figura 33. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de sedimento que amplificaron para *Candidatus hepatobacter penaei* causante de la necrosis hepatopancreática. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

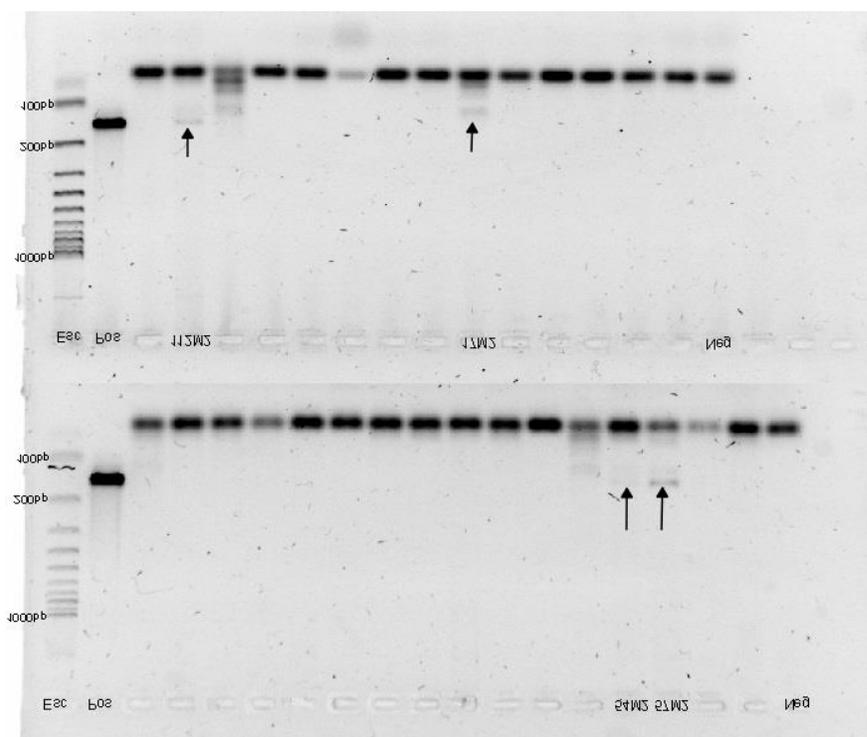


Figura 34. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde se señalan con flechas negras las muestras de sedimento que amplificaron para la necrosis aguda hepatopancreática. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

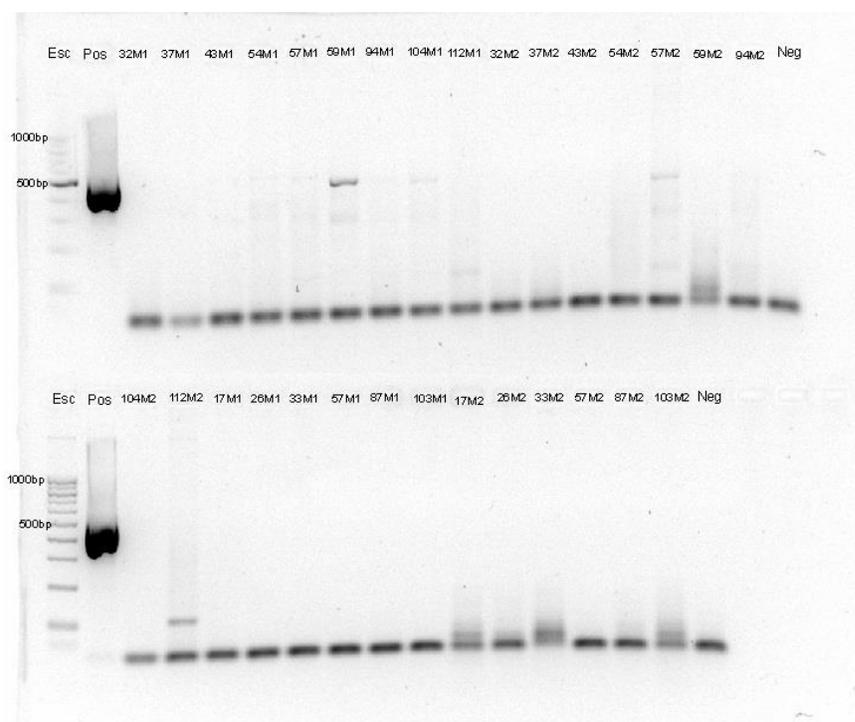


Figura 35. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRED donde la ausencia de flechas negras en las muestras de sedimento indica que son negativas para *Enterocytozoon hepatopenaei*. La primera hilera corresponde a los estanques de la granja 1, mientras que, en la segunda hilera se muestran los resultados de la granja 2.

Anexo D Cromatogramas representativos de los patógenos IHHNV, MB, DIV1 y NHP.

