



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
CAMPUS ENSENADA**



**“CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE VARIANTES DEL VIRUS DE LA MIONECROSIS
INFECCIOSA (IMNV) Y DEL PENAEUS VANNAMEI SOLINVIVIRUS (PVSV) EN EL
NOROESTE DE MÉXICO”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

PRESENTA:

Marian Fernanda Guerrero Padilla

Ensenada, Baja California, México, 30 de agosto del 2024.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
CAMPUS ENSENADA



**"CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE VARIANTES DEL VIRUS DE LA MIONECROSIS
INFECCIOSA (IMNV) Y DEL PENAEUS VANNAMEI SOLINIVIVIRUS (PVSV) EN EL
NOROESTE DE MÉXICO"**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

PRESENTA:

Marian Fernanda Guerrero Padilla

358587

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

Roberto Cruz Flores
DIRECTOR

Samuel Sánchez Serrano
CODIRECTOR

Itzel Soledad Pérez
SINODAL

Ivone Giffard Mena
SECRETARIA

"Por la Realización Plena del Ser"

C.c.p.- Archivo
C.c.p.- Minutario

Dedicatoria

A mi madre Ofelia, por ser la mejor en todos los aspectos y por siempre contar con tu apoyo y amor infinito e incondicional. Te amo.

A mi padre Víctor, por tus enseñanzas de vida, por siempre impulsarme en mi carrera y esperar lo mejor de mí.

A mi Mayita hermosa, por siempre acompañarme en mis noches de estudio y trabajo, por tu calidez y dulzura, eres y siempre serás la mejor mascota de mi vida.

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a Dios por contar con su guía y luz en todo momento, por cuidarme y darme las herramientas necesarias para cumplir cada una de mis metas.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y a la Facultad de Ciencias Marinas (FCM), México, por brindarme grandes enseñanzas, conocimientos y herramientas, por otorgarme mis estudios profesionales en la carrera de Biotecnología en Acuicultura.

Al Dr. Roberto Cruz Flores por aceptar ser mi Director de tesis, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme todo lo necesario para realizar este estudio, así como su orientación, enseñanza y paciencia. Además de impulsar mi carrera profesional y darme la gran oportunidad y confianza para esta investigación. Muchísimas gracias de todo corazón.

Al Dr. Samuel Sánchez Serrano por aceptar ser mi Codirector de tesis, por ser un gran maestro, por su sinceridad y ayudarme a encontrar mi vocación durante la carrera.

A la Dra. Ivone Giffard Mena por aceptar ser parte de mi Comité, por ser una gran maestra y siempre motivándome a indagar más en este campo de estudio.

A la M. Itzel Soledad Pérez por aceptar ser mi Sinodal, por haber contado con su apoyo, tiempo, paciencia y capacitación para la realización de mi investigación, de igual modo por su gran compañerismo y amistad.

Al equipo del Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE, a la M. Yanet Guerrero Rentería y a Jocelyne García Armenta, por estar presentes y atender a cualquier de mis dudas.

A las instalaciones de cultivo de camarón de los estados de Sonora y Baja California Sur, por proporcionar ejemplares de *Penaeus vannamei* para la realización de este estudio.

A mis padres y familia por estar en cada gran paso que doy y por ser la gran bendición de mi vida. Los amo.

Finalmente agradezco a la vida por coincidir con mi pareja y amigos, por siempre darme palabras de ánimo y motivación, por celebrar mis triunfos y logros. Gracias.

Índice general

| | |
|---|----|
| Dedicatoria..... | 2 |
| Agradecimientos..... | 4 |
| LISTA DE TABLAS..... | 7 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 7 |
| 1. Resumen..... | 8 |
| 2. Introducción y antecedentes..... | 9 |
| 2.1. Enfermedades del cultivo de camarón..... | 10 |
| 2.2. El Virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV)..... | 12 |
| 2.3. <i>Penaeus vannamei</i> Solinivirus (PvSV)..... | 13 |
| 2.4. Secuenciación masiva de nueva generación (NGS) de ARN (RNA-seq) y el uso de herramientas informáticas..... | 15 |
| 2.5. Las NGS y la caracterización de nuevos agentes infecciosos del camarón..... | 17 |
| 3. Justificación..... | 18 |
| 4. Hipótesis..... | 19 |
| 5. Objetivos..... | 19 |
| 5.1. Objetivo principal..... | 19 |
| 5.2. Objetivos específicos..... | 19 |
| 6. Diseño experimental y metodología..... | 19 |
| 6.1. Origen de las muestras..... | 19 |
| 6.2. Extracción de ARN y análisis de la concentración..... | 21 |
| 6.3. Extracción de ADN..... | 21 |
| 6.4. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)..... | 21 |
| 6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar PvSV y otros agentes infecciosos..... | 21 |
| 6.6. Secuenciación Sanger de los productos PCR..... | 22 |
| 6.7. Secuenciación de próxima generación..... | 22 |
| 6.7.1 Envío de muestra y RNAseq..... | 22 |
| 6.7.2 Análisis bioinformático..... | 23 |
| 7. Resultados..... | 23 |
| 7.1. Análisis de los agentes infecciosos mediante el método de diagnóstico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 23 |
| 7.2. Confirmación de la identidad de PvSV, AHPND, IHHNV mediante secuenciación Sanger..... | 25 |
| 7.3. Análisis de secuencia y organización del genoma de <i>Penaeus vannamei</i> Solinivirus..... | 28 |
| 8. Discusión..... | 29 |

| | |
|-------------------------|----|
| 9. Conclusiones | 32 |
| 10. Bibliografías | 33 |
| 11. Anexos..... | 41 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Número y origen de cada muestra con el tipo de análisis en el que se sometió. | 209 |
| Tabla 2. Primers empleados en el estudio para determinar y amplificar los fragmentos de los agentes infecciosos con el método de detección de PCR convencional. | 221 |
| Tabla 3. Análisis de las muestras de hepatopáncreas y pleópodos de <i>P. vannamei</i> mediante la técnica PCR para la detección de los agentes infecciosos..... | 243 |
| Tabla 4. Resultados del análisis BLASTn de las secuencias consenso de PvSV, AHPND e IHHNV, indicando los porcentajes de identidad y cobertura en comparación con otros agentes infecciosos, junto con sus números de accesoión.. | 276 |
| Tabla 5. Similitud en la secuencia de aminoácidos del genoma completo, helicasa y ARN polimerasa dependiente de ARN de <i>Penaeus vannamei</i> Solinvivirus Mex..... | 298 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Organización y regiones conservadas del genoma del IMNV..... | 132 |
| Figura 2. Organización del genoma de la <i>Penaeus vannamei</i> Solinvivirus..... | 15 |
| Figura 3. Detección de tres fragmentos de 220 pb de <i>Penaeus vannamei</i> Solinvivirus en gel de agarosa del 2% en un transiluminador..... | 254 |
| Figura 4. Detección de cuatro fragmentos de 149 pb de AHPND en gel de agarosa del 2% en un transiluminador..... | 254 |
| Figura 5. Detección de cuatro fragmentos de 309 pb de IHHNV en gel de agarosa del 2% en un transiluminador..... | 254 |
| Figura 6. Alineamiento de las secuencias Forward y Reverse de PvSV..... | 265 |
| Figura 7. Alineamiento de las secuencias Forward y Reverse de AHPND.. | 265 |
| Figura 8. Alineamiento de las secuencias Forward y Reverse de IHHNV. | 265 |
| Figura 9. Organización genómica del <i>Penaeus vannamei</i> Solinvivirus Mex.. | 298 |

1. Resumen

En los últimos años, se han identificado dos virus de ARN vinculados con mortalidades masivas en América Latina: el Virus de la Mionecrosis Infecciosa y el *Penaeus vannamei* Solinvivirus. En 2023, se observaron muertes inusuales en el noroeste mexicano, posiblemente relacionadas con estos virus. Muestras de *P. vannamei* de Sonora y Baja California Sur analizadas mediante PCR, RT-PCR, Secuenciación Sanger y Secuenciación Masiva de Próxima Generación revelaron la presencia de *Penaeus vannamei* Solinvivirus, Virus de la Mionecrosis Infecciosa, Decapod penstyldensovirus 1, y *Vibrio parahaemolyticus*, causante de AHPND. Mediante análisis de RNAseq se secuenció el genoma completo de la variante mexicana del PvSV nombrándolo PvSV Mex. El genoma de PvSV Mex es de 10,4 kb y codifica una gran poliproteína de 3327 aa, con dominios conservados de helicasa, RdRP, proteína de cubierta de Calicivirus, parche-G, proteína de tegumento y señal de localización nuclear. La secuencia nucleotídica del PvSV Mex muestra un 99.88% de similitud con PvSV. Las técnicas de secuenciación son herramientas esenciales para identificar y comprender estos procesos, contribuyendo al conocimiento del transcriptoma del camarón.

Palabras clave: Camarón blanco, *Penaeus vannamei*, *Solinviviridae*, Solinvivirus, PvSV Mex.

2. Introducción y antecedentes

La acuicultura es una práctica que consiste en el cultivo y reproducción de diversas especies de organismos acuáticos de manera controlada (SADER, 2019). La producción mundial de organismos acuáticos asciende a 214 millones de toneladas, con un valor de 406 mil millones de dólares (FAO, 2022). Dentro de este sector, la producción de crustáceos ha superado los 11.2 millones de toneladas, valoradas en 81.5 mil millones de dólares (FAO, 2022).

El cultivo de camarón, particularmente del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*), ha cobrado gran relevancia debido a sus destacados beneficios nutricionales y su valor gastronómico (Bajaña & Bucaram, 2023; Pérez, 2018). Esta especie predomina en la industria y su producción ha alcanzado las 5.8 millones de toneladas, con un valor estimado de 31.23 mil millones de dólares (FAO, 2022). Los principales países productores de camarón blanco incluyen Ecuador, China, Vietnam, India, Indonesia, México, Centroamérica, Estados Unidos y algunos países de Europa (Davis et al., 2022).

A pesar del crecimiento sostenido de la industria, en 2020 la producción mundial de camarón experimentó una disminución del 15% en comparación con el año anterior. Esta caída se atribuye principalmente a enfermedades infecciosas que afectaron gravemente a la región asiática (FAO, 2020). En América Latina, la producción de camarón superó las 700 mil toneladas, con Ecuador, México, Brasil, Colombia y Perú como principales productores (James et al., 2019). No obstante, la producción camaronícola mostró una tendencia positiva en años recientes, registrando un aumento del 22% en los volúmenes productivos, impulsado por el incremento en la producción en Ecuador (FAO, 2021).

El cultivo de camarón enfrenta varios desafíos, incluyendo la competencia internacional, problemas sanitarios, el cambio climático y la sostenibilidad ambiental (Álvarez & Franco, 2023). Sin embargo, existen soluciones para mejorar la calidad y la productividad, garantizando el desarrollo sostenible de la industria (Valverde, 2022).

En México, la camaronicultura tuvo sus inicios en la década de 1980 y desde entonces ha experimentado un crecimiento notable (Billie et al., 2002). Actualmente, México es el séptimo productor mundial de camarón, con una producción de 237,647 toneladas, valorada en 15 mil millones de pesos mexicanos (COPESCA, 2018). De este volumen, el 29% proviene de la captura en bahías y aguas profundas, mientras que el 71% proviene de granjas acuícolas (CONAPESCA, 2018; CONAPESCA, 2020).

