

## Factores de riesgo asociados a la transmisión del virus PaV1 en langostas *Panulirus argus* en dos principales zonas de pesca del estado de Yucatán, México

## Risk factors associated with the transmission of the PaV1 virus in spiny lobsters, *Panulirus argus*, from two main fishing areas in the state of Yucatan, Mexico

Ruth A. A. Pérez-Campos<sup>1</sup>, Cristina Pascual-Jiménez<sup>2</sup>, Nancy Herrera-Salvatierra<sup>1</sup>, Juan A. Pérez-Vega<sup>1</sup>, Roberto Zamora-Bustillos<sup>3</sup> y Rossanna Rodríguez-Canul<sup>1\*</sup>

**Recibido:** 17 de mayo de 2017.

**Aceptado:** 11 de septiembre de 2018.

**Publicado:** 05 de diciembre de 2018.

### RESUMEN

**Antecedentes:** El virus PaV1 causa infección crónico-degenerativa y mortal en langostas espinosas *Panulirus argus*. PaV1 está presente en langostas del Caribe mexicano, pero se desconoce su prevalencia en el estado de Yucatán, importante exportador de colas de langosta. **Objetivos:** Conocer la prevalencia y factores de riesgo del virus PaV1 en langostas subadultas y adultas, destinadas a la comercialización, de acuerdo con su zona de captura. **Métodos:** En un muestreo realizado en dos cooperativas se analizaron 496 muestras de tejido intestinal (cerca de la región anal) de langostas provenientes de río Lagartos y del arrecife Alacranes. Se analizaron con una PCR simple que amplifica un fragmento de 499 pb del ADN genómico de PaV1. Se utilizó la prueba  $\chi^2$  y regresión logística para determinar diferencias entre zonas de muestreo, talla (subadultas y adultas), sexo y estado de muda. **Resultados:** La prevalencia fue de 2.62% (13/496). La secuencia de ADN de PaV1 tuvo 100 % de homología y cobertura con la original en GenBank. La prevalencia fue de 4.73% en río Lagartos y de 1.53% en Arrecife Alacranes ( $\chi^2=4.28$ ,  $p=0.0038$ ). Las langostas subadultas tuvieron mayor prevalencia (3.96 %) que las adultas (1.7%) ( $\chi^2=9.62$ ,  $p=0.0081$ ). El análisis de regresión logística estimó que las variables regresoras (talla de las langostas y zona de muestreo) mostraron relación significativa con la infección por PaV1. **Conclusiones:** Este es el primer reporte de detección de ADN de PaV1 en colas de *P. argus* del estado de Yucatán destinadas a la comercialización y exportación.

**Palabras clave:** pesquería artesanal, *Panulirus argus*, PaV1, península de Yucatán

### ABSTRACT

**Background:** The virus *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) causes a systemic infection and death to spiny lobsters *Panulirus argus* (Latreille, 1804). PaV1 is prevalent in the Mexican Caribbean Sea, but there is no information about its prevalence in the state of Yucatan. **Goals:** To determine the prevalence of PaV1 in lobster tails from two main fishing zones from the state of Yucatan. **Methods:** Four hundred and ninety-six intestinal tissue samples were collected from lobster tails collected in río Lagartos and from Alacranes Reef. Around 50 mg of intestinal tissue were stored and analyzed individually by PCR, which amplifies a fragment of 499 bp of genomic DNA of PaV1. The  $\chi^2$  test and a logistic regression analysis were used to determine the differences between sampling zones, size (sub-adult and adult), sex, and molt status. **Results:** A prevalence of 2.62% (13/496) was obtained. The PaV1 DNA sequence had 100% of homology and identity to the original DNA sequence reported in the GenBank. In río Lagartos the prevalence was of 4.73% and of 1.53% in Alacranes Reef ( $\chi^2=4.28$ ,  $p=0.0038$ ). Significant differences were found between lobster sizes; PaV1 was more prevalent in sub-adults (3.96%) than adults (1.7%) ( $\chi^2=9.62$ ,  $p=0.0081$ ). The logistic regression analysis revealed that lobster's size and catching zone had a high significance with PaV1. **Conclusions:** This is the first molecular detection of PaV1 in tails of lobsters *P. argus* from the Yucatan state destined for marketing and exportation.

**Keywords:** artisanal fisheries, *Panulirus argus*, PaV1, Yucatan peninsula

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Mérida. Antigua Carretera a Progreso Km 6, Mérida, Yucatán, 97310. México

<sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Unidad Académica Sisal. Puerto de Abrigo Sisal S/N. Sisal, Yucatán, 97355. México

<sup>3</sup>Instituto Tecnológico de Conkal. Antigua carretera a Mérida-Motul, Km 16.3, Conkal, Yucatán, 97345. México

\*Author for correspondence:  
rossana.rodriguez@cinvestav.mx

#### To cite as:

Pérez-Campos R. A. A., C. Pascual-Jiménez, N. Herrera-Salvatierra, J. A. Pérez-Vega, R. Zamora-Bustillos y R. Rodríguez-Canul. 2018. Factores de riesgo asociados a la transmisión del virus PaV1 en langostas *Panulirus argus* en dos principales zonas de pesca del estado de Yucatán, México. *Hidrobiológica* 28 (3): 247-255.

DOI:10.24275/uam/izt/dcbshidro/2018v28n3/Rodríguez

## INTRODUCCIÓN

La langosta espinosa del Caribe *Panulirus argus* (Latreille, 1804) constituye uno de los recursos de mayor importancia económica para las pesquerías de la región del Gran Caribe (Ehrhardt *et al.*, 2010). Su comercialización sitúa a México en el séptimo lugar a nivel mundial (Puga, 2002), donde los estados de Yucatán y Quintana Roo son los que participan con el 35% de su captura nacional (Salas *et al.*, 2005).

En 1994 se descubrió en los Cayos de la Florida, EUA, el primer virus que infecta a la langosta espinosa *P. argus*, denominado *Panulirus argus virus 1* (PaV1, por sus siglas) (Shields & Behringer, 2004). Este es un virus de doble cadena de ADN que se encuentra aún sin clasificación, pero comparte características de las familias Herpesviridae e Iridoviridae. PaV1 es altamente patogénico y mortal; infecta principalmente a juveniles bentónicos [20-55 mm de longitud de la cola (LC)], en los cuales se observa prevalencia de hasta 60%, la cual decrece hasta 11 % en langostas adultas (Shields & Behringer, 2004). En México, el virus PaV1 se reportó por primera vez en langostas juveniles de Puerto Morelos, Quintana Roo (Huchin-Mian *et al.*, 2008). Este virus produce una infección crónico-degenerativa que se caracteriza por la destrucción masiva de los hemocitos hialinocitos y semigranulocitos, la falta de coagulación en la hemolinfa, el daño estructural irreversible en el tejido hepatopancreático y una marcada coloración lechosa de la hemolinfa (Shields & Behringer, 2004; Li *et al.*, 2008; Huchin-Mian *et al.*, 2013). En el hepatopáncreas se observan nucleocapsides icosaédricas ( $\sim 182 \pm 9$  nm) distribuidas en el citoplasma y la periferia nuclear de las células. Asimismo, en las células epiteliales se detectan inclusiones virales eosinofílicas (Cowdry tipo A), caracterizadas con cromatina y proteínas condensadas en el citoplasma, además de hipertrofia nuclear observada por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Shields & Behringer, 2004). Las langostas con infecciones severas presentan una notable falta de reservas de glucógeno, letargia e isquemia tisular del hepatopáncreas, que conlleva a su muerte por agotamiento metabólico (Li *et al.*, 2008).

