

Research Article

Aplicación de modelos lineales mixtos en infecciones experimentales con WSSV en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

María Alejandra Ramírez-Ruiz¹, Raúl Simá-Álvarez¹
Edgar Torres-Irino² & Rossanna Rodríguez-Canul¹

¹Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN Unidad Mérida), Antigua Carretera a Progreso km 6 A.P. 73 “Cordemex”, C.P. 97310, Mérida, Yucatán, México

²Laboratorio de Pesquerías, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV - IPN Unidad Mérida), Antigua Carretera a Progreso km 6 A.P. 73 “Cordemex”, C.P. 97310, Mérida, Yucatán, México

Corresponding author: Rossanna Rodríguez-Canul (rossana@mda.cinvestav.mx)

RESUMEN. El virus de la mancha blanca (WSSV) es uno de los virus más devastadores en la industria camaronícola. Hasta la fecha no se ha hallado una cura para la enfermedad por lo que es necesario diseñar protocolos experimentales reproducibles y medibles para evaluar fármacos y respuestas fisiológicas de los organismos durante la prognosis de la infección. En este estudio se evaluaron dos vías de infección (inyección e inmersión) con WSSV (200 copias de ADN) a temperatura constante de $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, en juveniles *Litopenaeus vannamei* ($4,8 \pm 0,38$ g) en estado de inter-muda. En la infección por inyección se observó nado errático, letargia y coloración rojiza a partir de las 24 h y la mortalidad fue del 100% a los 2-5 días: en 63% de los organismos se observó infección ligera [20 copias de ADN y 1-5 cuerpos de inclusión intranuclear (CAI)/200 campos], 21% con infección moderada (200 copias de ADN y 1-2 CAI/20 campos) y 16% con infección severa (2000 copias de ADN y más de 10 CAI/campo). No se observó mortalidad en los organismos controles. En la infección por inmersión, los signos de la enfermedad se observaron a partir del día 3, en un período de 3-9 días se observó 38% de mortalidad: 25% con infección ligera (20 copias de ADN y 1-2 CAI/20 campos), 5% con infección moderada (200 copias de ADN y 1-2 CAI/20 campos) y 8% con infección severa (2000 copias de ADN y 1-5 CAI/2 campos). El 62% que sobrevivió, fue PCR positivo, con grado de infección ligera (20 copias de ADN) pero sin inclusiones CAI. No se observó mortalidad en el grupo control. Los datos recabados no cumplían con los supuestos de independencia y linealidad requeridos para la aplicación de análisis de varianza por lo que se usaron los modelos lineales mixtos donde se observó mayor precisión y capacidad de predicción. En los organismos inyectados la mortalidad tuvo su máximo más alto al día 5 después de la inoculación. Mientras que en los infectados por inmersión la mortalidad más alta se presentó al noveno día posterior a la infección. El análisis de varianza de Kenward-Roger indica diferencias significativas en los días transcurridos ($F = 20,1$; $P = 0,001$), al igual que las vías de infección (análisis Random) ($P = 0,007$).

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, modelos lineales mixtos, WSSV, acuicultura.

Implementation of the mixed linear models in experimental infections with WSSV in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT. The White Spot Syndrome Virus has been very detrimental for the shrimp industry. Up to date there is no cure for the disease, thus, it is necessary to implement reliable experimental strategies to evaluate the effect of drugs and the host response during the prognosis of the disease. In this study, we evaluated two ways of infection with WSSV (200 copies WSSV-DNA) (injection and immersion), at constant temperature ($26 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$), in juveniles of *Litopenaeus vannamei* (4.8 ± 0.38 g) in intermolt stage. In the infection by injection, the organisms were lethargic with reddish appearance 2 days after infection and mortality (100%) was observed within 2-5 days: 63% organisms with light degree of infection [20 copies of DNA & 1-5 Cowdry A-type inclusions in hypertrophied nuclei (CAI)/200 fields], 21% had moderate infection (200 copies of DNA & 1-2

CAI/20 fields) and 16% severely infected (2000 copies of DNA & more than 10 CAI/field). No mortality was observed in the controls. In the infection by immersion, the signs of WSSV were observed 3 days after infection: 38% of mortality was observed during 3-9 days: 25% of the organism with light degree of infection (20 copies of DNA & 1-2 CAI/20 fields), 5% moderately infected (200 copies of DNA & 1-2 CAI/20 fields) and 8% with severe infection (2000 copies of DNA & 1-5 CAI/2 fields). The other 62% organisms were necropsied at day 12 and tested positive to the WSSV-PCR (light infection = 20 copies of DNA), but did not show CAI by histology. No mortality was observed in the controls. For the statistical analysis, the data did not fit the criteria of independence and linearity needed for the analyses of variance, thus we used instead the mixed linear models and were able to observe a better prediction: in the injected organisms, the mortality reached the highest peak at day 5 after infection. In the organisms infected by immersion, the highest peak or mortality was observed at day 9 after infection. The analysis of variance of Kenward-Roger indicated significant differences between the days of mortality ($F = 20.1$, $P = 0.001$), as well as among the ways of infection (Random analysis) ($P = 0.007$).