Sinaloa es el estado con mayor producción, con más de 96 mil toneladas, seguido por Sonora con 75 mil toneladas y Nayarit con 17 mil toneladas (García, 2020). Otros estados con cultivos a menor escala incluyen Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (SADER, 2020). En 2020, el cultivo de camarón representó el 61% de la producción acuícola nacional total.

El cultivo de camarón tiene un potencial considerable para el desarrollo económico y social de México y América Latina, siempre y cuando se lleve a cabo de manera responsable y sostenible (CONAPESCA, 2018). Su relevancia radica en su capacidad para generar empleo, garantizar la seguridad alimentaria y contribuir al desarrollo económico nacional (CONAPESCA, 2020).

2.1. Enfermedades del cultivo de camarón

La camaronicultura moderna enfrenta una gran problemática debido a la constante aparición de agentes infecciosos que se han propagado entre regiones, países y continentes (Bondad-Reantaso et al., 2008). Este fenómeno, conocido como transfronterización, implica el movimiento de especímenes entre países y la introducción de su carga microbiológica (Cruz-Flores et al., 2022).

En el ámbito del cultivo de crustáceos, existen siete enfermedades virales fundamentales identificadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Estas son: Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHNV), Virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV), Virus del Síndrome de Taura (TSV), Virus del Síndrome de Mancha Blanca (WSSV), Infección por *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, Enfermedad de Cola Blanca (WTD) y Virus del Síndrome de la Cabeza Amarilla (YHV), así como la Infección por el Virus Decápodo Iridiscente 1 (DIV1)

(Andrade et al., 2022; OIE, 2021). Además de estas enfermedades virales, también se han identificado dos enfermedades bacterianas y una fúngica reportables según la OIE en 2021: Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND), Necrotización Hepatopancreatitis (NHP) y la Plaga de Crayfish (*Aphanomyces astaci*) (Cruz-Flores et al., 2022). El conocimiento y la gestión adecuada de estas enfermedades son cruciales para garantizar la salud y la sostenibilidad de las poblaciones de crustáceos en los sistemas de cultivo (Cruz-Flores et al., 2022; Lee et al., 2022).

Las enfermedades que afectan al camarón exhiben una distribución cosmopolita debido a los movimientos transfronterizos de camarones (Morales et al., 2014). Este fenómeno conlleva la dispersión de patógenos hacia nuevas áreas donde comúnmente no están presentes, impulsado por el comercio y la globalización (Varela & Peña, 2017). En muchos lugares, la disponibilidad de camarón es insuficiente o inexistente, lo que provoca la importación de camarones y, con ellos, sus patógenos (Cruz-Flores et al., 2022). El cultivo de camarón es el sector de la acuicultura de más rápido crecimiento en regiones de Asia y Latinoamérica, y es común el comercio de estadios inmaduros entre diferentes localidades, provocando un impacto significativo en las industrias y especies acuáticas locales (Varela & Peña, 2017).

El movimiento de patógenos entre diferentes especies o regiones puede propiciar la emergencia de nuevas variantes con fenotipos y genotipos adaptados a los requisitos del ecosistema en el que se encuentran (Cruz-Flores et al., 2022; Smith-Tsurkan et al., 2013). El término 'variante' se refiere a una mutación o un conjunto de mutaciones de una población viral, ya sea por azar o por selección natural, permitiendo que el virus enfrente nuevos desafíos y presiones evolutivas (Cruz-Flores et al., 2022; Flegel, 2006). Se ha observado que los virus de ARN tienen altas tasas de mutación, lo que resulta en la generación de nuevas variantes (Cruz-Flores et al., 2022; Duffy, 2018). Las consecuencias de estas variantes pueden afectar a los análisis clínicos, los tratamientos, la producción y el comercio de organismos acuáticos (Cruz-Flores et al., 2022; Gutiérrez-Novillo, 2022).

2.2. El Virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV)

El virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV) fue inicialmente identificado en 2002 en el noreste de Brasil y posteriormente se propagó a Indonesia en 2006 (Andrade et al., 2022). Perteneciente a la familia Totiviridae, este virus presenta una estructura icosaédrica con un diámetro de 40 nm y carece de envoltura (Poulos et al., 2006). Su genoma consta de doble cadena de ARN (dsRNA), clasificándose en el Grupo III según la Clasificación de Baltimore (Tang et al., 2019). Con un tamaño genómico de aproximadamente 8,2 kbp, el IMNV posee dos marcos de lectura abiertos superpuestos (ORF): el ORF1 codifica una proteína asociada con la unión al ARN y una proteína de la cápside (MCP), mientras que el ORF2 contiene la información crucial para la replicación y transcripción de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Andrade et al., 2022) (Figura 1). Los signos visibles característicos de lesión en los camarones incluyen la presencia de zonas necróticas blancas, focales a extensas, en el músculo estriado, particularmente en los segmentos abdominales más distales cercanos a la aleta caudal (Poulos et al., 2006). En casos graves, se presentan necrosis y enrojecimiento, además de eventos de mortalidad significativa (Andrade et al., 2022).

La introducción del virus IMNV en Asia se especula que ocurrió a través de la importación de camarones infectados desde América Latina (Andrade et al., 2022; Prasad et al., 2017). Los análisis genéticos han revelado la existencia de dos linajes principales del IMNV: el linaje americano y el linaje asiático. El linaje americano se ha identificado en países como Brasil, Ecuador, Colombia, México y Madagascar, mientras que el linaje asiático se ha encontrado en Indonesia, Malasia, Vietnam, China, India y Tailandia (Mai et al., 2019). Algunas cepas asiáticas de IMNV muestran una mayor virulencia y capacidad de transmisión en comparación con las cepas americanas, sugiriendo una adaptación del IMNV en Asia a las condiciones locales y a las especies de camarón presentes (Andrade et al., 2022).

Sin embargo, también se ha comprobado la presencia de camarones coinfectados con IMNV y otros patógenos, como el Virus del Síndrome de Mancha Blanca (WSSV) y la Enfermedad de Cola Blanca (WTD) (Feijó et al., 2013; Senapin et al., 2007). Estas coinfecciones complican aún más el panorama sanitario de las poblaciones de

camarón, afectando negativamente la producción y la salud de los organismos acuáticos en las instalaciones de cultivo (Vogt, 2012). La gestión de estas enfermedades es crucial para la sostenibilidad de la camaronicultura, y el conocimiento de la prevalencia de patógenos en las poblaciones locales es esencial para evaluar el impacto de estas enfermedades (Andrade et al., 2022).

En años recientes, existe evidencia contundente del movimiento de reproductores entre Brasil e Indonesia, lo que ha conducido a la transfronterización de otro agente viral adicional al continente americano (Andrade et al., 2022). Este fenómeno ha agravado enfermedades conocidas, ejerciendo fuertes limitantes económicas y complicando significativamente las prácticas de producción para los camaroneros (Varela & Peña, 2017).

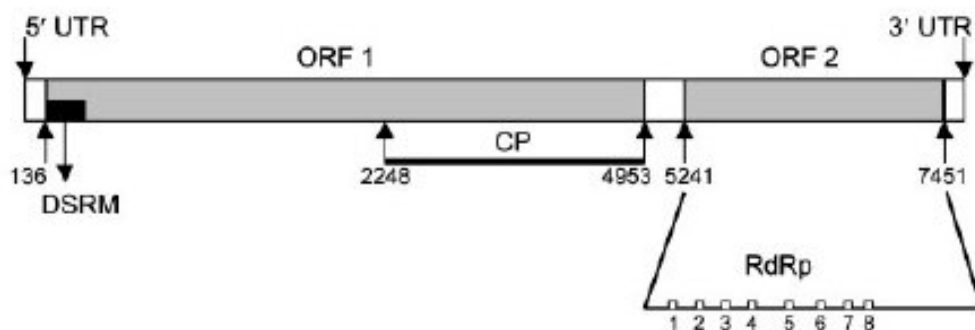


Figura 1. Organización y regiones conservadas del genoma del IMNV. La proteína de la cápside (MCP) y la ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp) se encuentran entre nucleótidos 2248-4953 y 5241-7451 (Poulos et al., 2006).

2.3. *Penaeus vannamei* Solinvivirus (PvSV)

Desde 2016, la industria camaronera brasileña ha enfrentado mortalidades inexplicadas, asociadas con la presencia de una nueva cepa del virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV) (Andrade et al., 2022). Durante la evaluación del transcriptoma de camarones infectados con IMNV, se identificó una secuencia divergente adicional correspondiente a un nuevo miembro de la familia *Soliniviridae*, recientemente denominado *Penaeus vannamei* Solinvivirus (PvSV) (Andrade et al., 2022; Cruz-Flores et al., 2022). La caracterización del PvSV en los ejemplares de *P. vannamei* de Brasil genera interrogantes sobre la posible interacción sinérgica entre

ambos virus, ya que contribuye a una enfermedad de rápida progresión con alta tasa de mortandad (Cruz-Flores et al., 2022).

El movimiento de camarones de Indonesia a Brasil ha sido identificado como la causa de la introducción del PvSV al continente americano. Hay evidencia de que este virus se está dispersando y está presente en otros países, lo que subraya la importancia de este estudio.

El genoma del PvSV consiste en ARN lineal de sentido positivo no segmentado, con una longitud de 10-11 kb, y las proteínas de su cápside están codificadas hacia el extremo 3' del genoma, expresándose a partir de un ARN subgenómico (Valles et al., 2016; Valles & Hashimoto, 2009). El genoma completo del PvSV abarca 10,44 kb y codifica una poliproteína de 3327 aminoácidos (Cruz-Flores et al., 2022). Se han identificado cinco dominios conservados que codifican una helicasa, RdRp, proteína de cubierta de calicivirus, parche G y proteína de tegumento (Cruz-Flores et al., 2022). Una característica distintiva de este virus, en comparación con otros miembros de la familia *Soliniviridae*, es la presencia de señales de localización nuclear putativas (Cruz-Flores et al., 2022). El tropismo tisular del PvSV es amplio, ya que infecta células del hepatopáncreas, tracto gastrointestinal, órganos linfoides y tejido muscular (Cruz-Flores et al., 2022).

En 2015, en China, se detectó por primera vez un virus muy similar, que podría ser considerado la versión asiática del PvSV, que fue nombrado Wenzhou shrimp virus 8 (WzSV8) (Li et al., 2015). Secuencias virales adicionales provenientes de Tailandia, Indonesia y Australia presentaron una gran similitud de identidad con el Wenzhou shrimp virus 8. En 2021, una de estas secuencias virales se depositó en el GenBank bajo el nombre de *Penaeus vannamei* Picornavirus (PvPV) (Srisala et al., 2023). Todos estos virus pueden considerarse esas cepas o variantes del PvSV.

Este patógeno no ha sido estudiado en México, y considerando que en México se encuentran presentes todos los patógenos reportables por la WOAHP debido al movimiento de organismos, es muy probable que también esté presente aquí. Por lo tanto, este estudio es crucial para la identificación y manejo del PvSV en la región,

ayudando a prevenir su dispersión y minimizar su impacto en la industria camaronera local

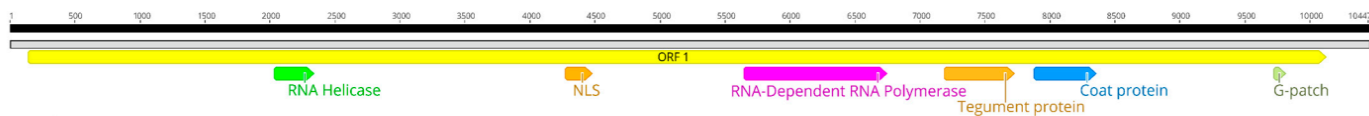


Figura 2. Organización del genoma de la *Penaeus vannamei* Solinvivirus. El genoma consta de un ORF grande con cinco dominios conservados identificados, que incluyen una helicasa de ARN (verde), una señal de localización nuclear (naranja), una polimerasa polimerasa de ARN dependiente de ARN (rosa), una proteína del tegumento (naranja), una proteína de cubierta de Calicivirus (azul) y G-parche (verde claro) (Cruz-Flores et al., 2022).