Una de las características de la infección viral (PaV1) es que su prevalencia es mayor en tallas pequeñas de langostas y va disminuyendo en tallas más grandes (subadultas y adultas) (Lozano-Álvarez *et al.*, 2008; Behringer *et al.*, 2011; Cruz-Quintana *et al.*, 2011; Moss *et al.*, 2013). De igual forma, disminuyen también los signos clínicos; por lo que, si se utilizan solamente los signos clínicos para identificar la prevalencia del virus en adultas y subadultas, este valor estaría subestimado.

La presencia de PaV1 se ha reportado en México (Huchin-Mian *et al.*, 2008; Lozano-Álvarez *et al.*, 2008), en las Islas Vírgenes, Estados Unidos (Butler *et al.*, 2008), en Belice (Huchin-Mian *et al.*, 2009) y en Cuba (Cruz Quintana *et al.*, 2011), a través de análisis histológicos del hepatopáncreas y por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés, *polymerase chain reaction*) en organismos juveniles con prevalencias del 5 al 60% (Behringer *et al.*, 2011). Mientras que en langostas adultas se ha reportado hasta 11% de prevalencia (Behringer *et al.*, 2012), 9.2% en Belice (Huchin-Mian *et al.*, 2013) y 0.95 % en Cuba (Cruz-Quintana *et al.*, 2011). El virus PaV1 está muy extendido en las langostas adultas en la parte central y norte del mar Caribe; en cambio, tiene una baja prevalencia en el Caribe suroccidental y está ausente en la parte sureste del Caribe (Moss *et al.*, 2013).

México y otros países del Gran Caribe exportan colas de langosta congelada a distintas regiones del mundo, por lo que conocer la prevalencia de PaV1 en organismos frescos o congelados destinados a la venta comercial es muy importante para determinar el riesgo potencial que implica su posible distribución local e internacional y evitar posibles epizootias, como ha ocurrido con el virus de la mancha blanca en camarones peneidos (Hasson *et al.*, 1999).

Aunque el estado de Yucatán no forma parte de la región del Caribe, la captura de langosta representa también una importante pesquería. Actualmente, la legislación emitida para el manejo de esta actividad es la siguiente: una talla mínima de captura (135 mm de longitud abdominal), la prohibición de captura de hembras ovígeras o "parchadas" y el establecimiento de una veda que incluye los meses de mayor actividad reproductiva en la población (marzo-junio) (Ríos-Lara *et al.*, 2013).

Aunado a esto, el esfuerzo de pesca es regulado a través de la combinación de áreas concesionadas o permisos de pesca y número de permisos de embarcaciones que otorgan a las organizaciones sociales. Las embarcaciones menores están distribuidas en cuatro zonas: 1) poniente: Celestún y Sisal; 2) centro-Progreso: arrecife Alacranes; 3) centro: Dzilam de Bravo, y 4) oriente: río Lagartos, San Felipe y el Cuyo; cada una de estas pequeñas embarcaciones están equipadas con un compresor para el buceo, su jornada es de un día y capturan organismos subadultos y adultos. Las embarcaciones mayores (60 a 80 pies de eslora) pescan en las cercanías del arrecife Alacranes a profundidades que oscilan entre los 5 y 30 m, y realizan viajes de hasta 15 días, en los que capturan organismos adultos principalmente (Salas *et al.*, 2005).

El objetivo de este trabajo fue conocer la prevalencia del virus PaV1 en langostas *P. argus* capturadas en dos localidades del estado de Yucatán (en el arrecife Alacranes-Progreso y en el río Lagartos), al comprobar la relación entre la prevalencia de infección de PaV1 (variable dependiente) y otros factores tales como talla, estado de la muda, sexo y zona de colecta de las langostas (variables regresoras).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. Se seleccionaron dos áreas de pesca de langosta: 1) zona norte (Progreso): que comprende el Parque Nacional de Arrecife Alacranes y zonas arrecifales rocosas profundas aledañas, 2) río Lagartos, que es un área caracterizada por praderas de *Thalasia testudinum* (Banks, 1805) y formaciones rocosas naturales (Fig. 1). El arrecife Alacranes es el complejo coralino más importante del golfo de México y se encuentra a 132 km al norte del puerto de Progreso, Yucatán, entre los 22° 21' 45" - 22° 34' 55" N y 89° 36' 47" - 89° 47' 53" O. Es un complejo arrecifal emergente de forma oval que cubre un área total de 293 km<sup>2</sup>, con una longitud y una anchura máximas de 26.5 km y 14.8 km (Bello-Pineda, 1998). Está constituido por una plataforma que se eleva desde los 50 m de profundidad, y sus características morfológicas más sobresalientes las constituyen el cantil y la barrera de barlovento, el cantil norte, el cantil de sotavento, la meseta o zócalo arrecifal y las islas de pequeñas dimensiones conocidas como Pérez, Pájaros, Chica, Muertos, Desterrada y Desaparecida (De la Cruz *et al.*, 1993; Ardisson *et al.*, 1996). El clima es de tipo seco-cálido, con lluvias escasas y temperatura anual media de 26.7 °C (rango entre 10 y 40 °C). Las corrientes marinas se dirigen al oeste y los vientos dominantes más intensos se presentan entre octubre y marzo, provenientes del oeste y

noreste. Además, a estas corrientes se suman también los efectos de tormentas tropicales, huracanes y nortes (Logan, 1969).

El puerto de río Lagartos se localiza en la región litoral norte del estado, entre los 21° 37' 35.55" N y 88° 10' 56.96" O; ocupa una superficie de 249.09 km<sup>2</sup> y está limitado al norte con el golfo de México, al sur con el municipio de Panabá, al este con el municipio de Tizimín y al oeste con el puerto de San Felipe. Su clima es cálido semi-seco y templado con lluvias escasas, su temperatura anual media es de 25.4 °C (con rangos entre 10 y 41 °C) y la precipitación pluvial media es de 41.3 mm, con predominio de vientos procedentes del noroeste (INEGI, 2010) y de vegetación de duna costera.