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, mixed linear models, WSSV, aquaculture.

INTRODUCCIÓN

La industria camaronícola ha sido gravemente afectada por el virus de doble cadena denominado de la mancha blanca (White Spot Syndrome Virus-WSSV). La enfermedad es altamente contagiosa y letal. Se transmite de forma vertical y horizontal, siendo esta última por ingestión de tejido infectado, canibalismo, fluido de organismos infectados y por contacto a través de la columna de agua (Rahman *et al.*, 2006). Los signos clínicos de WSSV son letargia, nado errático, coloración rojiza por expansión de los cromatóforos, anorexia, presencia de manchas blancas en el caparazón y muerte en un corto periodo (Itami *et al.*, 1998).

Debido al potencial devastador del virus y a que no se ha podido erradicar, se han implementado diversos modelos experimentales en infecciones controladas para evaluar estrategias de mitigación. En esas condiciones, se ha observado que la amplificación de la carga viral y la aparición de la enfermedad puede ser potenciada por estrés ambiental asociada a cambios bruscos de temperatura y a condiciones fisiológicas de los organismos (Lotz *et al.*, 2005; Sánchez-Martínez *et al.*, 2007). Se ha observado que el virus puede permanecer latente en el medio en un rango 15-22°C (Rahman *et al.*, 2007), mientras que a temperaturas >32°C existe un bajo índice de replicación viral (Rahman *et al.*, 2008). A temperatura constante de 32-33°C, antes y después de la inoculación con WSSV, no se observan signos clínicos (Vidal *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2006). Mientras que el rango 22-30°C, es propicio para la replicación viral (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Rahman *et al.* (2007) evaluaron varias cepas de WSSV a dosis bajas de inóculo y a temperatura constante de 27°C: los signos clínicos de WSSV aparecieron en 24 a 36 h post-infección y a las 60 h se observó 100% de mortalidad corroborando que la temperatura es un factor que propicia la infección a pesar de ser cepas distintas.

También se ha evaluado la vía de inoculación viral a través de la ingesta de tejido infectado, por inyección intramuscular y por inmersión en la columna de agua (Prior *et al.*, 2003; Soto & Lotz, 2003). El ciclo de muda y la presencia de heridas en la cutícula de los camarones puede ser otro factor de riesgo asociado a la infección con WSSV ya que los organismos en etapa de post-muda fueron más susceptibles durante la infección por inmersión (Corteel *et al.*, 2009).

A pesar de los grandes avances sobre la biología de WSSV, aún existe la necesidad de contar con diseños experimentales reproducibles, con datos que sean estadísticamente robustos, donde se pueda analizar las observaciones con respecto al tiempo. En este sentido, el modelo lineal mixto se utiliza en análisis longitudinales, es decir, en estudios diseñados para investigar cambios en el tiempo, en una característica medida repetidamente para cada individuo en el experimento (Laird & Ware, 1982). Este enfoque de modelación es muy efectivo en situaciones donde los datos no presentan una distribución normal, igualdad de varianzas, independencia y linealidad, lo que limita la aplicación de modelos lineales clásicos (Dichmon, 2004; Venables & Dichmont, 2004).

Dos características a resaltar de los modelos mixtos es que están presentes los efectos fijos y los aleatorios, donde los primeros permiten modelar conjuntos de datos donde las observaciones no son independientes (Douglas *et al.*, 2013). Los efectos aleatorios cuantifican la variación entre y dentro de los grupos de unidades. Estas unidades corresponden a bloques en experimentos o estudios de observación replicados a lo largo del tiempo (Bolker *et al.*, 2009). Este análisis aplicado adecuadamente, da mayor validez a las conclusiones debido a que posee mayor precisión en la estimación de los parámetros del modelo de análisis y mejora la potencia de la prueba (Fernández & Vallejo, 1996; Douglas *et al.*, 2013).

Este modelo lineal mixto es actualmente uno de los más utilizados en la investigación médica, social,

psicológica y recientemente agropecuaria (Fernández & Vallejo, 1996; Gómez *et al.*, 2012).

Con base en lo anterior el objetivo de este estudio fue evaluar dos vías de infección experimental (inmersión e inyección) con WSSV, en juveniles de *Litopenaeus vannamei* en etapa de post-muda. El bioensayo se realizó en un sistema con temperatura controlada y el análisis estadístico fue sustentado por un modelo lineal mixto, utilizado para analizar los diseños de medidas repetidas en un intervalo de tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aclimatación de animales experimentales

Se utilizaron camarones juveniles de *Litopenaeus vannamei* provenientes de una granja comercial, con una talla promedio de $4,8 \pm 0,38$ g. Previo al ensayo, se tomaron al azar 10 organismos para detectar WSSV por histopatología y PCR anidada (IQ2000™). Los camarones del mismo lote se aclimataron en el laboratorio durante 8 días en un estanque de fibra de vidrio con capacidad de 200 L con agua de mar, aireación constante y fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad. Se estableció la ración diaria de alimento con Camaronina de Purina® (35%).