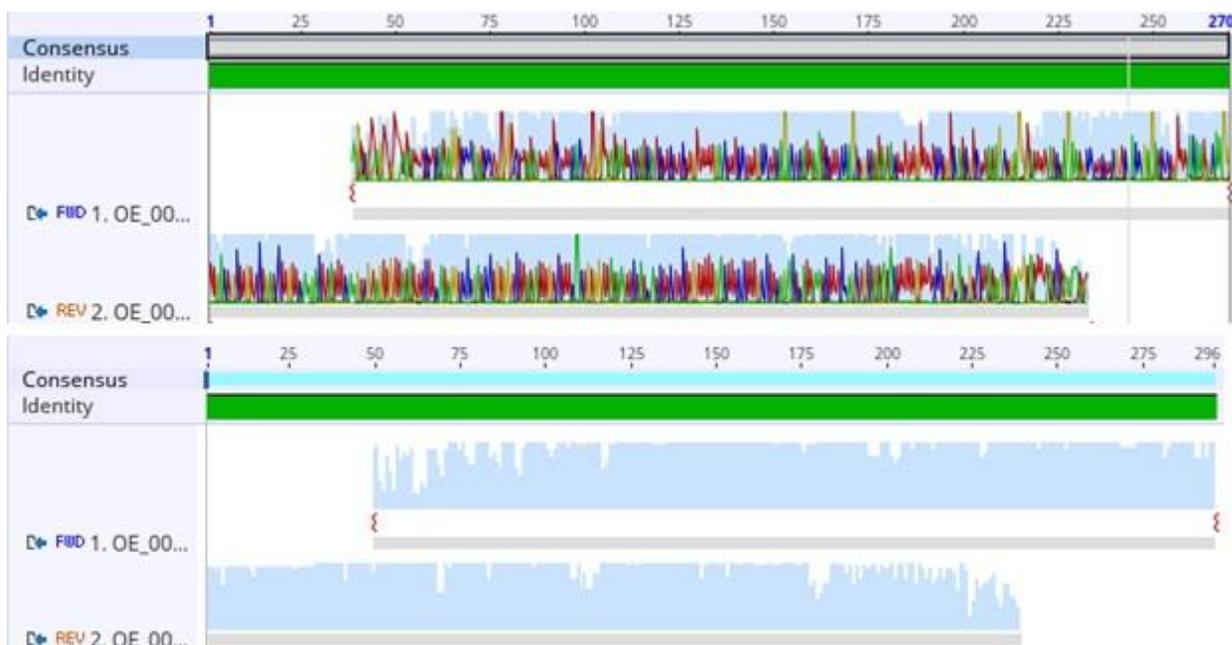


Figura 36. Alineamiento de las secuencias “forward” y “reverse” de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética. En la parte superior se observa la secuencia consenso, la cual indica el número de secuencias utilizadas para formarlas. Por otro lado, la línea de color verde indica el porcentaje de identidad entre la secuencia “forward” y “reverse”.