2.4. Secuenciación masiva de nueva generación (NGS) de ARN (RNA-seq) y el uso de herramientas informáticas

Las tecnologías de secuenciación masiva de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés) han revolucionado la genómica desde su introducción a principios del siglo XXI (Margulies et al., 2005). Los primeros métodos de secuenciación, como la secuenciación de Sanger, dominaban el campo desde la década de 1970, permitiendo secuenciar genomas pequeños y medianos de manera eficiente (Allende, 2018). Sin embargo, la necesidad de secuenciar genomas más grandes, como el humano, y de hacerlo de manera más rápida y a menor costo, llevó al desarrollo de tecnologías NGS (Schadt et al., 2010). Estas tecnologías permiten la secuenciación simultánea de millones de fragmentos de DNA, reduciendo drásticamente el tiempo y el costo de secuenciar genomas completos (Orta, 2021). El primer estudio que utilizó NGS para secuenciar un genoma completo fue publicado en 2005, utilizando la tecnología 454 Life Sciences, marcando el inicio de una nueva era en la investigación genética (Margulies et al., 2005).

Los avances en las tecnologías de NGS han permitido una expansión significativa en el alcance y la precisión de los estudios genómicos. Desde la secuenciación de exomas completos hasta la metagenómica y la secuenciación de transcriptomas, NGS ha facilitado la exploración de la biodiversidad microbiana, la identificación de variantes genéticas asociadas a enfermedades, y el análisis de la expresión génica a una escala sin precedentes (Gómez Cendrero, 2021). Además, la capacidad de secuenciar RNA, conocida como RNA-Seq, ha proporcionado una herramienta

poderosa para estudiar el transcriptoma, permitiendo a los investigadores observar la dinámica de la expresión génica, el procesamiento de RNA y la identificación de nuevas formas de RNA no codificantes (Emrich et al., 2007). Con el tiempo, las plataformas de NGS se han vuelto más accesibles, y los costos han disminuido, haciendo que estas tecnologías sean una herramienta estándar en laboratorios de investigación y clínicas (Bao et al., 2012).

En los últimos años, los avances en la secuenciación de tercera generación, como la secuenciación de molécula única y la secuenciación en tiempo real, han comenzado a complementar y, en algunos casos, superar a las tecnologías NGS tradicionales (Korlach et al., 2010). Estas nuevas metodologías permiten la lectura de fragmentos de DNA más largos, lo que mejora la precisión de la secuenciación en regiones genómicas complejas y facilita el ensamblaje de genomas de novo (Herráiz-García, 2015). Además, las mejoras en la precisión y velocidad de las plataformas NGS han abierto nuevas oportunidades en áreas como la medicina personalizada, donde el análisis del genoma individual puede guiar tratamientos específicos para enfermedades como el cáncer (Góngora, 2017). Así, la secuenciación masiva continúa evolucionando, impulsando el progreso en la biología molecular, la genética y la biomedicina.

Las herramientas bioinformáticas han sido fundamentales para aprovechar al máximo los datos generados por las tecnologías de secuenciación masiva de próxima generación (NGS). A medida que la capacidad de secuenciación ha aumentado, también lo ha hecho la cantidad de datos generados, requiriendo métodos avanzados de análisis y almacenamiento (Bao et al., 2012; Zapata & Pretell, 2015). Las herramientas bioinformáticas permiten a los investigadores ensamblar, mapear y anotar secuencias genómicas, así como identificar variantes genéticas y analizar patrones de expresión génica (Frías López, 2019). Programas como BLAST, que permite la comparación de secuencias contra bases de datos genéticas, y software de ensamblaje como SPAdes y Velvet, son esenciales para construir genomas completos a partir de fragmentos de secuencias cortas (Ejigu & Jung, 2020). Además, plataformas como Galaxy y pipelines automatizados han facilitado el acceso a la bioinformática para investigadores que no son especialistas en el área, permitiendo

la integración de diversas herramientas para análisis complejos (Blankenberg et al., 2010).

En los últimos años, el desarrollo de algoritmos más eficientes y la implementación de inteligencia artificial han mejorado significativamente las capacidades de las herramientas bioinformáticas (Canal-Alonso et al., 2022). Estos avances permiten no solo un procesamiento más rápido de los datos, sino también una mayor precisión en la identificación de variantes genéticas y en la predicción de funciones génicas. Herramientas como GATK (Genome Analysis Toolkit) y SnpEff se utilizan ampliamente en el análisis de variantes, mientras que programas como HISAT2 y STAR son cruciales para el alineamiento de secuencias de RNA (Canal-Alonso et al., 2022; Cornish & Guda, 2015). Además, el uso de bases de datos como Ensembl y NCBI, junto con herramientas de visualización de datos como IGV (Integrative Genomics Viewer), ha facilitado la interpretación de resultados, permitiendo una comprensión más profunda de los genomas estudiados (Blázquez Martín, 2022). Estas herramientas continúan evolucionando, adaptándose a los desafíos que presentan los datos genómicos a gran escala, y desempeñan un papel crucial en la investigación genética y biomédica moderna.

2.5. Las NGS y la caracterización de nuevos agentes infecciosos del camarón

Las herramientas de secuenciación masiva de próxima generación han revolucionado la detección y caracterización de agentes infecciosos en la industria del camarón (Machado Tamayo, 2006). Estas tecnologías permiten la secuenciación simultánea de millones de fragmentos de ADN y ARN, proporcionando una visión exhaustiva de los microorganismos presentes en muestras de camarón y sus entornos (Liu & Cordes, 2004). A diferencia de los métodos tradicionales, que a menudo requieren el cultivo de organismos o un conocimiento previo de los patógenos a buscar, la NGS permite la identificación tanto de patógenos conocidos como emergentes, sin estas limitaciones, lo que ha mejorado significativamente la capacidad de diagnóstico en la acuicultura (Aguilar, 2024).

Uno de los avances más destacados gracias a la NGS es la capacidad de caracterizar el metagenoma completo de las muestras de camarón, lo que incluye la identificación de bacterias, virus, hongos y otros microorganismos que forman parte de la microbiota

del camarón (Reyes & Castillo, 2023). La secuenciación metagenómica, combinada con análisis bioinformáticos avanzados, no solo permite detectar los patógenos presentes, sino también explorar la diversidad genética de estos organismos, identificando nuevas variantes que podrían no ser detectadas por métodos convencionales (Berberian et al., 2021). Este enfoque es crucial para la detección de patógenos emergentes y la prevención de brotes epidémicos en la industria.

En este trabajo, se utilizarán estas herramientas avanzadas de NGS y bioinformática para caracterizar una nueva variante del *Penaeus vannamei* Solinvivirus (PvSV) identificada en México. Dado que México ya alberga todos los patógenos reportables por la OIE debido al movimiento de organismos, es altamente probable que este nuevo patógeno también esté presente en las poblaciones locales de camarón. La aplicación de estas tecnologías permitirá no solo la identificación precisa y rápida de este virus, sino también el desarrollo de herramientas de diagnóstico específicas que contribuirán a la mejora de la bioseguridad y a la sostenibilidad de la industria camaronera en México.

3. Justificación

La dispersión global de agentes patógenos en el camarón plantea una amenaza significativa al desarrollo sostenible de la acuicultura. En los últimos años, se han identificado dos virus de ARN vinculados con mortandades masivas en América Latina: el Virus de la Mionecrosis Infecciosa y el *Penaeus vannamei* Solinvivirus. Hasta el momento, ninguno de estos patógenos ha sido reportado en México. No obstante, es importante señalar que, en el ciclo de cultivo del 2023 en las regiones de Sonora, Sinaloa y Baja California Sur, se han experimentado muertes masivas inusuales sin una causa patológica definitiva identificada. Existe la posibilidad de que estos eventos estén relacionados con los mencionados virus debido a que generan interrogantes sobre que la interacción sinérgica entre ambos virus, ya que contribuye a una enfermedad de rápida progresión con alta tasa de mortandad donde se observan una afectación del tejido muscular tanto en juveniles como en postlarvas de *P. vannamei*. En consecuencia, es de vital importancia realizar una evaluación exhaustiva para determinar la presencia de estos patógenos en México y su posible implicación en las mortandades atípicas que se han observado a lo largo de 2023. En este trabajo se plantea caracterizar a nivel de genoma completo a los posibles

agentes infecciosos asociados con las mortalidades masivas de Sonora, Sinaloa y Baja California Sur mediante la secuenciación del transcriptoma.

4. Hipótesis

El Virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV) y el *Penaeus vannamei* Solinivirus (PvSV) están presentes en muestras de camarones cultivados en Sonora y Baja California Sur que experimentaron eventos de mortalidad durante el ciclo de cultivo del año 2023.

5. Objetivos

5.1. Objetivo principal

Evaluar la presencia y realizar la caracterización genética del Virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV) y del *Penaeus vannamei* Solinivirus (PvSV) en muestras de camarón provenientes de Sonora y Sinaloa.

5.2. Objetivos específicos

- Detectar la presencia de PvSV, IMNV, IHHNV, WSSV, AHPND (Necrosis Hepatopancreática Aguda), EHP (Infección por *Enterocytozoon hepatopenaei*), MBV (Monodon Baculovirus), NHP (Hepatopancreatitis Necrotizante) y SHIV (Virus Iridiscente de Hemocitos de Camarón) mediante PCR convencional y secuenciación Sanger.
- Caracterizar genéticamente las variantes mexicanas de IMNV y PvSV que afectan a *Penaeus vannamei* en cultivos del noroeste de México mediante análisis transcriptómicos y bioinformáticos.