Preparación del inóculo viral (WSSV)

El inóculo viral se obtuvo del tejido muscular congelado de camarones infectados con WSSV del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida. Para el inóculo viral se homogenizó el tejido con solución amortiguadora de fosfatos PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mM, K_2HPO_4 2 mM, pH 7,4) previamente esterilizado, en una relación 3:10, se centrifugó a 10.000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se pasó por una membrana de 0,45 μm y se evaluó por PCR anidada (IQ2000™) el grado de infección viral.

Diseño experimental (pruebas de inyección e inmersión)

Después de corroborar que los 10 individuos analizados estuvieron libres de WSSV, se seleccionaron organismos en etapa de post-muda que son más susceptibles a la infección (Corteel *et al.*, 2009). El bioensayo se realizó por inyección e inmersión en estanques de plástico de 40 L de agua de mar y con 8 camarones por estanque que se distribuyeron en tres réplicas para cada tratamiento y para sus controles respectivamente. Los camarones recibieron alimento comercial (Camaronina de Purina) en raciones diarias del 3% de la biomasa total. Diariamente se midieron los parámetros de

temperatura, oxígeno disuelto, salinidad (YSI-85, Modelo 85-10 FT), pH y cada tres días el amonio y nitritos.

En el reto por inyección, los organismos se infectaron con 30 μL del inóculo viral (WSSV) por punción en la unión del quinto par de pereiópodos utilizando jeringas para insulina estériles (1 mL^{-1} , 27G x 13 mm). Mientras que en el reto por inmersión los organismos se sumergieron por 6 h en recipientes que contenían agua de mar con 2% del inóculo viral (Corteel *et al.*, 2009).

Posteriormente, estos se transfirieron a estanques de 40 L con agua de mar y aireación constante durante el experimento. A los organismos utilizados como control para ambas pruebas, se les realizó el mismo procedimiento sustituyendo el inóculo viral por PBS.

Diagnóstico de la enfermedad (PCR anidada e histopatología)

La PCR anidada se realizó en hepatopáncreas, branquia y músculo, fijados con etanol al 70%. La prueba se realizó con el kit comercial IQ 2000™ para WSSV (PCR TECH), que detecta fragmentos de ADN del genoma de WSSV y se basa en una prueba directa de PCR semi-cuantitativa. Se puede distinguir cuatro diversos niveles de infección: no infectado, infección ligera (20 copias de ADN), moderada (200 copias de ADN) y severa (2000 copias de ADN), que contiene un control interno que identifica actina de camarón y un estándar positivo que es cuantificable de acuerdo a la severidad de la infección. Desde 1998, este sistema es utilizado en numerosas granjas alrededor del mundo como el método más preciso y eficaz para la detección de diversos tipos de WSSV distribuidos en diferentes regiones del mundo.

De igual forma se fijaron muestras de branquias, hepatopáncreas, estómago, intestino y músculo en solución Davidson's (48 h) y después en alcohol al 70%, que fueron procesados y teñidos con hematoxilina-eosina, siguiendo el procedimiento descrito por Bell & Lightner (1988). Las muestras se examinaron al microscopio Olympus BX50/Nomarski, adaptado con una cámara Evolution MP Cooled, Media Cybernetics. Se utilizó la nomenclatura de Lightner (1996), para clasificar los grados de infección según el número de cuerpos de inclusión basofílicos e intracelulares denominados Cowdry tipo A (CAI): Grado 0 = organismos sin infección. Grado 1 = de 1-5 CAI/200 campos, infección ligera. Grado 2 = 1-2 CAI/20 campos, infección ligera a medianamente severa. Grado 3 = 1-5 CAI/2 campos, infección aguda. Grado 4: >10 CAI/campo, severo usualmente letal.

Análisis estadístico

Inicialmente se aplicaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (test de Levene) para conocer la naturaleza de los datos. Posteriormente, para evaluar si existieron diferencias entre los organismos debido a los dos tipos de infección (inyección vs infección), se usó un modelo lineal mixto, para mediciones repetidas en el tiempo, con efectos fijos y aleatorios combinados.

En este caso se utilizó el número de inclusiones virales (CAI) como variable de respuesta, en el efecto fijo se consideraron los días transcurridos y el efecto aleatorio en las vías de infección aplicadas (inyección vs infección):

$$Y_i = \gamma_{00} + \gamma_{01}T_i + (u_{0i} + e_i)$$

donde Y_i es el número de inclusiones virales (CAI) en los camarones del tratamiento i (inyección vs infección); γ_{00} es el intercepto general; γ_{01} es el coeficiente del efecto fijo; T_i los días transcurridos (efecto fijo). Los efectos aleatorios correspondieron a cada vía de infección u_{0i} y el componente residual asociado e_i .