**Colecta de muestras:** Se realizó un muestreo dirigido de 30 salidas quincenales durante la temporada de pesca, del 1 de julio de 2013 al 30 de enero de 2014 y del 1 al 30 de julio de 2014 (nunca se quebrantó la temporada de veda). Durante ese periodo se visitaron dos cooperativas: en Progreso, la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera Pescadores de Sisal S. C. de R. L., donde se almacenan langostas capturadas por la flota mayor, provenientes de la zona de arrecife Alacranes, y en río Lagartos, la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera Pescadores de río Lagartos S. C. de R. L., donde se acopian organismos que provienen de la pesca artesanal, caracterizados por embarcaciones pequeñas (flota menor). En ambas cooperativas se midió cada cola de langosta con un vernier ( $\pm 0.1$  mm) y se determinó el sexo con base en caracteres dimórficos externos (Briones-Fourzán *et al.*, 2007).

Las tallas (fases ontogénicas) de las langostas se calcularon por medio de la longitud de la cola y a través de la aplicación de las fórmulas del modelo de regresión propuesto por Briones-Fourzán *et al.* (2007): macho  $TL = 1.79 LC + 37.31$   $R^2 = 0.82$ ; hembra  $TL = 1.47 LC + 10.58$   $R^2 = 0.61$ . Dónde: TL = longitud total (mm); LC = longitud de la cola. Este modelo de regresión utiliza el método *bootstrap* o remuestreo, ya que a partir de la medición de las colas se estiman los tamaños totales de los organismos. Este modelo se basa en un muestreo probabilístico que permite establecer el grado de significancia (usualmente el 5%) como la máxima cantidad de error, al hacer estimaciones alternativas de los parámetros de la regresión (Briones-Fourzán *et al.*, 2007).

Debido a que las colas de langosta estaban destinadas a exportación, se colectó de cada una de ellas aproximadamente 50 mg de tejido de intestino cercano a la región anal, de acuerdo con lo descrito por Huchín-Mian *et al.* (2009). Cada porción de tejido colectado se guardó en un vial de plástico (Eppendorf, EUA) de 1.5 ml, con alcohol etílico al 96% para su conservación. Cada vial se etiquetó con el número de langosta y la zona de captura. Durante la colecta de tejido se utilizaron tijeras y pinzas estériles, cuyo cuidado consistió en su lavado y esterilización con alcohol etílico al 70% y su posterior flameo en un mechero de alcohol para evitar contaminación cruzada con ADN.

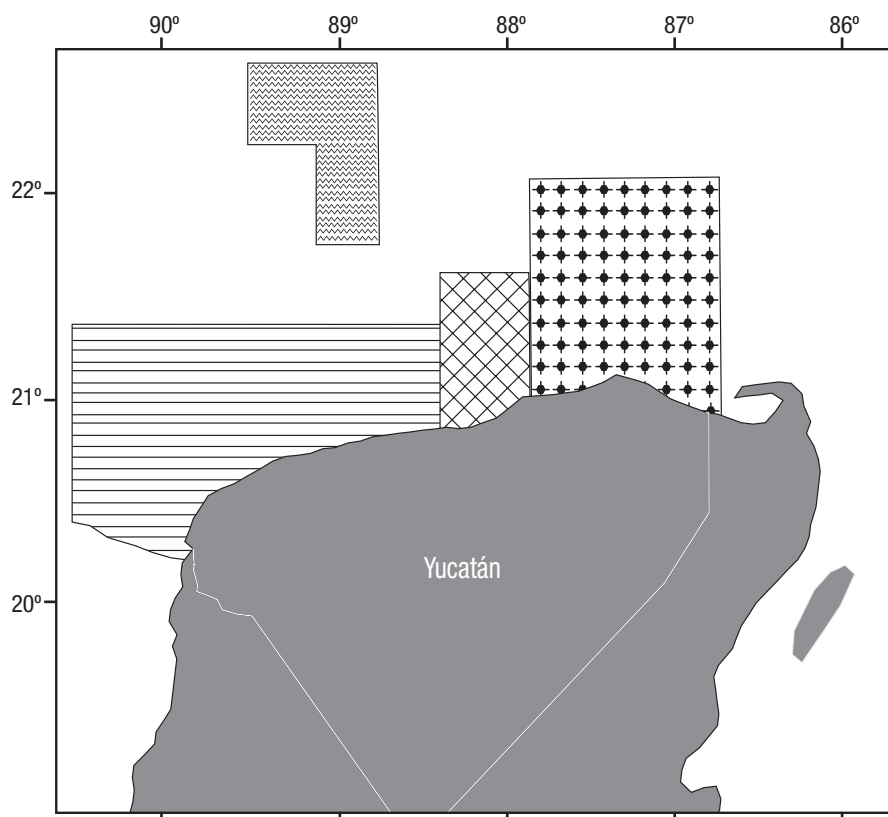


Figura 1. Áreas de pesca de langosta *Panulirus argus* (Latreille, 1804) en el litoral del estado de Yucatán, México. = Alacranes-Progreso, = Poniente, = Centro, = Oriente (tomado de Salas *et al.*, 2005 y modificado por Bello *et al.*, 2000).

A las 496 colas (327 colas de langosta se colectaron en la primera cooperativa y 169 en la segunda) también se les cortó el extremo distal de uno de sus pleópodos para determinar el estado de muda, de acuerdo con las características descritas por Lyle y McDonald (1983). Los pleópodos se colocaron en viales de plástico con agua de mar y después se observaron en fresco en un microscopio compuesto (100x). Este análisis consiste en observar las características generales de la morfología externa y describir alguna de las cinco fases de desarrollo de la seta, epidermis y cutícula. En la fase temprana de la postmuda (A) la epidermis está presente en la seta y se retrae en la postmuda (B). En la fase de intermuda (C) la epidermis se retrae bajo la seta para formar una línea recta en el fondo. En la fase temprana de la premuda (D1) la epidermis se retrae de la cutícula vieja para formar una nueva cutícula. Y en la fase final (antes de la muda, D2) se forma una nueva seta debajo de la cutícula vieja. Los estados del ciclo de muda en los crustáceos están caracterizados por una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, por lo que es importante diferenciar si estos cambios son debido al estado de muda o son signos clínicos asociados a la infección por PaV1 (Huchín-Mian *et al.*, 2013).

**Extracción de ADN.** El ADN genómico se extrajo individualmente de cada muestra de tejido intestinal mediante el estuche comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega, EUA) (Huchín-Mian *et al.*, 2009). La concentración de ADN de cada muestra se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, EUA), al medir los valores de absorbancia del ADN a 260 nm y 280 nm, respectivamente para cada muestra. El criterio para su utilización en la prueba de PCR fue la obtención de una relación de  $\geq 1.8$  del promedio de los valores a 260/280 nm.