6. Diseño experimental y metodología

6.1. Origen de las muestras

Las muestras de hepatopáncreas y pleópodos de *Penaeus vannamei* fueron enviadas en junio de 2023 por el personal de dos instalaciones comerciales de producción ubicadas en los estados de Sonora y Baja California Sur, en el noroeste de México. La cantidad y las condiciones de las muestras dependieron de la disponibilidad

proporcionada por los productores. Se examinaron un total de 24 muestras (X de una granja y Y de la otra), de las cuales seis fueron conservadas en solución de alcohol etílico y 18 en solución estabilizadora RNALater, en una proporción de 1:10 (véase Tabla 1). Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

Tabla 1. Número y origen de cada muestra con el tipo de análisis en el que se sometió: Extracción de RNA (A), Extracción de ADN (B), RT-PCR (C), Pruebas de PCR para detección de enfermedades específicas (D), Secuenciación Sanger de los productos PCR (E), Secuenciación de próxima generación para identificación de virus (F), Análisis bioinformático (G).

| Número de muestra | Origen | Tipo de análisis |
|-------------------|---------------------|------------------|
| 1 | Sonora | A, C, D, E, G |
| 2 | Sonora | A, C, D, E, G |
| 3 | Sonora | A, C, D |
| 4 | Sonora | A, C, D, E, F, G |
| 5 | Sonora | A, C, D, E, G |
| 6 | Sonora | A, C, D |
| 7 | Baja California Sur | B, D, E, G |
| 8 | Baja California Sur | B, D |
| 9 | Baja California Sur | B, D, E, G |
| 10 | Baja California Sur | B, D, E, G |
| 11 | Baja California Sur | B, D, E, G |
| 12 | Baja California Sur | B, D, E, G |
| 13 | Baja California Sur | B, D, E, F, G |
| 14 | Baja California Sur | B, D |
| 15 | Baja California Sur | B, D |
| 16 | Baja California Sur | B, D, E, G |
| 17 | Baja California Sur | B, D, E, F, G |
| 18 | Baja California Sur | B, D |
| 19 | Baja California Sur | B, D |
| 20 | Baja California Sur | B, D |
| 21 | Baja California Sur | B, D |
| 22 | Baja California Sur | B, D |
| 23 | Baja California Sur | B, D |
| 24 | Baja California Sur | B, D, E, G |

6.2. Extracción de ARN y análisis de la concentración

La extracción de ARN de las muestras provenientes de ambas localidades se realizó utilizando el kit de purificación RNeasy® Mini Kit (50) de QIAGEN (Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante (véase Anexo 1). Posteriormente, la concentración de ARN se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

6.3. Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit de purificación FFPE DNA Purification Kit de NORGEN BIOTEK CORP, siguiendo el protocolo especificado por el fabricante (véase Anexo 2). Posteriormente, la concentración de ADN se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000, asegurando la precisión en la cuantificación del ADN extraído para su uso en análisis posteriores.

6.4. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

El cDNA se generó utilizando el kit Tetro™ cDNA Synthesis Kit de Meridian Bioscience, siguiendo las recomendaciones del fabricante (véase Anexo 3). Los reactivos y las cantidades utilizadas para la síntesis de cDNA se detallan en el Anexo 4. La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador ACT 201 de Apollo Instrumentation, garantizando la precisión y la eficiencia en la conversión de ARN a cDNA para su uso en análisis posteriores.

6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar PvSV y otros agentes infecciosos

Las mezclas para las reacciones de PCR se prepararon utilizando los reactivos MyTaq™ DNA Polymerase de Meridian Bioscience, siguiendo las recomendaciones del fabricante (véase Anexo 5). Los reactivos y las cantidades empleadas se detallan en el Anexo 6. Para cada agente infeccioso se utilizó un par específico de cebadores (véase Tabla 2). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador ACT 201 de Apollo Instrumentation. Los productos de la PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, con tinción de 40 µg/ml de solución GelRed™, durante 40 minutos a 120 voltios. Para todos los agentes infecciosos, se utilizaron controles positivos plasmídicos correspondientes a la región específica del patógeno.

Tabla 2. Primers empleados en el estudio para determinar y amplificar los fragmentos de los agentes infecciosos con el método de detección de PCR convencional.

| Plantilla | Virus | Secuencia 5'-3' | | Tamaño de amplificación (pb) | Referencia |
|-----------|-------|--------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------|
| | | Sentido | Antisentido | | |
| cDNA | PvCV | CCTCTGCCGGTTTCCTTTCT | TTGAGAGGAGTGTCGCGTTC | 220 | (Cruz-Flores, 2022) |
| cDNA | IMNV | TGTAGCAGCAGAGAAGAG | CACTAAGCCTATCTCCAG | 644 | - |
| ADN | IHHNV | TCCAACACTTAGTCAAAACCAA | TGTCTGCTACGATGATTATCCA | 309 | - |
| ADN | EHP | GCCTGAGAG ATGGCTCCACGT | GCGTACTATCCCCAGAGCCCGA | 510 | - |
| ADN | AHPND | TCACGGCTTTGAACATATGC | CATCTTCGGTACCTGTAGCA | 149 | - |
| ADN | SHIV | AGGAGAGGGAAATAACGGGAAAAC | CGTCAGCATTTGGTTCATCCATG | 188 | - |
| ADN | MBV | AATCCTAGGCGATCTTACCA | CGTTCGTTGATGAACATCTC | 261 | - |
| ADN | NHP | CGTTGGAGGTTTCGTCCTTCAGT | GCCATGAGGACCTGACATCATC | 379 | - |
| ADN | WSSV | TGGTCCCCTCCTCATCTCAG | GCTGCCTTGCCGGAAATTA | 70 | - |

6.6. Secuenciación Sanger de los productos PCR.

Las muestras que generaron fragmentos del tamaño esperado fueron enviadas a la empresa Eton Bioscience® en San Diego, California, para su purificación y secuenciación utilizando la técnica de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software Geneious Prime, versión 2023.1, donde se realizó la limpieza de las secuencias, se generó un alineamiento consenso y se comparó su similitud con la base de datos de GenBank utilizando la herramienta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

6.7. Secuenciación de próxima generación

6.7.1 Envío de muestra y RNAseq

Las muestras positivas a PvSV fueron enviadas a la empresa OmegaBioservices, ubicada en Norcross, Georgia. Para la preparación de la librería, se utilizó el kit comercial TruSeq Stranded Total RNA Library Prep (Illumina, San Diego, CA, USA). La secuenciación de la muestra se realizó en el sistema Illumina HiSeq 2500 (PE 2X150PE).

6.7.2 Análisis bioinformático

Las secuencias recibidas de OmegaBioservices fueron importadas al programa Geneious Prime Versión 2023.1. Se sometieron a un análisis de calidad y la remoción de los adaptadores utilizando el Plug-in BBDuk. Se generó un archivo resultante de la eliminación de adaptadores y con este mismo se realizó un mapa de referencia seleccionando la secuencia NC_032852 para ensamblarlo en un genoma de referencia de Wenzhou virus 8, previamente descargada del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Los parámetros fueron predeterminados con una similitud del 80% para el mínimo de bases idénticas en la región superposición para el ensamblaje. Generando una secuencia final de nombre Consensus. Se corroboró el porcentaje de identidad de la secuencia final con otros virus en las herramientas de búsqueda BLASTN y BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para la identificación de la gran poli proteína se activaron los Finds ORFs y se seleccionó el primero, después se utilizó Extract y Translate Estandar para la obtención de la secuencia en aminoácidos. Se emplearon los programas Motif Search Genome (<https://www.genome.jp/tools/motif/>) y GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para la identificación de los dominios conservados en la secuencia viral.

7. Resultados

7.1. Análisis de los agentes infecciosos mediante el método de diagnóstico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En el muestreo realizado en dos granjas del noroeste de México, se detectaron los virus objetivos del estudio, PvSV e IMNV, en los camarones. Además, se identificaron otros patógenos analizados, como IHNV y AHPND (véase Tabla 3). Estos hallazgos indican la presencia de los virus mencionados, lo que sugiere la necesidad de realizar un muestreo más amplio para determinar la prevalencia de estos virus en la región. En la Figura 6 se muestran aquellas muestras que resultaron positivas para el patógeno objetivo del estudio, PvSV, con un tamaño de amplificación de 220 pb, confirmado mediante el marcador molecular (MM). En seguida se observan las muestras que resultaron amplificadas en la electroforesis de AHPND e IHNV (véase Figura 5 y Figura 6).

Tabla 3. Análisis de las muestras de hepatopáncreas y pleópodos de *P. vannamei* mediante la técnica PCR para la detección de los agentes infecciosos, Presencia= positivo (+), Ausencia= negativo (-).

| Número de muestra | Agente infeccioso | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------|------|-------|-----|-------|------|-----|-----|------|
| | PvSV | IMNV | IHHNV | EHP | AHPND | SHIV | MBV | NHP | WSSV |
| 1 | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| 2 | - | + | - | + | - | - | + | - | - |
| 3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | - | - | + | - | - | + | - | - | - |
| 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | - | + | - | + | - | - | - | - | - |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | - | - | + | - | - | - | + | - | - |
| 10 | - | - | + | - | + | - | - | + | - |
| 11 | - | - | + | - | + | - | + | + | - |
| 12 | - | - | + | + | + | + | - | + | - |
| 13 | + | - | + | - | + | - | - | + | - |
| 14 | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 15 | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 16 | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 17 | + | - | + | - | - | + | - | - | - |
| 18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 19 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 21 | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 22 | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 23 | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 24 | - | + | - | - | - | - | - | - | - |

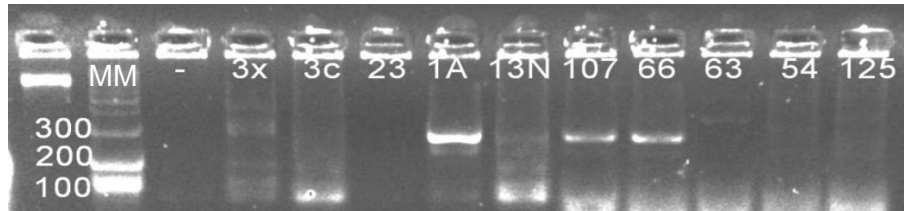


Figura 3. Detección de tres fragmentos de 220 pb de *Penaeus vannamei* Solinvivirus en gel de agarosa del 2% en un transiluminador. Se observan el marcador molecular (MM), el control negativo (-) y la amplificación de las tres muestras.

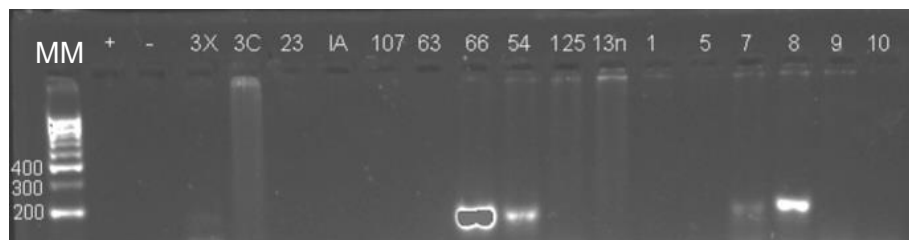


Figura 4. Detección de cuatro fragmentos de 149 pb de AHPND en gel de agarosa del 2% en un transiluminador. Se observan el marcador molecular (MM), el control positivo (+), el control negativo (-) y la amplificación de las cuatro muestras.

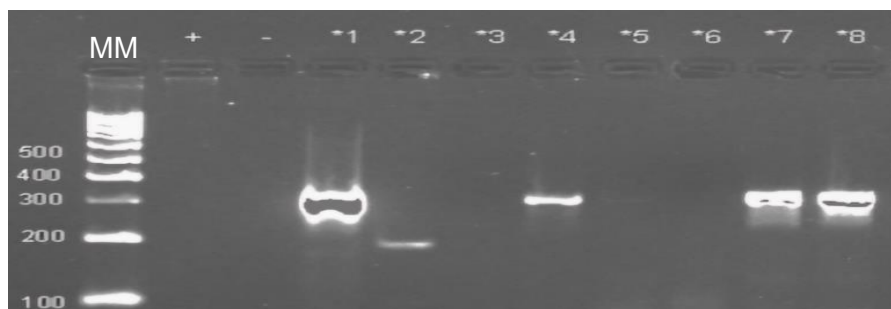


Figura 5. Detección de cuatro fragmentos de 309 pb de IHHNV en gel de agarosa del 2% en un transiluminador. Se observan el marcador molecular (MM), el control positivo (+), el control negativo (-) y la amplificación de las cuatro muestras.