Las diferencias entre vías de infección fueron validadas mediante un análisis de varianza al modelo mixto, donde el valor de P se basa en el método de Kenward-Roger (Kenward & Roger, 1997) y el análisis de los efectos aleatorios. Este análisis fue implementado utilizando el paquete estadístico lme4 (Bates *et al.*, 2013) del programa computacional libre R (R Core Team, 2013).

RESULTADOS

Durante la medición de los parámetros en los estanques del bioensayo, la temperatura del agua se mantuvo a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$, la salinidad a 36 y el oxígeno disuelto a $5 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$, el pH varió de 7,7-8,0. Los nutrientes se encontraron bajo los niveles permitidos, los nitritos $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ y el amonio $\leq 1,5 \text{ mg L}^{-1}$.

El inóculo viral utilizado para el reto, dio positivo para WSSV con infección moderada (200 copias de ADN). En la infección por inyección, los individuos mostraron signos de WSSV como nado errático, letargia y coloración rojiza a las 24 h post-infección. La mortalidad acumulada fue de 100% en los días 2-5 post-infección. No se observó mortalidad en los organismos de los controles inyectados con PBS (Fig. 1).

En el diagnóstico de la enfermedad, todos los individuos inyectados resultaron positivos para WSSV: se detectaron 63% con infección ligera (20 copias ADN), 21% con infección moderada (200 copias de ADN) y 16% con infección severa (2000 copias de ADN).

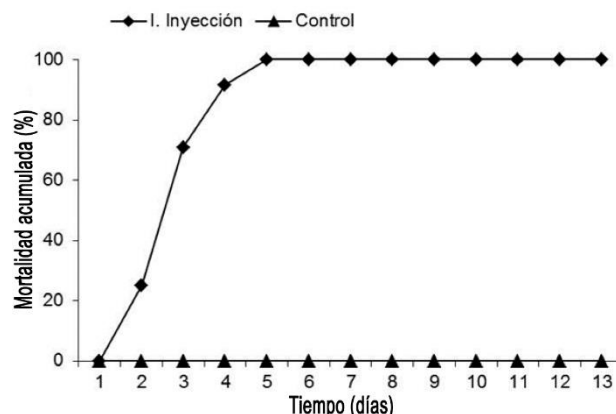


Figura 1. Porcentaje de mortalidad acumulada en camarones *Litopenaeus vannamei* infectados con WSSV vía inyección (■). Los controles no presentaron mortalidad (▲).

En la infección por inmersión, los signos de la enfermedad y la mortalidad se observaron al tercer día post-infección. A diferencia de los individuos inyectados, ésta fue lenta y paulatina y continuó así hasta el noveno día. El porcentaje de mortalidad acumulado obtenido fue de 38% (Fig. 2).

La PCR anidada dio positiva a WSSV para todos los organismos muertos en estas condiciones. La variabilidad en los grados de infección fue de 25% con infección ligera (20 copias de ADN), 5% con infección media (200 copias de ADN) y 8% con infección severa (2000 copias de ADN). Los sobrevivientes a esta vía de infección (62%) fueron PCR positivo, con grado de infección ligera (20 copias de ADN) pero sin inclusiones CAI por histología (Fig. 3). No hubo mortalidad en los controles.

Tanto en los tratamientos por inyección como por inmersión, la PCR anidada detectó más organismos con infección ligera. Siendo esta técnica más sensible al analizar las muestras de hepatopáncreas y branquias.

En cuanto al análisis histopatológico, para la prueba de inyección, se observó la presencia de cuerpos de inclusión intranuclear Cowdry tipo A característicos de WSSV en branquia, con grado de infección ligera (1-5 CAI/200 campos) (Fig. 4).

En el tratamiento por inmersión, mediante el análisis histológico se observó un mayor número de CAI con grado 2 de severidad (1-2 CAI/20 campos en branquias y estómago) (Fig. 5). El órgano blanco en esta prueba fueron las branquias y estómago. En los organismos sobrevivientes no se encontraron CAI en los tejidos analizados. En los controles de ambos tratamientos (inyección e inmersión) no hubo mortalidad y se confirmó que fueron negativos a WSSV respectivamente.

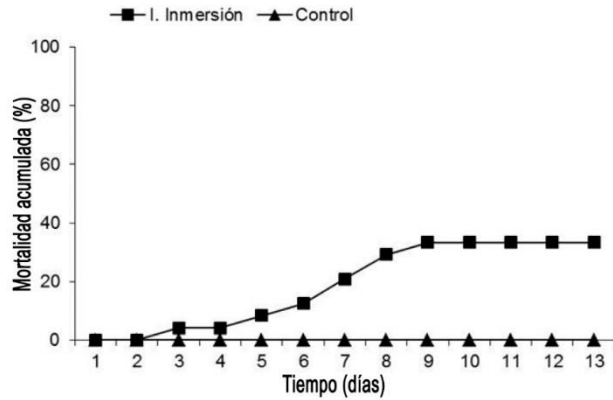


Figura 2. Porcentaje de mortalidad acumulada en organismos de *Litopenaeus vannamei* infectados con WSSV vía inmersión (■). Los controles no presentaron mortalidad (▲).