**Reacción en cadena de la polimerasa.** El PCR simple se realizó en un volumen de 25  $\mu$ l, el cual consistió en: 1  $\mu$ l de plantillas de ADN, 0.33  $\mu$ M de iniciadores específicos (45aF TTCCAGCCCAGGTACGTATC y 543aR AACAGATTTCCAGCAGCGT) que amplifican un fragmento de 499 pb (Montgomery-Fullerton *et al.* 2007), 2.5 mM de  $MgCl_2$ , 1.2x de búfer de reacción, 0.2 mM de la mezcla de dNTP y 2.5 U de Taq polimerasa (Thermo Fisher Scientific, EUA). Las condiciones de amplificación fueron de 94 °C durante 10 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 63 °C por 30 s, y 72 °C por 1 min, con una extensión final de 72 °C por 10 min en un termociclador T100 (Bio-Rad, EUA). Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con 0.001 mg de bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta (MiniBis Pro®). En todos los casos se utilizó agua ultrapura y tejido de langostas no infectadas como controles negativos, y ADN de langostas infectada con PaV1 como control positivo (Montgomery-Fullerton *et al.*, 2007; Huchín-Mian *et al.*, 2008). Como control interno se utilizó actina (AF399872.1 *H. americanus* alpha actin mRNA); 3ActF (TCATGAGGTGCGACATTGAT) y 3ActR (GAGCCAGAGCAGTGATTCC), los cuales amplificaron una región de 120 pares de bases. Las reacciones se realizaron en un volumen de 25  $\mu$ l de volumen total con contenido: 2  $\mu$ l de ADN, 0.33  $\mu$ M de cada iniciador específico (F y R), 2.5 mM de  $MgCl_2$ , 1.2x buffer de reacción, 0.4 mM de la mezcla de dNTPs (Promega) y 1 U de Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, EUA), y se llevaron a cabo en un termociclador T100 (Bio-Rad, EUA) a 95 °C por 10 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C / 30 s, 60°C / 30 s y 72 °C / 1 min, con una extensión final de 72 °C / 10 min. Se utilizó una escalera de 100 pb -3 kb como referencia (Promega, EUA)

Los productos de PCR se secuenciaron por el método de la cadena terminal de Sanger utilizando el secuenciador automático Abi 310 (Abi Prism® 310, Thermo Fisher Scientific, EUA) (Sanger, 1977). Las secuencias se compararon con las depositadas en el banco de genes (GenBank; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para buscar homología con las depositadas en las bases de datos de PaV1 a través del sistema BLAST (Basic Local Alignment Research Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>). En este portal se evaluaron los porcentajes de similitud, de cobertura y significancia (E) (Análisis ClustalW) de las secuencias de ADN del virus PaV1 de este estudio con las secuencias de PaV1 depositadas en el GenBank.

**Análisis de datos.** Los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat (DiRienzo *et al.*, 2010). La prevalencia de la infección de determinó a través de la fórmula descrita por Bush y colaboradores (1997): prevalencia es igual al número de organismos infectados entre el número total de organismos, expresado en porcentaje (%).

Para la comparación de la prevalencia del virus PaV1 en las langostas *P. argus* entre las tallas (juveniles, adultos y subadultos), el sexo (machos y hembras) y los sitios de pesca, se utilizó la prueba  $\chi^2$  de Wald (con sus grados de libertad [gl]) con el fin de determinar las diferencias entre estas variables a través de la prueba de mínimos cuadrados. Asimismo, se realizó un análisis de regresión logística para comprobar la relación entre la prevalencia de infección de PaV1 (variable dependiente) y factores tales como talla, estado de la muda, sexo y zona (río Lagartos y arrecife Alacranes-Progreso, variables regresoras). Este análisis calcula, para cada una de las variables del modelo, el coeficiente de regresión (y su error estándar), el cual permite estimar la razón de productos cruzados o razón de momios [odds ratio (OR)] para cada variable regresora. El modelo de regresión logística puede ser usado para predecir la probabilidad ( $p$ ) de que la variable respuesta asuma un valor determinado. Los resultados fueron interpretados por medio de la OR, la cual es un parámetro de cuantificación que indica la probabilidad de riesgo de que una langosta sea infectada por el virus PaV1. El modelo de regresión logística utiliza la prueba  $\chi^2$  de Wald para la validación de los valores de los coeficientes de regresión y los OR. Para el análisis de datos se utilizó el programa Infostat (DiRienzo *et al.*, 2010).

## RESULTADOS

Ninguna de las 496 colas de langosta analizadas tenía signos clínicos de la enfermedad causada por PaV1, como son: coloración rojiza de cefalotórax ni vestigios de hemolinfa lechosa. Todos los organismos estuvieron en intermuda.

Se detectó DNA de PaV1 en 13 colas de langosta *P. argus* por la prueba de PCR. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de la amplificación de un amplicón de 499 pb correspondiente al PaV1. Asimismo, en la Figura 3 se muestra la amplificación de un producto de 120 pb, correspondientes a la región control de Actina. En total se obtuvo una prevalencia de 2.62% (Tabla 1).

Los resultados BLAST obtenidos de la comparación de las secuencias de ADN de PaV1 de este estudio (número de acceso en el GenBank: KR362559), mostraron 100% de homología y de cobertura con las secuencias de PaV1 reportadas en juveniles *P. argus* de la Florida, EUA (número de acceso: EF206313) (E = 0.0) y 99% de homología y 100 % de cobertura con la secuencia de DNA de puerulos de *P. argus* colec-

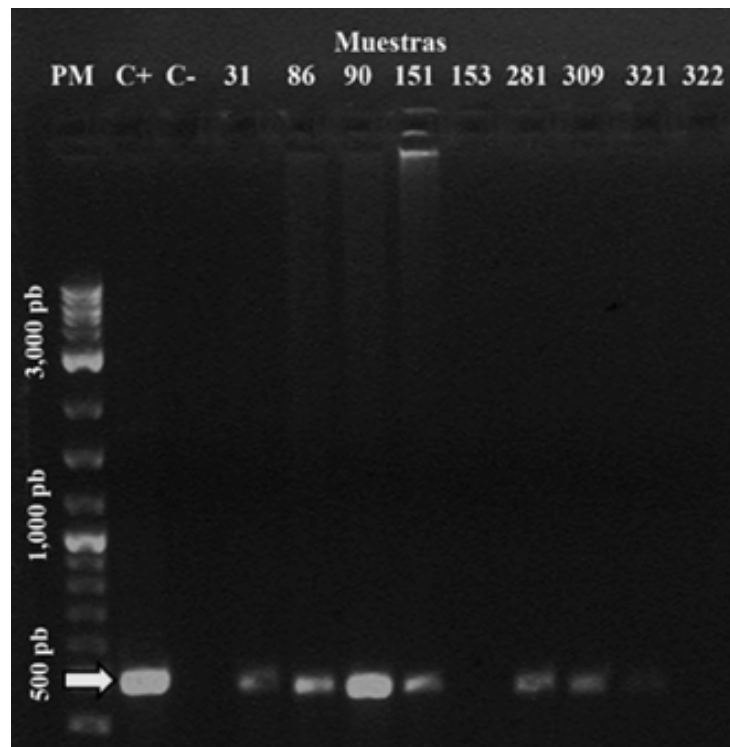


Figura 2. Prueba de PCR-simple para detectar al virus PaV1 (499 pb) en las colas de langostas *Panulirus argus* (Latreille, 1804). PM = escalera de peso molecular de 100 pb plus, C+ = control positivo, C- = control negativo). Los números denotan el número asignado a cada muestra de langosta.

