



# VARIACIONES GENOTÍPICAS DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LAS MANCHAS BLANCAS (VSMB) AISLADOS EN LANGOSTINOS DE CULTIVO DE PERÚ

## GENOTYPIC VARIATIONS OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) ISOLATED FROM CULTURED SHRIMP IN PERU

Beder Ramírez<sup>1,\*</sup> 

Mervin Guevara<sup>1</sup> 

Yuliana Saavedra<sup>1</sup> 

Vanessa Montoya<sup>1</sup>

María Serna<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto del Mar del Perú (IMARPE), Laboratorio Costero de Tumbes, Perú.

\* Correspondencia. Email: [bramirez@imarpe.gob.pe](mailto:bramirez@imarpe.gob.pe)

Recibido: 19-05-2023, Aceptado: 12-04-2024, Publicado: 10-06-2024

### RESUMEN

El virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB), es uno de los principales patógenos de langostinos peneidos reportado a nivel mundial. Desde su primera aparición hasta la actualidad, el VSMB ha mostrado una notable capacidad para alterar su estructura genética, lo que ha dado lugar a diversidad de genotipos. Con el objetivo de detectar las variantes genotípicas del VSMB presentes en el cultivo de langostinos de la costa norte del Perú (Región Tumbes), en esta investigación, se evaluaron 89 muestras de branquias y postlarvas de langostinos infectados con el VSMB que fueron colectados entre los años 2014 y 2021. El análisis fue realizado mediante la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y secuenciamiento de regiones variables del ADN, ubicados en los marcos de lectura abierta (ORFs= *open reading frame*) 75, 94, 125, 14/15, 23/24 y un gen transposasa presuntiva. En comparación con los genomas de referencia del VSMB, todas las muestras analizadas presentaron deleciones de 5138 pb en el ORF 14/15, de 11110 pb en el ORF 23/24 y de 1338 pb en un gen transposasa presuntiva. A nivel de los ORFs 75, 94 y 125, se observó variación en la cantidad de secuencias repetitivas de 6 a 8, 1 a 3 y 2 a 13, respectivamente; esta variación permitió detectar hasta 8 genotipos de VSMB presentes en los langostinos de cultivo de la zona norte de Perú. El hallazgo inicial de estos genotipos representa un logro significativo que sentará las bases para futuros estudios epidemiológicos del VSMB en langostinos de cultivo y silvestres en esta región geográfica.

PALABRAS CLAVE: virus del síndrome de las manchas blancas, ORFs, genotipos, *Litopenaeus vannamei*

### ABSTRACT

The White Spot Syndrome Virus (WSSV) stands as a prominent pathogen affecting penaeid shrimp globally. Since its emergence, WSSV has shown a remarkable ability to alter its genetic structure, resulting in a diversity of genotypes. This study aims to identify the genotypic variants of WSSV prevalent in shrimp farming along the northern coast of Peru (Tumbes Region). A total of 89 samples of gills and postlarvae from WSSV-infected shrimp were assessed between 2014 and 2021. The analysis involved PCR and sequencing of variable DNA regions located within open reading frames (ORFs) 75, 94, 125, 14/15, 23/24, and a putative transposase gene. Comparative to reference WSSV genomes, all samples exhibited deletions of 5138 bp in ORF 14/15, 11110 bp in ORF 23/24, and 1338 bp in a putative transposase gene. Variability in repetitive sequence numbers within ORFs 75, 94, and 125 ranged from 6 to 8, 1 to 3, and 2 to 13, respectively. This variability enabled the detection of up to 8 WSSV genotypes within cultured shrimp populations in northern Peru. This initial discovery of genotypic diversity sets the stage for future epidemiological investigations into WSSV among both cultured and wild shrimp in this region.

KEYWORDS: white spot syndrome virus, ORFs, genotypes, *Litopenaeus vannamei*

COMO REFERENCIAR ESTE ARTÍCULO: Ramírez, B., Guevara, M., Saavedra, Y., Montoya, V. & Serna, M. (2024). Variaciones genotípicas del Virus del Síndrome de las Manchas Blancas (VSMB) aislados en langostinos de cultivo de Perú. *Bol Inst Mar Perú*, 39(1), 79-95. <https://doi.org/10.53554/boletin.v39i1.407>

## 1. INTRODUCCIÓN

El virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB), es un virus de doble cadena de ADN circular, el tamaño de su genoma es de aproximadamente 300 kb (VAN HULTEN *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2001) y ha sido clasificado como el único representante del género *Whispovirus* de la familia Nimaviridae (MAYO, 2002). A nivel mundial, este virus se ha convertido en uno de los principales patógenos de los langostinos peneidos. La enfermedad causada por este virus, muestra diferentes signos clínicos como letargia, reducción de la alimentación y lesiones en la cutícula. La infección en un campo de cultivo, puede producir mortalidad de hasta 100% en un lapso de tiempo de tres a diez días (CHOU *et al.*, 1995).