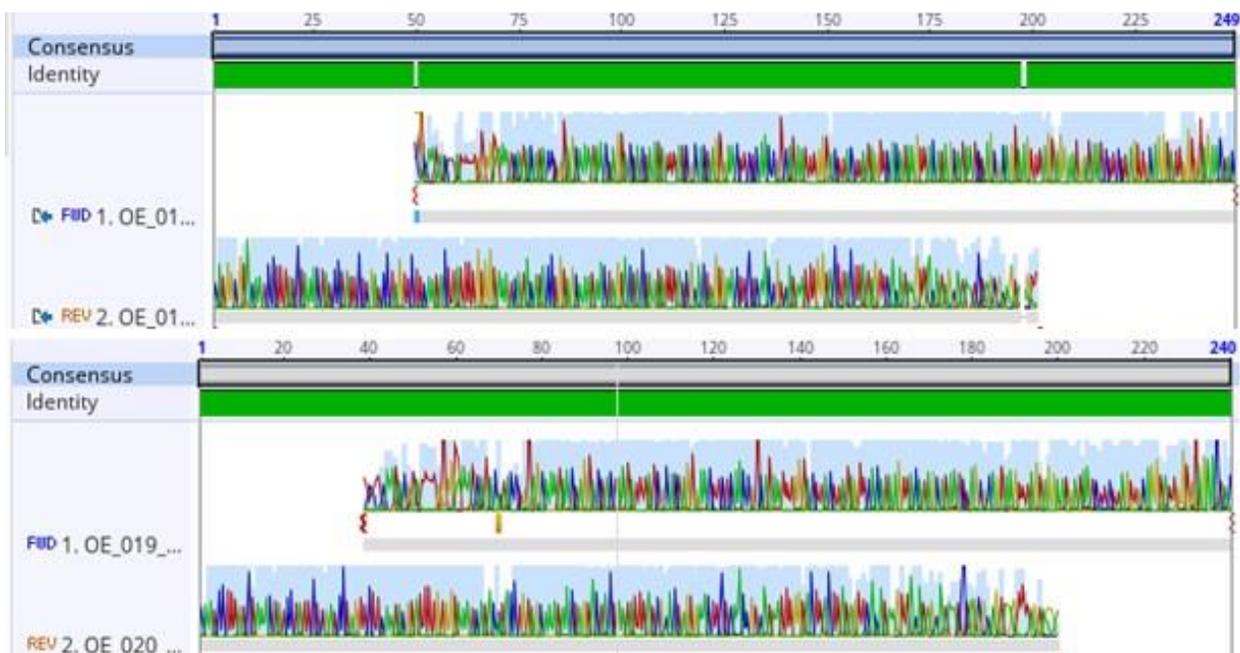


Figura 37. Alineamiento de las secuencias “forward” y “reverse” de *Monodon baculovirus*. En la parte superior se observa la secuencia consenso, la cual indica el número de secuencias utilizadas para formarlas. Por otro lado, la línea de color verde indica el porcentaje de identidad entre la secuencia “forward” y “reverse”.

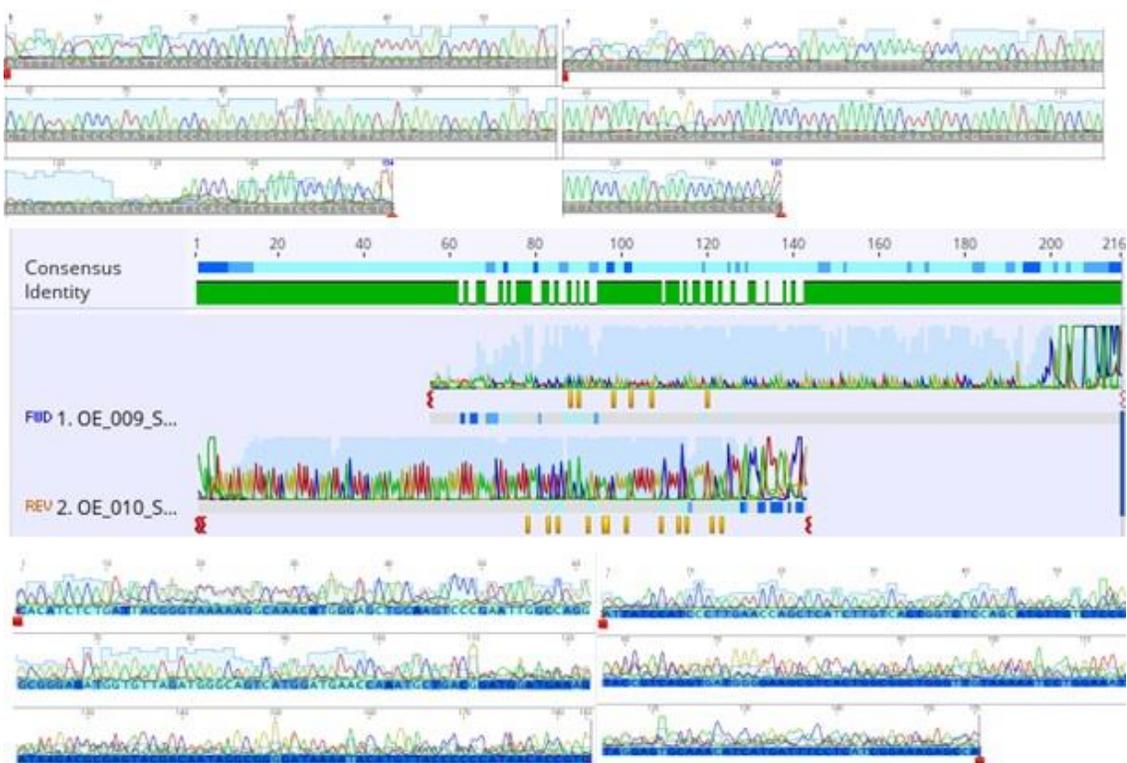


Figura 38. Alineamiento de las secuencias “forward” y “reverse” del virus iridiscente de los decápodos tipo 1. En la parte superior se observa la secuencia consenso, la cual indica el número de secuencias utilizadas para formarlas. Por otro lado, la línea de color verde indica el porcentaje de identidad entre la secuencia “forward” y “reverse”.



Figura 39. Alineamiento de las secuencias “forward” y “reverse” de la necrosis hepatopancreática. En la parte superior se observa la secuencia consenso, la cual indica el número de secuencias utilizadas para formarlas. Por otro lado, la línea de color verde indica el porcentaje de identidad entre la secuencia “forward” y “reverse”.