tados en Puerto Morelos, Quintana Roo ( $E = 0.0$ ) (número de acceso: KR362560) (Lozano-Álvarez *et al.*, 2015).

La proporción de tallas de las langostas varió entre las zonas de captura: 202 subadultas (79 de arrecife Alacranes, Progreso y 123 de río Lagartos) y 294 adultos (248 de arrecife Alacranes, Progreso y 46 de río Lagartos), donde una mayor proporción de estos últimos se encontró en arrecife Alacranes, Progreso (Fig. 3). La distribución de organismos machos y hembras fue similar entre los dos sitios de muestreo, pero para la talla adulta se observó una mayor proporción de organismos machos (Fig. 4a).

**Determinación de los factores de riesgo asociados a la prevalencia del virus PaV1.** Se observó una mayor prevalencia de PaV1 en el río Lagartos (4.62%) en comparación con arrecife Alacranes, Progreso (1.52%) ( $X^2 = 4.28$ ,  $p = 0.0038$ ) (Fig. 4). No se encontraron diferencias significativas en la prevalencia del PaV1 entre machos (2.35%) y hembras (2.69%) ( $X^2 = 0.06$ ,  $p = 0.8132$ ) (Tabla 1, Fig. 4b).

En cambio, sí se registraron diferencias significativas entre las tallas de langosta, donde la talla subadulto presentó una mayor prevalencia de PaV1 (3.39%) en contraste con la talla adulta (1.67%) ( $X^2 = 9.62$ ,  $p = 0.0081$ ) (Tabla 1, Fig. 4c).

Los estimados del análisis de regresión logística de las variables regresoras (talla, zona de pesca, estado de la muda y sexo) sobre la probabilidad de encontrar langostas con el virus PaV1 mostraron que solamente dos variables presentaban una relación significativa: la talla

de las langostas y la zona de muestreo. Con este análisis se observó que la probabilidad de encontrar DNA de PaV1 en las langostas disminuyó significativamente conforme aumentó la talla de langosta, situación que fue significativamente mayor en río Lagartos en contraste con arrecife Alacranes, Progreso (Tabla 2).

Tabla 1. Prevalencia del *Panulirus argus* virus 1 (PaV1) en las colas congeladas de langosta espinosa *Panulirus argus* (Latreille, 1804)

Variable	N*	Número de langostas positivas a PCR	Prevalencia (%) de PaV1
<i>Sitio</i>			
Progreso	327	5	1.53
Río Lagartos	169	8	4.73
<i>Fase</i>			
Subadultas	202	8	3.96
Adultas	294	5	1.7
<i>Sexo</i>			
Hembra	208	5	2.4
Macho	288	8	2.77

\*número de organismos

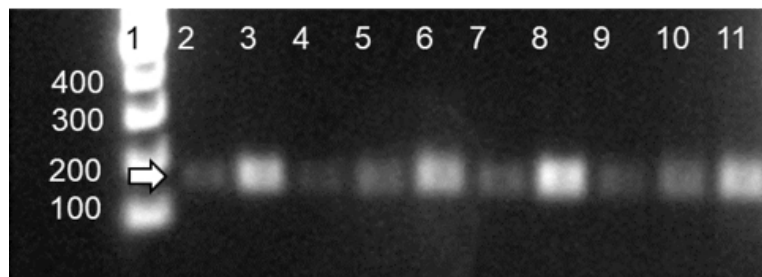


Figura 3. Prueba de PCR de la región control de actina. Línea 1: marcador molecular de 100 pb. Líneas 2-11: DNA de *Panulirus argus* (Latreille, 1804).

## DISCUSIÓN

La exportación de colas de langosta *P. argus* genera una valiosa fuente de ingresos económicos para la península de Yucatán. En este recurso se ha detectado al virus PaV1. Aún no se sabe si éste tiene algún efecto sobre su pesquería, dado que en juveniles causa una enfermedad sistémica y crónico-degenerativa que provoca su muerte (Huchin-Mian *et al.*, 2009; 2013; Cruz-Quintana *et al.*, 2011; Behringer *et al.*, 2012). Este virus se encuentra en organismos de vida libre y su erradicación es imposible hasta ahora (Behringer *et al.*, 2012). Aunque PaV1 es el único agente viral reportado en *P. argus*, a la fecha no existe alguna normatividad referente a los requerimientos o las regulaciones sanitarias oficiales para detectar su presencia antes de ser distribuidos al mercado internacional. Se ha reportado que el transporte de organismos enfermos es un riesgo potencial para la propagación del virus de un área geográfica a otra, como ha ocurrido con otros patógenos en crustáceos (Hasson *et al.*, 1999; Huchin-Mian *et al.*, 2009). En ese sentido, este trabajo se propuso evaluar la prevalencia de PaV1 en dos de las principales zonas de pesca de langostas *P. argus* de la plataforma de la península de Yucatán destinadas a la exportación, con el fin de establecer algún factor de riesgo asociado a la presencia de PaV1.

Debido a que este estudio se basó en un muestreo dirigido, no se estimó el número de muestra en la colecta de organismos, no obstante, sí se siguieron las indicaciones de la Organización Internacional de

Epizootias (OIE), que sugiere colectar al menos 30 organismos para la vigilancia de patógenos exóticos (OIE, 2010).