Al comparar a los ejemplares muertos para cada método de infección, se observaron diferencias significativas. En los organismos inyectados la mortalidad tuvo su máximo al quinto día después de la inoculación y se observó un comportamiento similar entre replicas. Mientras que en los infectados por inmersión la mortalidad más alta se presentó al noveno día posterior a la infección, observándose diferencias entre replicas (Fig. 6).

El análisis de varianza de Kenward-Roger indicó diferencias significativas en los días transcurridos ($F = 20,1, P = 0,001$), al igual que las vías de infección (análisis de Random) ($P = 0,007$).

DISCUSIÓN

En las infecciones experimentales de camarones peneidos uno de los factores importantes a considerar es la vía de aplicación del inóculo viral, ya que el exceso en su manipulación podría generar estrés en los organismos tratados, lo cual a su vez puede propiciar errores al analizar los datos. La factibilidad del método también es importante a la hora de realizar los bioensayos ya que la infección individual por inyección podría resultar inoperable cuando se maneja un gran número de ejemplares. Sin embargo, la mayoría de los investigadores recomiendan las infecciones intramusculares, ya que con este procedimiento se asegura tener un mayor control en la dosis y el tiempo de exposición del virus al organismo, a diferencia de la administración oral donde es difícil calcular el consumo de tejido de camarones infectados (Huang *et al.*, 2011).

La desventaja que se observa con la infección intramuscular, es que se rompe la primera barrera natural de defensa (cutícula) de los organismos, de tal

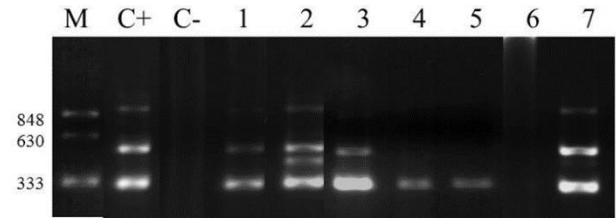


Figura 3. Niveles de infección de WSSV obtenidos en la PCR anidada realizada con el kit comercial IQ 2000™ para WSSV (M: marcador, C+: control positivo, C-: control negativo, Líneas (L) 1 y 3: infección moderada (200 copias ADN), L2 y L7: infección severa (2000 copias ADN), L4 y 5: infección ligera (20 copias ADN), L6: muestra negativa).

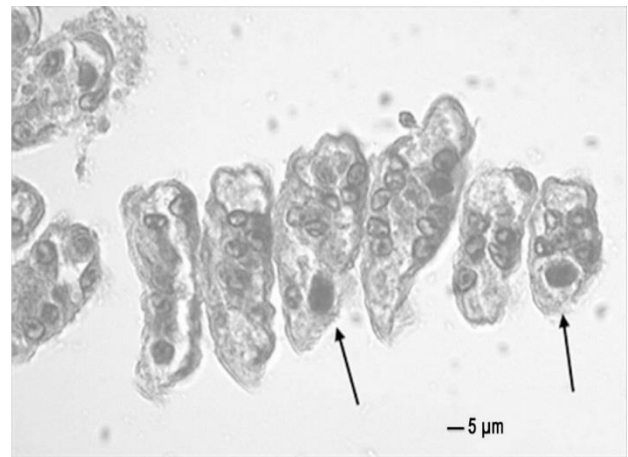


Figura 4. Corte histológico de branquia de *Litopenaeus vannamei* infectado con WSSV. Presencia de cuerpos de inclusión Cowdry tipo A, con infección grado 1 (40x).

forma que el sistema inmune se ve comprometido por el estrés generado por la punción y manipulación de los ejemplares, provocando alteraciones fisiológicas que pudieran influir en los resultados de los bioensayos cuando se pretende medir su estado de salud (Corteel *et al.*, 2009, 2012). Además, el virus inoculado ingresa directamente a la hemolinfa del hospedero llegando a su tejido en un tiempo muy corto, generando la infección en cuestión de horas (Rahman *et al.*, 2006). Por otro lado, la infección por inmersión, es una técnica muy flexible que igual se puede aplicar tanto para larvas como para camarones adultos y puede realizarse en grupos numerosos, además de reducir la manipulación y por consiguiente el estrés por manejo de los ejemplares (Corteel *et al.*, 2009), y también a reducir errores en las mediciones de los datos, aquí el proceso de infección resulta más lento y similar a un brote de infección natural en un estanque de cultivo (Chien, 1992; Wongmaneeprateep *et al.*, 2010).