7.2. Confirmación de la identidad de PvSV, AHPND, IHHNV mediante secuenciación Sanger.

La identidad de PvSV, AHPND e IHHNV se corroboró mediante secuenciación Sanger. El alineamiento de las secuencias Forward y Reverse de PvSV generó un fragmento consenso de 176 pb (véase Figura 6). De manera similar, el alineamiento de las secuencias de AHPND produjo un fragmento consenso de 151 pb (véase Figura 7), y el alineamiento de las secuencias de IHHNV resultó en un fragmento

consenso de 310 pb (véase Figura 8). En la Tabla 4 se presentan las tres primeras secuencias de cada agente infeccioso, mostrando el porcentaje de identidad y cobertura. La mayoría de las secuencias exhibieron una similitud del 95% al 100%.

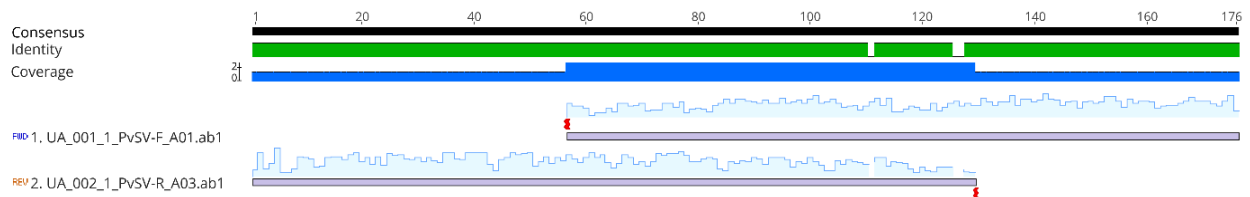


Figura 6. Alineamiento de las secuencias Forward y Reverse de PvSV. La parte superior se observa la secuencia consenso (Consensus), la línea verde indica el porcentaje de identidad entre las secuencias Forward y Reverse. La línea azul indica la cobertura. Las líneas violetas indican la clave de las secuencias Forward (UA_001_1_PvSV-F_A01.ab1) y Reverse (UA_002_1_PvSV-R_A03.ab1).

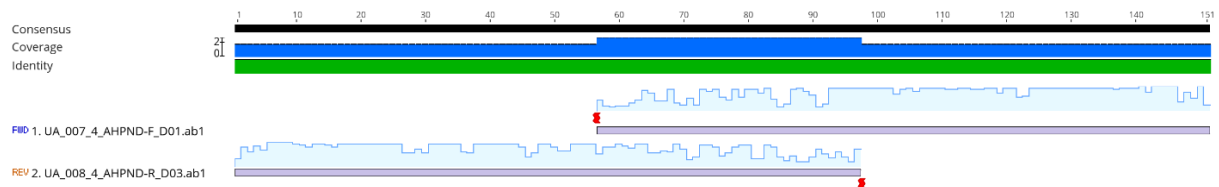


Figura 7. Alineamiento de las secuencias Forward y Reverse de AHPND. La parte superior se observa la secuencia consenso (Consensus), la línea verde indica el porcentaje de identidad entre las secuencias Forward y Reverse. La línea azul indica la cobertura. Las líneas violetas indican la clave de las secuencias Forward (UA_007_4_AHPND-F_D01.ab1) y Reverse (UA_008_4_AHPND-R_D03.ab1).

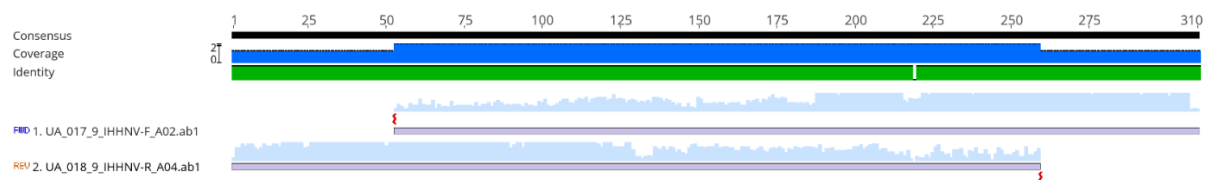


Figura 8. Alineamiento de las secuencias Forward y Reverse de IHNV. La parte superior se observa la secuencia consenso (Consensus), la línea verde indica el porcentaje de identidad entre las secuencias Forward y Reverse. La línea azul indica la cobertura. Las líneas violetas indican la clave de las secuencias Forward (UA_017_9_IHNV-F_A02.ab1) y Reverse (UA_018_9_IHNV-R_A04.ab1).

Tabla 4. Resultados del análisis BLASTn de las secuencias consenso de PvSV, AHPND e IHHNV, indicando los porcentajes de identidad y cobertura en comparación con otros agentes infecciosos, junto con sus números de accesoión.

| Clave | Agente infeccioso | Cobertura de consulta (%) | Porcentaje de identidad (%) | No. accesoión |
|--|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------|
| UA_001_1_PvSV-F_A01.ab1 UA_002_1_PvSV-R_A03.ab1 | Penaeus vannamei picornavirus | 96% | 98.22% | OK662577.1 |
| | Penaeus vannamei solinvivirus | 98% | 97.13% | OP265432.1 |
| | Wenzhou shrimp virus 8 | 98% | 96.55% | KX883984.1 |
| UA_003_2_PvSV-F_B01.ab1 UA_004_2_PvSV-R_B03.ab1 | Penaeus vannamei picornavirus | 94% | 96.99% | OK662577.1 |
| | Penaeus vannamei solinvivirus | 97% | 95.91% | OP265432.1 |
| | Wenzhou shrimp virus 8 | 97% | 95.32% | KX883984.1 |
| UA_005_3_PvSV-F_C01.ab1 UA_006_3_PvSV-R_C03.ab1 | Penaeus vannamei solinvivirus | 98% | 97.13% | OP265432.1 |
| | Penaeus vannamei picornavirus | 96% | 97.04% | OK662577.1 |
| | Wenzhou shrimp virus 8 | 98% | 95.40% | KX883984.1 |
| UA_007_4_AHPND-F_D01.ab1 UA_008_4_AHPND-R_D03.ab1 | Vibrio parahaemolyticus | 100% | 100% | MN480428.1 |
| | Vibrio parahaemolyticus | 100% | 100% | MK368635.1 |
| | Vibrio parahaemolyticus | 100% | 100% | CP034308.1 |
| UA_011_6_AHPND-F_F01.ab1 UA_012_6_AHPND-R_F03.ab1 | Vibrio parahaemolyticus | 100% | 100% | MN480428.1 |
| | Vibrio parahaemolyticus | 100% | 100% | MK368635.1 |
| | Vibrio parahaemolyticus | 100% | 100% | CP034308.1 |

| | | | | |
|--------------------------|-----------------------------|-----|--------|------------|
| UA_013_7_IHHNV-F_G01.ab1 | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KU992382.1 |
| | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KU373072.1 |
| | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KP733862.1 |
| UA_014_7_IHHNV-R_G03.ab1 | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KU992382.1 |
| | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KU373072.1 |
| | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KP733862.1 |
| UA_015_8_IHHNV-F_H01.ab1 | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 99.68% | KU373072.1 |
| | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 99.68% | KP733862.1 |
| | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 99.68% | KP733861.1 |
| UA_016_8_IHHNV-R_H03.ab1 | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KU992382.1 |
| | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KU373072.1 |
| | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KP733862.1 |
| UA_017_9_IHHNV-F_A02.ab1 | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KU992382.1 |
| | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KU373072.1 |
| | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KP733862.1 |
| UA_018_9_IHHNV-R_A04.ab1 | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KU992382.1 |
| | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KU373072.1 |
| | Decapod penstyldensovirus 1 | 99% | 100% | KP733862.1 |

7.3. Análisis de secuencia y organización del genoma de *Penaeus vannamei* Solinvivirus

Se logró caracterizar el genoma completo de PvSV Mex, con una longitud de 10,4 kb (excluyendo la cola poli-A) y una cobertura media de 9848. El genoma presenta un único marco de lectura abierto (ORF) de gran tamaño, de 9981 nucleótidos, que codifica una poliproteína de 3327 aminoácidos. Mediante el programa MOTIF Search, se identificaron cinco dominios conservados que codifican una helicasa, una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), una proteína de cubierta de calicivirus y un parche G. Adicionalmente, utilizando GenBank, se identificaron otros dominios, incluidos una señal de localización nuclear (NLS) y una proteína del tegumento (véase Figura 9). El análisis de la secuencia del ORF 1 mostró una identidad del 99.88% con el virus *Penaeus vannamei* Solinvivirus (OP265432.1) (véase Tabla 5). Además, el análisis de la secuencia de aminoácidos de los dominios conservados de helicasa y RdRp reveló una similitud del 100% con el virus del camarón Wenzhou (YP_009336733.1) y con el *Penaeus vannamei* Solinvivirus (UWY63979.1).

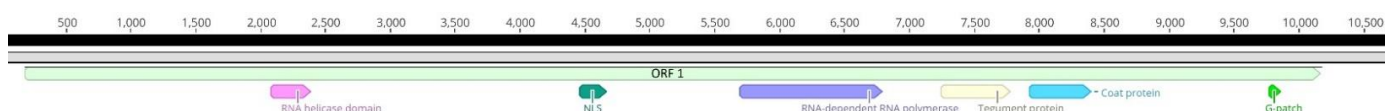


Figura 9. Organización genómica del *Penaeus vannamei* Solinvivirus Mex. El genoma constituye de un gran marco de lectura abierto (ORF). Se identificaron seis dominios, que incluyen de una helicasa de ARN (rosa), una señal de localización nuclear (aqua), una polimerasa de ARN dependiente de ARN (morado), una proteína de tegumento (amarillo), una proteína de cubierta de Calicivirus (azul) y parche-G (verde).

Tabla 5. Similitud en la secuencia de aminoácidos del genoma completo, helicasa y ARN polimerasa dependiente de ARN de *Penaeus vannamei* Solinvivirus Mex mostrando los primeros tres resultados con sus porcentajes (%) de identidad y cobertura, número de accesoión y E-Value.

| Virus | Accesión | Cubierta de consulta (%) | E-Value | Porcentaje de identidad (%) |
|--|----------------|--------------------------|----------------------|-----------------------------|
| Genoma completo | | | | |
| <i>Penaeus vannamei</i> Solinvivirus | OP265432.1 | 96 | 0.0 | 99.88 |
| Wenzhou shrimp virus 8 | KX883984.1 | 96 | 0.0 | 93.35 |
| Wenzhou shrimp virus 8 | NC_032852.1 | 96 | 0.0 | 93.35 |
| Helicasa | | | | |
| Hypothetical protein (Wenzhou shrimp virus 8) | YP_009336733.1 | 100 | 8×10^{-111} | 100 |
| Polyprotein (<i>Penaeus vannamei</i> Solinvivirus) | UWY63979.1 | 100 | 1×10^{-110} | 100 |
| Hypothetical protein (<i>Penaeus vannamei</i> Picornavirus) | UIU06302.1 | 100 | 3×10^{-110} | 99.40 |
| ARN polimerasa dependiente de ARN | | | | |
| Polyprotein (<i>Penaeus vannamei</i> Solinvivirus) | UWY63979.1 | 100 | 0.0 | 100 |
| Hypothetical protein (Wenzhou shrimp virus 8) | YP_009336733.1 | 100 | 0.0 | 99.45 |
| Hypothetical protein (<i>Penaeus vannamei</i> picornavirus) | UIU06302.1 | 100 | 0.0 | 99.18 |

8. Discusión

Desde 2016, varios estados de Brasil han enfrentado una disminución significativa en la producción camaronera debido a mortalidades asociadas con una cepa divergente IMNV en confección con PvSV. Estudios recientes han confirmado la presencia de este patógeno en la región (Andrade et al., 2022; Cruz-Flores et al., 2022) y, por primera vez, se ha realizado una investigación similar en México. En este contexto, el análisis del transcriptoma de camarones moribundos ha revelado la presencia de una nueva variante del *Penaeus vannamei* Solinvivirus (PvSV), tentativamente denominada PvSV Mex. La evidencia de Brasil sugiere que las mortandades

inusuales pueden ser el resultado de una coinfección sinérgica entre IMNV y PvSV, lo que exagera la gravedad de la enfermedad (Cruz-Flores et al., 2022).