Las secuencias de ADN de PaV1 (KR362559) obtenidas en este estudio tuvieron 100% de homología con secuencias de PaV1 reportadas en langostas juveniles *P. argus* de Florida ( $E = 0.0$ ) (Montgomery-Fullerton *et al.*, 2007) y 99% de homología con secuencias de puerulos reportados en Puerto Morelos, Quintana Roo ( $E = 0.0$ ) (Lozano-Álvarez *et al.*, 2015). No se analizaron juveniles ni puerulos debido a que el objetivo de este trabajo fue la detección de PaV1 en langostas *P. argus* subadultas y adultas destinadas a la comercialización. En este sentido, es importante recalcar que ninguna de las colas de langostas analizadas mostró algún signo clínico característico de PaV1 (coloración rojiza del cefalotórax y hemolinfa lechosa). Considerando ese criterio, se puede asumir que los organismos analizados no se encontraban infectados. Ya que esto es más evidente en las langostas juveniles (Shields & Behringer, 2004); sin embargo, estos signos también pasan desapercibidos inadvertidos en juveniles durante las fases tempranas de la infección (Li *et al.*, 2008). En infecciones experimentales con langostas juveniles, los signos clínicos se empezaron a observar 80 días después de la inyección del virus (Li *et al.*, 2008). En el medio natural esta gran ventana de tiempo en la fase subclínica o asintomática puede favorecer la propagación del virus (Behringer *et al.*, 2006; Shields, 2011).

Tabla 2. Estimaciones de regresión logística y la probabilidad de infección (odds ratio  $\pm$  intervalos de confianza al 95%) con el virus PaV1 en colas de langostas *Panulirus argus* (Latreille, 1804) entre tallas, sitios de muestreo, estado de la muda y sexos (variables explicatorias).

Variable	Coefficiente de regresión	Error estándar	Odds ratio [OR] (intervalos de confianza de 95%)	Wald- $\chi^2$	gl	$p^*$
<i>Talla</i>						
Subadulto	-3.49	1.41	0.03 (0.001-0.49)	6.1	2	0.0135**
<i>Sitio</i>						
Río Lagartos	6.44	1.77	626.6 (19.3-20314.4)	13.17	1	0.0003**
<i>Muda</i>						
	-0.06	0.36	0.94 (0.47-1.9)	0.03	3	0.8703
<i>Sexo</i>						
Macho	-1.01	0.61	0.36 (0.11-1.21)	2.71	1	0.0995

\* Estimación de la significancia. \*\*Se observaron diferencias significativas con  $p \leq 0.05$ .

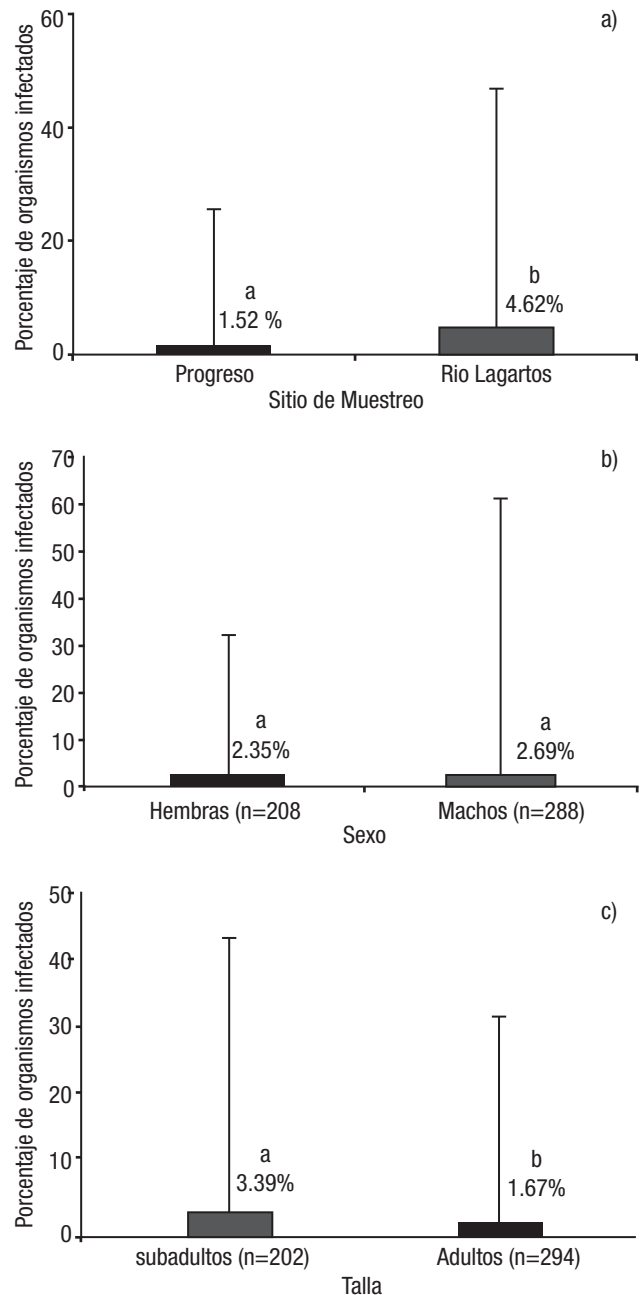
La prevalencia de 2.55% determinada por PCR indica la presencia del ADN viral en las colas de langostas destinadas a la exportación. Al evaluar los factores de riesgo, no se observaron diferencias significativas entre machos y hembras, ni con el estado de muda, pero sí se observaron diferencias significativas entre zonas de pesca: la prevalencia de PaV1 fue significativamente mayor en las langostas de río Lagartos (4.62%) respecto a las de Progreso (1.52%) (Tablas 1 y 2). En río Lagartos se practica la pesca artesanal en un área de captura de 10 a 20 m que está caracterizada por zonas de pastos marinos y vegetación sumergida, éstas brindan protección principalmente a las langostas juveniles y subadultas, las cuales son más susceptibles a la infección por PaV1. Sin embargo, esta vegetación también promueve el gregarismo, el cual incrementa el contacto entre las langostas y aumenta el riesgo de transmisión de PaV1 al compartir refugios (Beringher *et al.*, 2012; Briones-Fourzán *et al.*, 2012; Shields, 2012). Por otro lado, la presencia de pastos marinos y vegetación costera provee condiciones propicias para zonas de crianza de las poblaciones de langosta *P. argus* del estado de Yucatán (Salas *et al.*, 2015). Además, se trata de un área protegida en donde se regula la pesca a través de vedas, por lo que tiene periodos de pesca bien definidos que van del 1 de julio al 30 de enero (Salas *et al.*, 2015). Por otro lado, en el Arrecife Alacranes la pesca comercial de langostas se realiza por medio de trampas, donde se capturan principalmente organismos subadultos y adultos a profundidades mayores de 30 m. Esta área, cuyo desembarque se realiza en el puerto de Progreso, tiene igualmente una arquitectura de fondo compleja y con gran diversidad de refugios (Rios-Lara *et al.*, 2013).