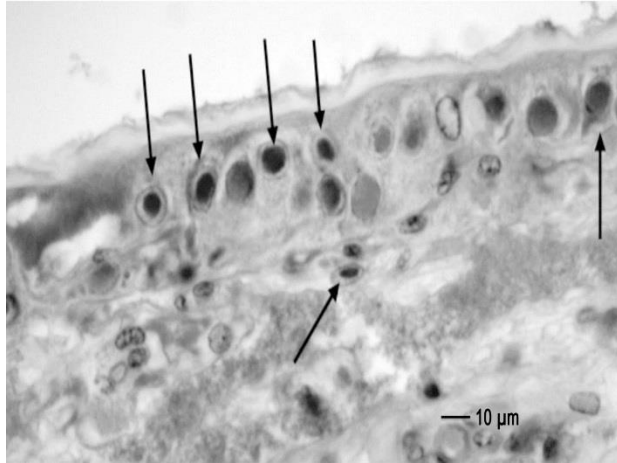


Figura 5. Corte histológico de epitelio estomacal de *Litopenaeus vannamei* infectado con WSSV con infección grado 2 (40x). Los CAI se señalan con flechas.

Durante este estudio, la medición de los niveles de nutrientes y parámetros ambientales se mantuvo dentro de los intervalos recomendados para el cultivo de larvas de camarón (Boyd, 1989; Chien, 1992; Gitterle *et al.*, 2006). Se tomó especial cuidado en controlar la temperatura de los estanques y que los ejemplares estuviesen en etapa de post-muda, como factores de riesgo que promuevan la replicación del virus WSSV (Corteel *et al.*, 2009, 2012).

La mortalidad en la inmersión (38%) fue menor a la inyección (100%), durante los 13 días que duró el bioensayo. El 62% de los ejemplares sobrevivientes fueron positivos a la PCR con grado de infección ligero (20 copias de ADN) pero sin la presencia de CAI por histopatología. Con esta alternativa de infección se abren más posibilidades de evaluar el sistema inmune de los organismos infectados experimentalmente con WSSV.

Uno de los objetivos de este trabajo fue utilizar el modelo lineal mixto para el análisis de los datos para promover su aplicación en acuicultura. Puesto que, en numerosas investigaciones sobre inoculaciones inducidas, los diseños experimentales con medidas repetidas en el tiempo en un mismo sistema pueden originar que estén correlacionadas entre sí y no cumplan con el supuesto de independencia, igualdad de varianza, normalidad y linealidad (Fernández & Vallejo, 1996). En este contexto es difícil utilizar modelos lineales clásicos para el análisis de varianza. Pero esta situación deja de ser un problema cuando se aplica adecuadamente un análisis que acentúe la validez de las conclusiones estadísticas (Gómez *et al.*, 2012).

Un ejemplo es el trabajo de Zhang *et al.* (2006) quienes infectaron experimentalmente rotíferos *Brachionus urceus* (Linnaeus, 1758) con WSSV para

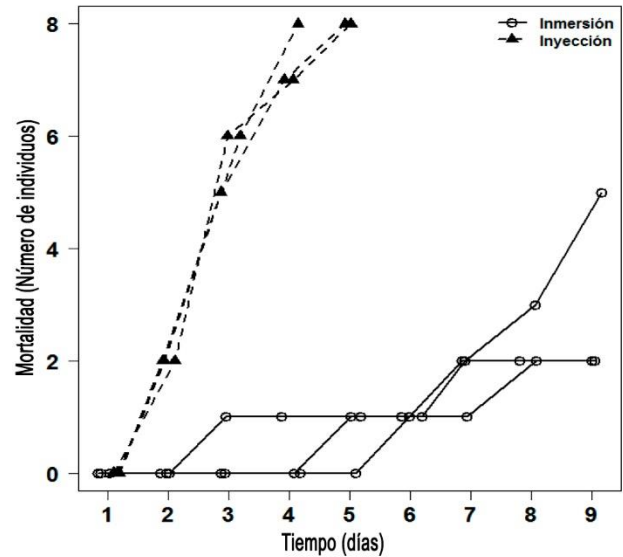


Figura 6. Número de organismos muertos en función de los días transcurridos durante la infección (inyección vs inmersión). Tanto los días como las vías de infección fueron significativos. Cada curva corresponde a una réplica de cada tratamiento. Organismos inyectados con el virus (---) y aquellos en el que el virus fue puesto en el agua (—).

posteriormente alimentar larvas de camarones *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765), que resultaron ser positivas para WSSV, a diferencia del control que fue negativo. La mortalidad acumulada en los estanques con infección ($39,5 \pm 15,4\%$), fue mayor que en los estanques control ($34,7 \pm 15,1\%$). Aunque Zhang *et al.* (2006) reportaron que la mortalidad de los camarones infectados fue mayor que en el grupo control, esto no se vio reflejado en el análisis estadístico utilizando ANOVA (análisis de varianza), ya que no se observaron diferencias significativas en la mortalidad entre tratamientos ($P > 0,05$). Esto suele ocurrir en este tipo de bioensayos, donde los datos no presentan una distribución normal. Así, el uso de modelos estadísticos que se adecúen a la distribución de los datos podría evitar confusiones en su interpretación. Sin embargo, los autores concluyeron que los rotíferos podrían servir como vector en la transmisión de WSSV. Por otro lado, Corteel *et al.* (2009), analizaron el impacto del proceso de muda y las lesiones en la cutícula de los camarones sobre la susceptibilidad a WSSV, mediante las vías de infección intramuscular o por inmersión. Para su análisis estadístico utilizaron pruebas no paramétricas, donde compararon la susceptibilidad a la infección entre etapas de muda a través de la prueba de Wilcoxon y las diferencias entre las fases de muda dentro de los grupos, mediante la prueba de Fisher, demostrando que los camarones analizados fueron más susceptibles a la infección vía inmersión con WSSV después de la

muda y que las heridas en la cutícula también pueden facilitar la infección.