El análisis genómico del PvSV Mex reveló una alta similitud con el PvSV identificado en Brasil, lo que sugiere una relación estrecha entre estas dos variantes. Ambas cepas comparten un mayor grado de similitud entre sí que con las cepas asiáticas del virus (Liu et al., 2021; Srisala et al., 2023), lo que podría indicar una ruta de diseminación común o un origen geográfico compartido. Este hallazgo es particularmente relevante, ya que resalta la posibilidad de que el PvSV haya seguido un patrón de transmisión entre América Latina, en lugar de haber sido introducido desde Asia. La similitud entre estas cepas también podría estar relacionada con la adaptación del virus a las condiciones ambientales/cultivo y a las poblaciones de camarón en estas regiones específicas (Sanjuán et al., 2010).

A nivel de aminoácidos, las proteínas identificadas en el PvSV Mex mostraron ser muy similares, e incluso en algunos casos idénticas, a todas las otras cepas del virus. Esta alta similitud en las proteínas virales refuerza la idea de una relación cercana entre ambas cepas y sugiere que podrían compartir mecanismos de patogenicidad similares (Cobo Paz, 2020; Zapata & Pretel, 2015). No obstante, es crucial realizar análisis filogenéticos más detallados para elucidar las relaciones evolutivas entre las diferentes cepas de PvSV. Estos estudios ayudarán a comprender mejor la dispersión geográfica del virus, sus posibles orígenes y la evolución de su patogenicidad en diferentes entornos y poblaciones de camarón (Aguilar, 2024).

En el caso de México, la interacción del PvSV con otros patógenos presentes en las granjas camaroneras, como el IHHNV (Virus de la Necrosis Hipodérmica e Hematopoyética Infecciosa) y AHPND (Necrosis Hepatopancreática Aguda), podría estar causando mortalidades más agudas debido a posibles coinfecciones (Berberian et al., 2021). La coinfección con IHHNV, conocido por su capacidad de debilitar la integridad del tejido, y AHPND, responsable de la rápida destrucción del hepatopáncreas, podría potenciar la patogenicidad del PvSV, llevando a una mayor incidencia de mortalidad en las poblaciones de camarón (Cuéllar-Anjel, 2013; Varela Mejías et al., 2017). Este fenómeno subraya la importancia de entender cómo la

coexistencia de múltiples patógenos puede influir en la salud del camarón y en la dinámica de la enfermedad en los sistemas de cultivo (Lee et al., 2022).

La probabilidad de que PvSV Mex sea un patógeno débil o no predominante de entrada sugiere que podría aumentar la proliferación de otras identidades, lo que a su vez su virulencia (Martín Ríos et al., 2022). La competencia entre virus por los recursos de la célula huésped y la interacción entre ellos influyen en su capacidad de replicación y propagación (Melena, 2005). Esto sugiere que la coinfección puede ser un factor importante en la patogénesis de enfermedades en camarones.

En este estudio, el uso de análisis transcriptómicos permitió la caracterización del PvSV a nivel de genoma completo de manera relativamente eficiente. Esta metodología no solo facilitó la identificación de secuencias virales específicas, sino que también permitió la detección de variantes genéticas dentro del genoma del PvSV (Godoy, 2009; Muhire et al., 2014). La capacidad de secuenciar y ensamblar el genoma completo del PvSV ofrece una valiosa perspectiva sobre la estructura genética del virus y sus posibles mecanismos de patogenicidad, lo que es esencial para el desarrollo de estrategias de control y prevención (Aguilar, 2024).

La caracterización del genoma completo del virus PvSV Mex es un logro significativo en la comprensión de la biología y la patogénesis de este virus en los camarones. El análisis de la secuencia del genoma reveló una longitud de 10,4 kilobases y una cobertura media de 9848, lo que indica una alta calidad en la secuenciación. Los resultados sugieren una alta similitud con otros virus de la familia *Solinviviridae* y una estrecha relación con otros virus de camarones. La mayoría de las secuencias exhibieron una similitud del 95% al 100%, lo que sugiere una alta homología entre las secuencias de cada agente infeccioso. Esto es importante para entender la relación entre los diferentes aislamientos de cada agente infeccioso (Zapata & Pretell, 2015).

La detección del PvSV en México es una consecuencia de las lecciones no aprendidas sobre el movimiento indiscriminado de organismos sin la aplicación de medidas sanitarias adecuadas. Este fenómeno subraya la necesidad urgente de implementar y reforzar medidas de bioseguridad que prevengan la dispersión de agentes infecciosos (Figueredo et al., 2020). Una vez que estos patógenos se

introducen en una nueva región, su erradicación se vuelve prácticamente imposible, comprometiendo la salud de los cultivos y la estabilidad de la industria camaronera (Smith-Tsurkan et al., 2013).

La presencia de PvSV Mex es un hallazgo significativo que requiere una investigación más profunda para determinar su infectividad y patogénesis. El postulado de Rivers es un marco teórico que puede ser utilizado para evaluar su capacidad de desencadenar una enfermedad en el camarón (Cruz-Flores et al., 2022). Junto con pruebas histológicas para evaluar la respuesta del camarón a la infección de PvSV Mex (Cruz-Flores et al., 2022). Estas pruebas permitirán identificar los cambios patológicos en los tejidos del camarón y determinar la gravedad de la enfermedad (Damora et al., 2022). Incluso desarrollar herramientas de diagnósticos más sensibles y específicas para detectar la presencia de múltiples patógenos en camarón. Con el objetivo de aportar a futuras líneas de investigación que estudian la efectividad de diferentes estrategias de control y prevención de enfermedades de camarón en presencia de una coinfección (Aguilar, 2024).

Finalmente, es importante destacar que este estudio representa el primer reporte del PvSV en México, lo cual es un hallazgo significativo para la industria camaronera nacional. La información generada en este trabajo es crucial para el establecimiento de medidas de bioseguridad y el control del virus, contribuyendo a la protección de la salud de los cultivos de camarón y a la sostenibilidad a largo plazo de esta industria. La detección y caracterización temprana del PvSV permitirá a los productores y autoridades implementar acciones preventivas y correctivas que mitiguen el impacto de este patógeno emergente.

9. Conclusiones

Se confirmó la presencia del *Penaeus vannamei* Solinvivirus Mex (PvSV Mex) en México mediante técnicas de secuenciación y análisis bioinformáticos, lo que constituye el primer registro y caracterización genética de este patógeno en el país.

Se detectaron los agentes infecciosos IMNV, IHNV, AHPND, EHP, MBV y NHP en las muestras analizadas mediante técnicas moleculares y análisis bioinformáticos. Es

importante destacar que el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) fue el único patógeno que no se detectó en ninguna de las muestras.

El PvSV Mex se encontró en interacción con los patógenos IHHNV y AHPND, lo que sugiere la posibilidad de coinfecciones que podrían exacerbar la patogenicidad y aumentar la mortalidad en los cultivos de camarón. Sin embargo, a diferencia de lo observado en Brasil, no se detectó coinfección con IMNV en las muestras analizadas.

La alta similitud genómica y proteica entre PvSV Mex y las cepas brasileñas de PvSV sugiere una relación estrecha entre estas variantes, lo que indica un posible origen común o una ruta de transmisión geográfica específica dentro de América Latina. Esta similitud refuerza la necesidad de realizar análisis filogenéticos detallados para comprender mejor las relaciones evolutivas y la dispersión del virus.

La detección de PvSV Mex en México subraya la importancia de implementar medidas de bioseguridad estrictas y controles sanitarios en el movimiento de organismos, para prevenir la introducción y dispersión de patógenos en nuevas regiones.

Se demandan más estudios para determinar la infectividad de PvSV Mex mediante el postulado de Rivers y pruebas histológicas, con el fin de evaluar la patogénesis de la enfermedad y brindar a la comunidad científica una presentación clínica acertada y un tratamiento efectivo para contrarrestar la enfermedad.

10. Bibliografías

Aguilar, M. (2024). Estrategias de trazabilidad genética y análisis de parentesco en camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Tesis de Doctorado]. Centro de investigaciones biológicas del Noroeste, S.C.

Allende, M. L. (2018). La Lógica De Los Genomas. CENTRO DE REGULACIÓN DEL GENOMA.

Álvarez Azogue, A. A., & Franco Cedeño, E. M. (2023). Índice de financiamiento de las exportaciones del camarón ecuatoriano en tiempo de crisis. Revista

- Andrade, T. P. D., Cruz-Flores, R., Mai, H. N., & Dhar, A. K. (2022). Novel infectious myonecrosis virus (IMNV) variant is associated with recent disease outbreaks in *Penaeus vannamei* shrimp in Brazil. *Aquaculture*, 554. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738159>
- Bajaña Jordan, S. J., & Jacobo Bucaram Ortiz, D. (2023). Influencia del vinagre de Banano (*Musa paradisiaca*) sobre las características organolépticas de una conserva de camarón (*Litopenaeus vannamei*) [Tesis de Licenciatura]. Universidad Agraria del Ecuador.
- Bao, Y., Chetvernin, V., & Tatusova, T. (2012). Pairwise sequence comparison (PASC) and its application in the classification of filoviruses. *Viruses*, 4(8), 1318–1327. <https://doi.org/10.3390/v4081318>
- Berberian, G., Bologna, R., Pérez, M. G., Mangano, A., Costa, M., Calligaris, S., Morales, M. A., Rugilo, C., Ruiz-Burga, E., & Thorne, C. (2021). Causes of Microcephaly in the Zika Era in Argentina: A Retrospective Study. *Global Pediatric Health*, 8. <https://doi.org/10.1177/2333794X211040968>
- Billie, M., Dewalt, R., Ramírez-Zavala, J. R., Noriega, L., Esthela González, R., & Ramírez-Zavala, J. (2002). Shrimp aquaculture, the people and the environment in coastal. <https://www.researchgate.net/publication/259285149>
- Blankenberg, D., Kuster, G. Von, Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A., & Taylor, J. (2010). Galaxy: A web-based genome analysis tool for experimentalists. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Issue SUPPL. 89). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1910s89>
- Blázquez Martín, R. (2022). Asociaciones de la expresión génica (transcriptoma) Fenotipo en PMM2-CDG [Máster Universitario en Bioinformática]. Universidad Europea.
- Bondad-Reantaso, M. G., Arthur, J. R. & Subasinghe, R. P. (2008). Understanding and applying risk analysis in aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Canal-Alonso, Á., Egido, N., Jiménez, P., Prieto, J., & Corchado, J. M. (2022). Análisis de datos NGS: una revisión de las principales herramientas y marcos de trabajo para el descubrimiento de variantes. Departamento de Bioinformática y Biología Computacional, Instituto AIR. Carbajosa de la Sagrada