La variación espacial de la prevalencia entre poblaciones de *P. argus* en zonas cercanas está relacionada con factores abióticos, como la profundidad y las características del tipo de fondo (Briones-Fourzán *et al.*, 2012; Stentiford & Feist, 2005; Shields, 2011). En Quintana Roo se han observado diferencias en la prevalencia de PaV1 en las poblaciones naturales de *P. argus* entre hábitats cercanos (menos de 15 km). Por ejemplo, en Bahía de la Ascensión no se reportaron langostas infectadas, mientras que en Vigía Chico la prevalencia fue por arriba del 8% por PCR y de 1.8% por signos clínicos (Candia-Zulbarán *et al.*, 2012; Huchin-Mian *et al.*, 2013).

En este estudio la prevalencia de PaV1 fue mayor en langostas subadultas (3.39%) que en langostas adultas (1.67%) (Tabla 2). La razón de que las adultas sean más resistentes a la infección por PaV1 aún se desconoce, por lo tanto, es motivo de estudio. No obstante, los resultados de esta investigación coinciden con otros realizados en diferentes áreas geográficas del Caribe, en donde la prevalencia de PaV1 aumenta al disminuir la talla de *P. argus* (Shields & Behringer, 2004; Behringer *et al.*, 2006; Butler *et al.*, 2008; Lozano-Álvarez *et al.*, 2008; Cruz-Quintana *et al.*, 2011; Huchin-Mian *et al.*, 2013).

Debido a que los signos clínicos son menos evidentes en langostas subadultas y adultas, las pruebas de PCR sirven de apoyo para la identificación de ADN de PaV1 (Moss *et al.*, 2013). Aunque la identificación del DNA viral no puede discernir entre una infección pasada o presente, su utilidad en la determinación de áreas geográficas libres de PaV1 es relevante (Huchin-Mian *et al.*, 2013).

El conocimiento del estado de salud de *P. argus* en estas dos principales zonas de pesca proporciona información de línea base a los organismos encargados de establecer normativas sobre su regulación sanitaria.



Figuras 4a-c. Prevalencia (± intervalos de confianza al 95 %) del virus PaV1 en langostas *Panulirus argus* (Latreille, 1804). a) Por sitio de muestreo; b) Por sexo (machos y hembras); c) Por etapa ontogénica (talla). Letras diferentes en la barras indican diferencias estadísticas significativas.

En conclusión, los resultados de este trabajo muestran que el DNA del virus PaV1 está presente en colas de langostas congeladas, almacenadas y destinadas a la exportación. El riesgo de transmisión de PaV1 estuvo asociado a las variables: zona de pesca y fase ontogénica. Las langostas provenientes de río Lagartos (zona 4) tuvieron una prevalencia mayor que las langostas provenientes del arrecife Alacranes (zona 2). De igual forma, la prevalencia de PaV1 en langostas subadultas fue mayor que en las langostas adultas.

## AGRADECIMIENTOS

A la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera Pescadores de Río Lagartos S. C. de R. L. y a la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera Pescadores de Sisal S. C. de R. L., por su gran apoyo durante la colecta de material biológico. Al Conacyt, por la beca de doctorado otorgada a R. Pérez-Campos (número de referencia A3329). Y a los servicios externos del Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular (Cinvestav IPN Unidad Mérida) y al proyecto UNAM PAPIIT IN215113 (C. Pascual Jiménez), por su financiamiento.

## REFERENCIAS

- ARDISSON, H. P., J. DUNCAN, L. AGUIRRE & J. CANELA. 1996. Programa de manejo del Parque Marino Nacional Arrecife Alacranes, Yucatán, México. Cinvestav-IPN, Unidad Mérida.
- BEHRINGER, D. C., M. J. BUTLER & J. D. SHIELDS. 2006. Avoidance of disease by social lobsters. *Nature* 44: 421. DOI: 10.1038/441421a
- BEHRINGER, D. C., M. J. BUTLER, J. D. SHIELDS & J. MOSS. 2011. Review a *Panulirus argus* virus 1-a decade after its discovery Avoidance of disease by social lobsters. *Diseases of Aquatic organisms* 93: 153-160. DOI: 10.3354/dao02326
- BEHRINGER, D. C., M. J. BUTLER IV, J. MOSS & J. D. SHIELDS. 2012. PaV1 infection in the Florida spiny lobster (*Panulirus argus*) fishery and its effects on trap function and disease transmission. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 69: 136-144. DOI: 10.1139/F2011-146
- BELLO-PINEDA, J. 1998. Sistema de clasificación para los tipos de fondo del Arrecife Alacranes compatible con una imagen Landsat TM. Tesis de maestría en Ciencias (Biología), Cinvestav-IPN Unidad Mérida, Mérida. 107 p.
- BRIONES-FOURZÁN, P., E. LOZANO-ÁLVAREZ, F. NEGRETE-SOTO & C. BARRADAS-ORTIZ. 2007. Enhancement of juvenile Caribbean spiny lobsters: an evaluation of changes in multiple response variables with the addition of large artificial shelters. *Oecologia* 151: 401-416. DOI: 10.1007/s00442-006-0595-9
- BRIONES-FOURZÁN, P., R. I. CANDIA-ZULBARÁN, F. NEGRETE-SOTO, C. BARRADAS-ORTIZ, J.P. HUCHIN-MIAN & E. LOZANO-ÁLVAREZ. 2012. Influence of local habitat features on avoidance of disease by Caribbean spiny lobsters in a casita-enhanced bay. *Diseases of Aquatic Organisms* 100: 135-148. DOI:10.3354/dao02465
- BUSH, A. O., K. D. LAFFERTY, J. M. LOTZ & A. W. SHOSTAK. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *The Journal of Parasitology* 83: 575-583.
- BUTLER, M. J., D. C. BEHRINGER & J. D. SHIELDS. 2008. Transmission of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) and its effect on the survival of juvenile Caribbean spiny lobster. *Diseases of Aquatic Organisms* 79: 173-182. DOI: 10.3354/dao01899
- CANDIA-ZULBARÁN, R. I., P. BRIONES-FOURZÁN, F. NEGRETE-SOTO, C. BARRADAS-ORTIZ & E. LOZANO-ÁLVAREZ. 2012. Variability in prevalence of the PaV1 disease in Caribbean spiny lobsters occupying commercial casitas over a large bay in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 100: 125-133. DOI: 10.3354/dao02452
- CRUZ-QUINTANA, Y., R. RODRÍGUEZ-CANUL & V. VIDAL-MARTÍNEZ. 2011. First evidence of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) in spiny lobster from Cuba and clinical estimation of its prevalence. *Diseases of Aquatic Organisms* 93:141-147. DOI: 10.3354/dao 02279
- DE LA CRUZ, G., E. MARTÍNEZ & R. MUÑOZ. 1993. Propuesta de zonificación del Arrecife Alacranes, Yucatán. Cinvestav Mérida. Instituto Politécnico Nacional.
- DIRIENZO, J. A., F. CASSANOVES, M. G. L. BALZARIN, M. TABLADA & C. W. ROBLEDO. 2010. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- EHRHARDT, N., R. PUGA, M. J. BUTLER IV. 2010. Implications of the ecosystem approach to fisheries management in large ecosystems: The Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, fisheries as a case. In: Fanning, L., Mahon, R. & McConney, P. (eds). *Towards Marine Ecosystem-Based Management in the Wider Caribbean*. Amsterdam: University Press. 368 p.
- HASSON, K. W., D. V. LIGHTNER, L. L. MOHNEY, R. M. REDMAN, B. T. POULOS & B. M. WHITE. 1999. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 38: 93-105.
- HUCHÍN-MIAN, J. P., P. BRIONES-FOURZÁN, R. RODRÍGUEZ-CANUL, E. ARIAS-BAÑUELOS, R. SIMÁ-ÁLVAREZ, J. A. PÉREZ-VEGA & E. LOZANO-ÁLVAREZ. 2008. Presence of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) in juvenile spiny lobsters *Panulirus argus* from the Caribbean coast of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 79: 153-156. DOI: 10.3354/dao01898
- HUCHÍN-MIAN, J.P., P. BRIONES-FOURZÁN, R. SIMÁ-ÁLVAREZ & Y. CRUZ-QUINTANA. 2009. Detection of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) in exported frozen tails of subadult-adult Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 86:159-162 DOI: 10.3354/dao02117
- HUCHÍN-MIAN, J.P., R. RODRÍGUEZ-CANUL, P. BRIONES-FOURZÁN & E. LOZANO-ÁLVAREZ. 2013. *Panulirus argus* virus 1 (PaV1) infection prevalence and risk factors in a Mexican lobster fishery employing casitas. *Diseases of Aquatic Organisms* 107: 87-97 DOI: 10.3354/dao02676
- INEGI (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA). 2010. *Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. Disponible en línea en: <http://www.inegi.org.mx>.
- LI, C, J. D. SHIELDS, R.E. RATZLAFF & M. J. BUTLER. 2008. Pathology and hematology of the Caribbean spiny lobster experimentally infected with *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1). *Virus Research* 132: 104-113. DOI: 10.1016/j.virusres.2007.11.005
- LOGAN, B. W. 1969. Carbonate sediments and reefs, Yucatan Shelf, Mexico. *American Association of Petroleum Geologists, Memoir* 11: 1-198.
- LOZANO-ÁLVAREZ, E., P. BRIONES-FOURZÁN, A. RAMÍREZ-ESTÉVEZ, D. PLACENCIA-SÁNCHEZ, J. P. HUCHIN-MIAN & R. RODRÍGUEZ-CANUL. 2008. Prevalence of *Panulirus argus* Virus 1 and habitation patterns of healthy and diseased Caribbean spiny lobsters in shelter-limited habitats. *Diseases of Aquatic Organisms* 80: 95-104. DOI: 10.3354/dao01921
- LOZANO-ÁLVAREZ, E., P. BRIONES-FOURZÁN, J. P. HUCHIN-MIAN, I. SEGURA-GARCÍA, J. P. EK-HUCHIM, M. AMÉNDOLA-PIMENTA & R. RODRÍGUEZ-CANUL. 2015. Molecular detection of PaV1 (*Panulirus argus* Virus 1) in nektonic post-larvae of Caribbean spiny lobsters in oceanic waters: implications