El inconveniente de utilizar pruebas no paramétricas, es que éstas no son tan eficientes o claras como las paramétricas, ya que se puede enmascarar la información y llevar a una mayor probabilidad de no rechazar una hipótesis nula falsa (incurriendo en un error de tipo II). Entonces es necesario emplear modelos que se adapten a la propia distribución de los errores, siendo el Modelo Lineal Mixto, el más recurrido en estudios longitudinales (Bolker *et al.*, 2009).

En este trabajo, los resultados de las pruebas estadísticas iniciales determinaron que los datos no presentaban una distribución normal y las varianzas no fueron homogéneas, tampoco cumplían con los supuestos de independencia y linealidad, lo que limitó la aplicación de un modelo clásico. Asimismo, se consideró que las transformaciones para normalizar los datos (log, raíz cuadrada, etc.), podrían eliminar el sesgo de la distribución y distorsionar el modelo. Por lo que se consideró conveniente usar un modelo lineal mixto, que se aplica para analizar los diseños de medidas repetidas en la misma unidad experimental en diferentes puntos en el tiempo y donde fue razonable asumir que existieran correlaciones entre observaciones del mismo ensayo. La modelación en el marco de los modelos lineales mixtos maneja estas correlaciones mediante la incorporación de variables aleatorias o mediante la modelación directa de la matriz de covarianza residual (McLean *et al.*, 1991). Diversas estrategias, bajo el mismo marco teórico permiten modelar la variabilidad sobre y más allá del componente usual asociado a los términos del error (Zimmerman & Harville, 1991). En este caso permitió incrementar la precisión de las estimaciones de la infección con WSSV a partir de dos métodos de infección.

Los resultados de este estudio son alentadores ya que estadísticamente se pudo tener un mejor panorama sobre la evaluación de las dos vías de infección (inyección e inmersión). El modelo lineal mixto permitió determinar claramente las diferencias entre mortalidad y tiempo (días transcurridos) para ambos métodos de infección. Se puede decir entonces que hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las vías de infección. Por consiguiente, la inquietud acerca del cumplimiento de los supuestos tradicionales de normalidad y varianzas iguales deja de ser una incertidumbre al momento de evaluar diseños de “medidas repetidas” como lo mencionan (Fernández & Vallejo, 1996; Gómez, *et al.*, 2012).

Finalmente, en este estudio se considera que la vía de infección por inmersión puede ser más conveniente y certera a la hora de evaluar infecciones experimentales, el efecto de inmunoestimulantes, probióticos y/o retrovirales contra enfermedades infecciosas tales como WSSV, mediante índices inmunológicos y fisiológicos.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece la beca de doctorado otorgada por CONACyT-México (CVU: 2172079). Este trabajo fue financiado por el proyecto Fomix-Yucatán-Conacyt (108373) y recursos propios del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular. Los autores agradecen los valiosos comentarios de los revisores que mejoraron el manuscrito.

REFERENCIAS

- Bates, D., M. Maechler & N. Bolker. 2013. lme4: linear-mixed effects models using s4 classes. Retrieved from: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4> (R package version 0.999999-2). Revisado: 13 marzo 2014.
- Bell, T.A. & D.V. Lightner. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 114 pp.
- Bolker, B.M., M.E. Brooks, C.J. Clark, S.W. Geange, J.R. Poulsen, M.H.H. Stevens & J.S.S. White. 2009. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.*, 24: 127-135.
- Boyd, C.E. 1989. Water quality management and aeration in shrimp farming. Fisheries and allied aqua-cultures departmental series, Vol. 2. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Auburn, 83 pp.
- Chien, Y. 1992. Water quality requirements and management for marine shrimp culture. Proceedings of the special session on shrimp farming. Baton Rouge, LA, pp. 144-156.
- Corteel, M., J. Dantas-Lima, M. Wille, V. Iday-Sanz, M.B. Pensaert, P. Sorgeloos & H.J. Nauwynck. 2009. Molt stage and cuticle damage influence white spot syndrome virus immersion infection in penaeid shrimp. *Vet. Microbiol.*, 137: 209-216.
- Corteel, M., J. Dantas-Lima, J. Tuan, V.V. Thuong, K.V. Wille, M. Alday-Sanz, V. Maurice, M.B. Pensaert, P. Sorgeloos & H.J. Nauwynck. 2012. Susceptibility of juvenile *Macrobrachium rosenbergii* to different doses of high and low virulence strains of white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, 100: 211-218.