- Cobo Paz, V. (2020). Protocolo computacional para la asignación taxonómica de virus en metadatos genómicos [Tesis de Maestría en Bioinformática, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/80999>
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (4 de Mayo de 2018). Cultivo de camarón, producción acuícola de calidad. <https://www.gob.mx/conapesca/articulos/cultivo-de-camaron-produccion-acuicola-de-calidad>
- Comisión Nacional De Acuacultura Y Pesca, D. LA. (2020). ANUARIO ESTADÍSTICO DE ACUACULTURA Y PESCA 2020.
- Cornish, A., & Guda, C. (2015). A Comparison of Variant Calling Pipelines Using Genome in a Bottle as a Reference. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/456479>
- Cruz-Flores, R., Andrade, T. P. D., Mai, H. N., Alenton, R. R. R., & Dhar, A. K. (2022). Identification of a Novel Solinvivirus with Nuclear Localization Associated with Mass Mortalities in Cultured Whiteleg Shrimp (*Penaeus vannamei*). *Viruses*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/v14102220>
- Cuéllar-Anjel, J. (2013). Necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV). <http://www.rr-americas.oie.int/documentos/PATOLOGIA>
- Damora, A., Salsabila, C., Muhammadar, A. A., Arisa, I. I., Iskandar, C. D., Simanjuntak, D. G., & Fadli, N. (2022). Histopathological of the hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected by white feces disease. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 956(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/956/1/012016>
- Davis, D. A. (2022). Assessing the variability and discriminatory power of elemental fingerprints in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* from major shrimp production countries. *Food Control*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108589>
- Duffy, S. (2018). Why are RNA virus mutation rates so damn high? *PLoS Biology*, 16(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000003>
- Ejigu, G. F., & Jung, J. (2020). Review on the computational genome annotation of sequences obtained by next-generation sequencing. In *Biology* (Vol. 9, Issue 9, pp. 1–27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology9090295>

- Emrich, S. J., Barbazuk, W. B., Li, L., & Schnable, P. S. (2007). Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Research*, 17(1), 69–73. <https://doi.org/10.1101/gr.5145806>
- Feijó, R. G., Kamimura, M. T., Oliveira-Neto, J. M., Vila-Nova, C. M. V. M., Gomes, A. C. S., Coelho, M. das G. L., Vasconcelos, R. F., Gesteira, T. C. V., Marins, L. F., & Maggioni, R. (2013). Infectious myonecrosis virus and white spot syndrome virus co-infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmed in Brazil. *Aquaculture*, 380–383, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.026>
- Figueredo, A., Fuentes, J. L., Cabrera, T., León, J., Patti, J., Silva, J., Ron, E., Pichardo, O., & Marcano, N. (2020). Bioseguridad en el cultivo de camarones penaeidos: una revisión. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura.*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.33936/at.v2i1.2409>
- Flegel, T. W. (2006). The special danger of viral pathogens in shrimp translocated for aquaculture. *ScienceAsia*, 32(3), 215–221. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2006.32.215>
- Food and Agriculture Organization. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- Food and Agriculture Organization. (2021). 2020 farmed shrimp production declined in Asia but increased in Latin America. <https://www.fao.org/in-action/globefish/marketreports/resource-detail/es/c/1416629/>
- Food and Agriculture Organization. (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Frías López, C. (2019). Desarrollo de técnicas bioinformáticas para el análisis de datos de secuenciación masiva en sistemática y genómica evolutiva: Aplicación en el análisis del sistema quimiosensorial en artrópodos [Tesis doctoral]. Universidad de Barcelona.
- García, F. (2020). Producción de camarón crece para alimentar a México. *Revista Divulgación Acuícola*.
- Godoy, J. A. (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas*, 18(1), 23–33. <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?id=593>
- Gómez Cendrero, M. (2021). Revisión sobre los estudios del uso de la secuenciación de última generación ara mejorar la seguridad de los alimentos. [Tesis de Licenciatura]. Universidad de Extremadura.

- Góngora Alonso, S. (2017). Análisis de fuentes y técnicas de Big Data en el sector sanitario [MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN]. UNIVERSIDAD DE VALLADOLID.
- Gutiérrez Novillo, A. (2022). Influencia del uso de herramientas moleculares en el cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y sus avances en el Ecuador. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Técnica de Machala.
- Herráiz García, J. (2015). Desarrollo de herramientas morfológicas y genómicas para el estudio del pepino dulce (*Solanum muricatum*) y especies relacionadas. Caracterización de su valor nutracéutico [Tesis de Doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia.
- James L. Anderson., Diego Valderrama., Darryl E., & Jory. (2019). GOAL 2019: Revisión de la producción mundial de camarones. <https://www.globalseafood.org/advocate/goal-2019-revision-de-la-produccion-mundial-de-camarones/>
- Korlach, J., Bjornson, K. P., Chaudhuri, B. P., Cicero, R. L., Flusberg, B. A., Gray, J. J., Holden, D., Saxena, R., Wegener, J., & Turner, S. W. (2010). Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. In *Methods in Enzymology* (Vol. 472, pp. 431–455). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)72001-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)72001-2)
- Lee, D., Yu, Y. Bin, Choi, J. H., Jo, A. H., Hong, S. M., Kang, J. C., & Kim, J. H. (2022). Viral Shrimp Diseases Listed by the OIE: A Review. In *Viruses* (Vol. 14, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v14030585>
- Li, C.-X., Shi, M., Tian, J.-H., Lin, X.-D., Kang, Y.-J., Chen, L.-J., Qin, X.-C., Xu, J., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2015). Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *ELIFE*. <https://doi.org/10.7554/eLife.05378.001>
- Liu, S., Xu, T., Wang, C., Jia, T., & Zhang, Q. (2021). A novel picornavirus discovered in white leg shrimp *Penaeus vannamei*. *Viruses*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/v13122381>
- Liu, Z. J., & Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. In *Aquaculture* (Vol. 242, Issues 1–4, pp. 735–736). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.022>

- Machado Tamayo, R. J. (2006). Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) introduced to Cuba [Tesis presentada para la obtención del título de Maestro Internacional en Ciencias y Manejo de Pesquerías]. University of Tromsø, Norway.
- Mai, H. N., Hanggono, B., Caro, L. F. A., Komaruddin, U., Nur'aini, Y. L., & Dhar, A. K. (2019). Novel infectious myonecrosis virus (IMNV) genotypes associated with disease outbreaks on *Penaeus vannamei* shrimp farms in Indonesia. *Archives of Virology*, 164(12), 3051–3057. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04408-5>
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P. & Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature03959>
- Martín Ríos, L. D., Corrales Barrios, Y., González Salotén, M., Carrillo Farnés, O., Cabrera Alarcón, H., & Arenal Cruz, A. (2022). Main Factors that Modify the Immune System of Penaeid Shrimp for Sustainable Culture. *Revista de Producción Animal*, 1, 34. <https://revistas.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e4037>
- Melena, J. (2005). Estudio de la Co-infección viral IHHNV-WSSV en el camarón blanco *L. vannamei*. *GENAIM INFORMA*, 130. <http://groups.yahoo.com/group/shrimp/messenge/998>
- Morales, V., Cuéllar-Anjel, Q. J., Cuéllar-Anjel, J., Pantoja, C., Lightner, D. V, Moura, A., Pereira, L., Mendes, E. S., Cristina, T., Gesteira, V., Arns, V., Silva, D., Benedita, A., María, P., Morales-Covarrubias, S., Gómez, B., Margherita, G. R., Luciane, A. B., Perazzolo, M. & Suárez, G. (2014). *GUÍA TÉCNICA PATOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE CAMARONES PENAEIDOS* Editores.
- Muhire, B. M., Varsani, A., & Martin, D. P. (2014). SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>
- OIE. (2021). Diseases of crustaceans. <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-manual-online-access/>
- Orta, J. S. (2021). Secuenciación de novo de genomas de plantas [Licenciatura]. UNIVERSIDAD DE JAÉN.

- Pérez Perdomo, O. A. (2018). Estudio de factibilidad de producción y comercialización sustentable del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en sistema intensivo en agua dulce en recirculación en Machala, El Oro. [Magister]. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.
- Poulos, B. T., Tang, K. F. J., Pantoja, C. R., Bonami, J. R., & Lightner, D. V. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology*, 87(4), 987–996. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81127-0>
- Prasad, K. P., Shyam, K. U., Banu, H., Jeena, K., & Krishnan, R. (2017). Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) – An alarming viral pathogen to Penaeid shrimps. In *Aquaculture* (Vol. 477, pp. 99–105). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.021>
- Reyes Laínez, A. M., & Castillo Narea, M. B. (2023). Caracterización metagenómica de cepas probióticas contra *Vibrios Parahaemolyticus* y evaluación de modulación de la microbiota en *Penaeus vannamei*. [Magister en Biotecnología]. UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO.
- Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, 84(19), 9733–9748. <https://doi.org/10.1128/jvi.00694-10>
- Schadt, E. E., Turner, S., & Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*, 19(R2). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq416>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (9 de abril 2019). Acuicultura, producción y conservación de organismos acuáticos. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/acuicultura-produccion-y-conservacion-de-organismos-acuaticos>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (12 de diciembre de 2020). Producción de camarón crece para alimentar a México. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/produccion-de-camaron-crece-para-alimentar-a-mexico?idiom=es>
- Senapin, S., Phewsaiya, K., Briggs, M., & Flegel, T. W. (2007). Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, 266(1–4), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.026>

- Smith-Tsurkan, S. D., Herr, R. A., Khuder, S., Wilke, C. O., & Novella, I. S. (2013). The role of environmental factors on the evolution of phenotypic diversity in vesicular stomatitis virus populations. *Journal of General Virology*, 94(PART4), 860–868. <https://doi.org/10.1099/vir.0.048082-0>
- Srisala, J., Thaiue, D., Saganrut, P., Taengchaiyaphum, S., Flegel, T. W., & Sritunyalucksana, K. (2023). Wenzhou shrimp virus 8 (WzSV8) detection by unique inclusions in shrimp hepatopancreatic E-cells and by RT-PCR. *Aquaculture*, 572. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739483>
- Tang, K., Bondad-Reantaso, M., & Arthur, J. R. (2019). Shrimp Infectious myonecrosis strategy manual. <https://www.researchgate.net/publication/336196546>
- Valles, S. M., & Hashimoto, Y. (2009). Isolation and characterization of *Solenopsis Invictavirus* 3, a new positive-strand RNA virus infecting the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Virology*, 388(2), 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.028>
- Valles, S. M., Oi, D. H., Becnel, J. J., Wetterer, J. K., LaPolla, J. S., & Firth, A. E. (2016). Isolation and characterization of *Nylanderia fulva* virus 1, a positive-sense, single-stranded RNA virus infecting the tawny crazy ant, *Nylanderia fulva*. *Virology*, 496, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.06.014>
- Valverde, X. (2022, December 20). El camarón ecuatoriano tiene cinco retos para fortalecerse como una de las mayores redes de generación de empleo, divisas y emprendimientos. <https://revistaindustrias.com/el-camaron-ecuatoriano-tiene-cinco-retos/>
- Varela-Mejías, A., & Peña-Navarro, N. (2017). Transfronterización de enfermedades infecciosas en la camaronicultura. Una revisión. *Repertorio Científico*, 20, 1–11.
- Vogt, G. (2012). Ageing and longevity in the Decapoda (Crustacea): A review. *Zoologischer Anzeiger*, 251(1), 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2011.05.003>
- Zapata Cruz, M. A., & Pretell Monzonb, K. (2015). Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas en desarrollo sobre geotextil asociados a las raíces de manglares (canal de marea Puerto Rico, Tumbes, Perú) y aislamiento de cepas de diatomeas caracterizadas molecularmente. *Revista Tecnológica - ESPOL*, 28(3).