- for long-distance disease dispersal. *Disease of Aquatic Organisms* 117: 165-170. DOI: 10.3354/dao02935
- LYLE, W. & C. MACDONALD. 1983. Molt stage determination in the Hawaiian spiny lobster. *Journal of Crustacean Biology* 3 (2): 208-216.
- MONTGOMERY-FULLERTON, M. M., R. A. COOPER, K. M. KAUFFMAN, J. D. SHIELDS & R. E. RATZLAFF. 2007. Detection of *Panulirus argus* Virus 1 in Caribbean spiny lobsters. *Disease of Aquatic Organisms* 76: 1-6.
- MOSS, J., D. C. BEHRINGER, J. D. SHIELDS, J. A. BAEZA, A. AGUILAR-PERERA, P. G. BUSH & C. DROMER IV. 2013. Distribution, prevalence, and genetic analysis of *Panulirus argus* virus I from the Caribbean Sea. *Diseases of Aquatic Organisms* 104: 129-140. DOI: 10.3354/dao02589
- OIE (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD ANIMAL). 2010. *Aquatic Animal Health Code*. 13a edición. París, Francia, 247 p. ISBN 978-92-95108-71-4. Disponible en línea en: <http://www.oie.int/doc/ged/D7821.PDF>.
- PUGA, R. 2002. El estado regional de las pesquerías de langosta en el Caribe. Segundo Taller sobre el Manejo de las Pesquerías de la langosta espinosa del área de la COPACO. La Habana, Cuba, septiembre-octubre de 2002.
- RIOS-LARA, G. V., J. C. ESPINOZA-MENDEZ, C. ZETINA-MOGUEL, C. AGUILAR-CARDOZO & A. RAMÍREZ-ESTÉVEZ. 2013. *La pesquería de langosta Panulirus argus en el golfo de México y mar Caribe mexicano*. Primera edición. Instituto Nacional de Pesca, Mexico D. F.
- SALAS, S., J. BELLO, G. RIOS, R. SOLÍS, M. CABRERA & A. SANTA MARÍA. 2005. *Programa maestro del sistema producto de la pesquería de langosta en Yucatán*. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (Conapesca). pp. 1-12.
- SALAS, S., R. REGIST, C. ZAPATA, M. A. CABRERA & J. EUAN-AAVILA. 2015. How much we can learn from fishers about ecology and fisheries management: case studies on spiny lobster fishery in Mexico. In: Fischer J., J. Jorgensen, H. Josupeit, D. Kalikoski & C. M. Lucas (eds). *Fishers' knowledge and the ecosystem approach to fisheries. Applications, experiences and lessons in Latin America*. First ed. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 591, Rome. 278 p.
- SANGER, F., S. NICKLEN, S. & A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5463-5467.
- SHIELDS, J. D & D. C. BEHRINGER. 2004. A new pathogenic virus in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* from the Florida Keys. *Disease of Aquatic Organisms* 59: 109-18. DOI: 10.3354/dao059109
- SHIELDS, J. D. 2011. Diseases of spiny lobsters: a review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106: 79-91. DOI: 10.1016/j.jip.2010.09.015
- SHIELDS, J. D. 2012. The impact of pathogens on exploited populations of decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 211-224. DOI:10.1016/j.jip.2012.03.011
- STENTIFORD, G. D. & S. W. FEIST. 2005. A histopathological survey of shore crab (*Carcinus maenas*) and brown shrimp (*Crangon crangon*) from six estuaries in the United Kingdom. *Journal of Invertebrate Pathology* 88: 136-146. DOI: 10.1016/j.jip.2005.01.006