- Dichmont, C.M. 2004. GLMs, GAMs and GLMMs: an overview of theory for applications in fisheries research. *Fish. Res.*, 70: 319-337.
- Douglas, B., M. Maechler, B. Bolker & S. Walker. 2013. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.0-5. <http://lme4.r-forge-project.org>. Revisado: 3 marzo 2014.
- Fernández, P. & G. Vallejo. 1996. Diseño de medidas repetidas con dependencia serial en el error bajo la violación de la asunción de homogeneidad. *An. Psicol.*, 12(1): 87-106.
- Gitterle, T., B. Gjerde, J. Cock, M. Salazar, M. Rye, O. Vidal, C. Lozano, C. Erazo & R. Salte. 2006. Optimization of experimental infection protocols for the estimation of genetic parameters of resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 261(2-24): 501-509.
- Gómez, S., V. Torres, Y. García & J.A. Navarro. 2012. Procedimientos estadísticos más utilizados en el análisis de medidas repetidas en el tiempo en el sector agropecuario. *Rev. Cub. Cienc. Agríc.*, 46(1): 1-7.
- Huang, Y.C., Z.X. Yin, H.S. Ai, X.D. Huang, S.D. Li, S.P. Weng & J.G. He. 2011. Characterization of WSSV resistance in selected families of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 311: 54-60.
- Itami, T., M. Asano, K. Tokushige, K. Kubono, A. Nakagawa, N. Takeno, H. Nishimura, M. Maeda, M. Kondo & Y. Takahashi. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164: 277-288.
- Jiravanichpaisal, P., K. Söderhäll & I. Söderhäll. 2006. Characterization of white spot syndrome virus replication in in vitro-cultured haematopoietic stem cells of freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *J. Gen. Virol.*, 87: 847-854.
- Kenward, M.G. & J.H. Roger. 1997. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics*, 53(3): 983-997.
- Laird, N.M. & J.H. Ware. 1982. Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics*, pp. 963-974.
- Lightner, D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 305 pp.
- Lotz, J.M., L.S. Anton & M.A. Soto. 2005. Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, 65: 75-78.
- McLean, R.A., W.L. Sanders & W.W. Stroup. 1991. A unified approach to mixed linear models. *Am. Stat.*, 45: 54-64.
- Prior, S., C.L. Browdy, E.F. Shepard, R. Laramore & P.G. Parnell. 2003. Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org.*, 54: 89-96.
- Rahman, M.M., C.M. Escobedo-Bonilla, M. Corteel, J.J. Dantas-Lima, M. Wille, V. Alday-Sanz, M.B. Pensaert, P. Sorgeloos & H.J. Nauwynck. 2006. Effect of high water temperature (33°C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 261: 842-849.
- Rahman, M.M., M. Corteel, J.J. Dantas-Lima, M. Wille, V. Alday-Sanz, M.B. Pensaert, P. Sorgeloos & H.J. Nauwynck. 2007. Impact of daily fluctuations of optimum (27°C) and high water temperature (33°C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 269: 107-113.
- Rahman, M.M., M. Corteel, C.M. Escobedo-Bonilla, M. Wille, V. Alday-Sanz, M.B. Pensaert, P.L. Sorgeloos & H.J. Nauwynck. 2008. Virulence of white spot syndrome virus (WSSV) isolates may be correlated with the degree of replication in gills of *Penaeus vannamei* juveniles. *Dis. Aquat. Org.*, 79: 191-198.
- R. Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing [Computer software manual]. Vienna, Austria. Retrieved from: <http://www.R-project.org/> Revisado: 10 marzo 2014.
- Sánchez-Martínez, J.G., G. Aguirre-Guzmán & H. Mejía-Ruiz. 2007. White spot syndrome virus in cultured shrimp: a review. *Aquat. Res.*, 38: 1339-1354.
- Soto, M.A. & J.M. Lotz. 2003. Transmission, virulence, and recovery coefficients of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) infections in Kona stock *Litopenaeus vannamei*. *J. Aquat. Anim. Health.*, 15: 48-54.
- Venables, W.N. & C.M. Dichmont. 2004. GLMs, GAMs and GLMMs: an overview of theory for applications in fisheries research. *Fish. Res.*, 70: 319-337.
- Vidal, O.M., C.B. Granja, L.F. Aranguren, J.A. Brock & M. Salazar. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquacult. Soc.*, 32: 364-372.
- Wongmaneeprateep, S., N. Chuchird, P. Baoprasertkul, P. Prompamorn, K. Thongkao & C. Limsuwan. 2010. Effects of high water temperature on the elimination of white spot syndrome virus in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *KU. Fish. Res. Bull.*, 34: 14-26.

Zhang, J.S., S.L. Dong, X.L. Tian, Y.W. Dong, X.Y. Liu & D.C. Yan. 2006. Studies on the rotifer *Brachionus urceus* (Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture*, 261: 1181-1185.

Zimmerman, D.L. & D.A. Harville. 1991. A random field approach to the analysis of field plot experiments and other spatial experiments. *Biometrics*, 47: 223-239.

Received: 31 March 2014; Accepted 8 April 2015