11. Anexos

Anexo 1. Extracción de ARN con el RNeasy® Mini Kit (50) de QIAGEN (Germany)

(No. catálogo/ID: 74104).

1. Si es tejido no usar más de 20 mg. Rompa el tejido y homogenice el lisado en el volumen adecuado de Buffer RLT (consulte la Tabla 1). Centrifugar el lisado durante 3 min a velocidad máxima. Retire con cuidado el sobrenadante pipeteando y utilícelo en el paso 2.
2. Agregue 1 volumen de etanol al 70% al lisado y mezcle bien pipeteando. No centrifugar. Continúe inmediatamente con el paso 3.
3. Transfiera 700 μ l de la muestra, incluido cualquier precipitado, a una columna de centrifugación RNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Cierre la tapa y centrifugue durante 15 segundos a $\geq 8000 \times g$. Desechar el líquido sobrante.
4. Agregue 700 μ l de Buffer RW1 a la columna de centrifugación RNeasy. Cierre la tapa y centrifugue durante 15 segundos a $\geq 8000 \times g$. Desechar el líquido sobrante.
5. Agregue 500 μ l de Buffer RPE a la columna de centrifugación RNeasy. Cierre la tapa y centrifugue durante 15 segundos a $\geq 8000 \times g$. Desechar el líquido sobrante.
6. Agregue 500 μ l de Buffer RPE a la columna de centrifugación RNeasy. Cierre la tapa y centrifugue durante 2 minutos a $\geq 8000 \times g$.
7. Coloque la columna de centrifugación RNeasy en un nuevo tubo de recolección de 1.5 ml. Agregue 30-50 μ l de RNase-free water directamente a la membrana de la columna de centrifugación. Cierre la tapa y centrifugue durante 1 minuto a $\geq 8000 \times g$ para eluir el ARN.
8. Si el rendimiento de ARN esperado es $>30 \mu$ g, repita el paso 7 utilizando otros 30-50 μ l de RNase-free water o utilice el eluido del paso 7 (si se requiere una alta concentración de ARN). Reutilice el tubo de recolección del paso 7.

Tabla 1. Volúmenes de Buffer RLT para la ruptura y homogenización de la muestra.

| Muestra | Cantidad | Plato | Buffer RLT | Ruptura y homogenización |
|---------------------|----------------------|-----------------|-------------|--|
| Células de animales | $<5 \times 10^6$ | $<6 \text{ cm}$ | 350 μ l | Agregue Buffer RLT, agite en vórtex ($\leq 1 \times 10^5$ células); o use QIAshredder, TissueRuptor®, o aguja y jeringa |
| | $\leq 1 \times 10^7$ | 6 – 10 cm | 600 μ l | |

| | | | | |
|--------------------|--------|---|---------|---|
| Tejido de animales | <20 mg | - | 350 µl* | TissueLyser LT; TissueLyser II; TissueRuptor, o use el mortero y macere seguido de QIAshredder o aguja y jeringa. |
| | ≤30 mg | - | 600 µl | |

*Utilice 600 µl de Buffer RLT para tejidos estabilizados en RNAlater. o para tejidos difíciles de lisar.

Anexo 2. Extracción de ADN con el FFPE DNA Purification Kit de NORGEN BIOTEK CORP

(No. catálogo/ID: 47400).

1. Desparafinización.

- Corte secciones de hasta 20 µm de espesor desde el interior de un bloque de tejido FFPE utilizando un micrótopo. Recorta el exceso de parafina.
- Transfiera las secciones o el bloque de tierra a un tubo de microcentrífuga sin nucleasa. Agregue 1 ml de xileno a la muestra. Mezclar mediante vórtex.
- Incubar a 50 °C durante 5 minutos.
- Centrifugar la muestra a 14.000 x g (~ 14.000 RPM) durante 2 minutos.
- Retire con cuidado el xileno sin desalojar el pellet.
- Agregue 1 ml de etanol al 96 - 100 %. Mezclar mediante vórtex.
- Centrifugar la muestra a 14.000 x g (~ 14.000 RPM) durante 2 minutos.
- Retire con cuidado el etanol sin desalojar el sedimento.
- Repita del Paso **1g** al Paso **1i** por segunda vez.
- Seque el pellet al aire durante unos 10 minutos a temperatura ambiente.

2. Preparación del lisado

- Añadir 300 µL de **Digestion Buffer A** y 10 µL de Proteinasa K reconstituida y 1 µL ARNasa a la muestra. Mezclar mediante vórtex
- Incubar a 55 °C durante 1 hora, seguido de 90 °C durante 1 hora. Vórtex para mezclar de vez en cuando.
- Agregar 300 µL de **Buffer RL**. Vórtex para mezclar.
- Agregar 250 µL de etanol 96 – 100 %. Vórtex para mezclar.

3. Unión de ADN a la columna

- Ensamble una micro columna de purificación de ADNg con uno de los tubos de recolección proporcionados.
- Aplique 600 µL del lisado clarificado con el etanol (**del Paso 2**) en la columna. Centrifugar durante 1 minuto.
- Deseche el flujo. Vuelva a montar la columna de centrifugado con su tubo colector.
- Repita los pasos 3b y 3c hasta que todo el lisado haya pasado por la columna.

4. Lavado de columna

- a) Aplicar 400 μL **Wash Solution A** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
- b) Deseche el flujo y vuelva a montar la columna de centrifugado con su tubo de recogida.
- c) Aplicar 400 μL **Wash Solution A** a la columna y centrifugar durante 1 minuto.
- d) Deseche el flujo y vuelva a ensamblar la columna de centrifugado con su tubo de recolección.
- e) Lave la columna por tercera vez agregando otros 400 μL **Wash Solution A** y centrifugar durante 1 minuto.
- f) Deseche el flujo y vuelva a montar la columna de centrifugado con su tubo de recogida.
- g) Haga girar la columna durante 2 minutos para secar completamente la resina. Descarte el tubo colector.

5. Elución del ADN

- a) Coloque la columna en un tubo de elución nuevo de 1,7 ml.
- b) Agregue 20 - 50 μL de **Elution Buffer B** a la columna. Incubar el conjunto a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- c) Centrifugar durante 1 minuto a **14.000 x g (~14.000 RPM)**.

6. Almacenamiento de ADN

El ADN purificado puede almacenarse a -20°C durante unos días. Se recomienda que las muestras sean colocadas a -70°C para almacenamiento a largo plazo.

Anexo 3. RT-PCR con el Tetro™ cDNA Synthesis Kit de Meridian Bioscience

(No. catálogo/ID: BIO-65042).

1. Antes de usar agite las soluciones en un vórtex y centrifugue brevemente.
2. Prepare la mezcla maestra de cebado en hielo en un tubo de reacción de RNase-free.

| | |
|--|------------------------|
| ARN total (hasta 5 μg) o ARNm (hasta 0,5 μg) | $\eta\mu\text{l}$ |
| Primer. Oligo (dT_{18}) o Random Hexamer (o GSP) | 1 μL |
| 10 mM dNTP mix | 1 μL |
| 5x RT Buffer | 4 μL |
| RiboSafe RNase Inhibitor | 1 μL |
| Tetro Reverse Transcriptase (200 u/ μL) | 1 μL |
| DEPC-treated water | Hasta 20 μL |

3. Mezcle suavemente con una pipeta.

4. Incubar las muestras a 45 °C durante 30 minutos. Si se utilizan hexámeros aleatorios, incubar durante 10 minutos a 25 °C y luego a 45 °C durante 30 minutos.
5. Terminar la reacción incubando a 85 °C durante 5 minutos y enfriar en hielo.
6. Guarde la reacción a -20 °C para almacenamiento a largo plazo o proceda a la PCR inmediatamente.

Anexo 4. Técnica RT-PCR

Componentes para preparar 10 µL por muestra

| Solución | Cantidad |
|---------------------------------------|----------|
| Primer. Random Hexamer | 0.5 µl |
| 10mM dNTP mix | 0.5 µl |
| 5x RT Buffer | 2 µl |
| RiboSafe RNase Inhibitor | 0.5 µl |
| Tetro Reverse Transcriptase | 0.5 µl |
| DEPC-treated water (H ₂ O) | 3 µl |
| ARN purificado | 3 µl |
| Total | 10 µl |

Tabla 1. Perfil de las condiciones para reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en el termociclador (ACT 201 de Apollo Instrumentation).

| Paso | Ciclos | Temperatura (C°) | Tiempo |
|---------------------------|--------|------------------|--------|
| Desnaturalización inicial | 1 | 25 | 10 min |
| Alineamiento | 1 | 45 | 30 min |
| Elongación | 1 | 85 | 5 min |
| Extensión final | 1 | 4 | 5 min |

Anexo 5. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el MyTaq™ DNA Polymerase de Meridian Bioscience.

(No. catálogo/ID: BIO-21105).

1. Antes de usar agite las soluciones en un vórtex brevemente.
2. Preparar la mezcla de la reacción PCR en hielo.

El siguiente protocolo es para una reacción estándar de 50 µL y es posible ajustarlo de acuerdo a la optimización de la reacción.

| | |
|--------------------------|-------------|
| 5x MyTaq Reaction Buffer | 10 µL |
| Template | As required |
| Primers 20µM each | 1 µL |
| MyTaq DNA Polymerase | 1 µL |
| Water (ddH2O) | up to 50 µL |

3. Mezcle suavemente con una pipeta.
4. Someter las muestras a un ciclado térmico. Sugerimos estas condiciones en primera instancia:

| Step | Temperature | Time | Cyles |
|----------------------|-----------------|-------|-------|
| Initial denaturation | 95 °C | 1 min | 1 |
| Denaturation | 95 °C | 15 s | 25-35 |
| Annealing* | User determined | 15 s | |
| Extension* | 72 °C | 10 s | |

Es posible que estos parámetros requieran optimización; consulte la sección Important Considerations and PCR Optimization si es necesario.

5. Guarde el producto final a -20 °C para almacenamiento a largo plazo o proceda con la electroforesis.

Anexo 6. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR

Componentes para preparar 25 µL por muestra

| Solución | Cantidad |
|--------------------------|----------|
| Buffer reaction 5x MyTaq | 5 µl |
| MyTaq DNA Polimerasa | 0.3 µl |
| Cebadores F y R | 1 µl |
| Water (H ₂ O) | 16.7 µl |
| Plantilla (cDNA o ADN) | 2 µl |
| Total | 25 µl |

Tabla 1. Perfil de las condiciones para reacción en cadena de la polimerasa en el termociclador (ACT 201 de Apollo Instrumentation).

| Paso | Ciclos | Temperatura (C°) | Tiempo |
|---------------------------|--------|------------------|--------|
| Desnaturalización inicial | 1 | 95 | 2 min |
| Desnaturalización | 40 | 95 | 10 seg |
| Alineamiento | | 55 | 10 seg |
| Elongación | | 72 | 10 seg |
| Extensión | 1 | 72 | 2 min |
| Extensión final | 1 | 4 | ∞ |