Desde sus primeros reportes en la provincia de Fujian, China, en 1991/1992 (FLEGEL, 1997; JIANG *et al.*, 2017) y Taiwán en 1992 (CHOU *et al.*, 1995), el VSMB se ha dispersado rápidamente por Asia, América, África y algunos países de Oceanía tanto en langostinos de cultivo, como, en otras especies de crustáceos silvestres de agua marina y salobre (LO *et al.*, 1996a; WANG *et al.*, 1998; HOSSAIN *et al.*, 2001), así como también en poliquetos (VIJAYAN *et al.*, 2005) y ostras (VAZQUEZ-BOUCARD *et al.*, 2010). En el Perú, el VSMB fue reportado inicialmente en 1999, su presencia causó gran mortalidad en los langostinos de cultivo, produciendo el cierre de casi el 100% de la industria langostinera. Al igual que en otras partes del mundo, en Perú también se ha llegado a dispersar en diferentes especies de peneidos silvestres (ALFARO *et al.*, 2010; RAMÍREZ *et al.*, 2020).

El análisis bioinformático realizado por MARKS *et al.* (2004) en los tres primeros genomas de VSMB reportados hasta esa fecha, mostraron que, durante su dispersión por diferentes países, el VSMB ha ido presentando diferentes cambios en su genotipo. Las cepas de VSMB del estudio fueron colectadas en Tailandia (Accesión: AF369029) en 1996 (VAN HULTEN *et al.*, 2001), en Taiwán (Accesión: AF440570) en 1994 (WANG *et al.*, 1995) y China (Accesión: AF332093) en 1996 (YANG *et al.*, 2001) y permitieron identificar deleciones en algunas regiones del ADN del VSMB, así como también, presencia de un número variable de repeticiones en tándem (VNTRs, acrónimo del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*) en el genoma del VSMB.

## 1. INTRODUCTION

The White Spot Syndrome Virus (WSSV) stands out as a pivotal pathogen affecting penaeid shrimp globally. Its circular double-stranded DNA genome, spanning approximately 300 kb (VAN HULTEN *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2001) places it as the sole member of the *Whispovirus* genus within the family Nimaviridae (MAYO, 2002). WSSV infestations manifest diverse clinical signs, including lethargy, diminished feeding, and cuticular lesions, often culminating in mortality rates of up to 100%, in a culture field, within 3 to 10 days' post-infection (CHOU *et al.*, 1995).

Since its initial documentation in China's Fujian province in 1991/1992 (FLEGEL, 1997; JIANG *et al.*, 2017) and Taiwan in 1992 (CHOU *et al.*, 1995), WSSV has rapidly disseminated across Asia, the Americas, Africa, and select Oceanian nations. Its impact spans cultured shrimp as well as various wild marine and brackish crustaceans (LO *et al.*, 1996a; WANG *et al.*, 1998; HOSSAIN *et al.*, 2001), alongside polychaetes (VIJAYAN *et al.*, 2005) and even oysters (VAZQUEZ-BOUCARD *et al.*, 2010). In Peru, WSSV's 1999 emergence triggered widespread mortality in cultured shrimp, leading to substantial industry closures. Concurrently, it has infiltrated diverse species of wild penaeid shrimp across the country (ALFARO *et al.*, 2010; RAMÍREZ *et al.*, 2020).

MARKS *et al.* (2004) conducted bioinformatic analysis on the first three reported WSSV genomes up to that date, showing that during its spread across different countries, WSSV has undergone various changes in its genotype. The WSSV strains studied were collected in Thailand (Accession: AF369029) in 1996 (VAN HULTEN *et al.*, 2001), Taiwan (Accession: AF440570) in 1994 (WANG *et al.*, 1995), and China (Accession: AF332093) in 1996 (YANG *et al.*, 2001), revealing deletions in certain regions of WSSV DNA, as well as the presence of a variable number of tandem repeats (VNTRs) in the WSSV genome.

Based on genomic mapping conducted by MARKS *et al.* (2004) on WSSV strains collected

De acuerdo con el mapeo genómico realizado por MARKS *et al.* (2004) en la cepa de VSMB colectada en Tailandia (Accesión: AF369029), las deleciones, se encontraron en el ORF (*open reading frame*) 14/15, ORF 23/24 y en una región de ADN que codifica para una transposasa presuntiva. En cuanto a los VNTRs, se identificaron que los ORFs 75, 94 y 125, presentan el mayor polimorfismo.

Los VNTRs de los ORFs 94 y 125 están formados por una unidad repetitiva (UR) de 54 y 69 pb, respectivamente, mientras que, el ORF 75 se compone de dos URs: de 45 y 57 pb de acuerdo con SHEKAR *et al.* (2005) o, de 45 y 102 pb de acuerdo con MARKS *et al.* (2004) y DIEU *et al.* (2004). La diferencia en la descripción de los 2 URs, no altera la detección del VNTR del ORF 75, debido a que el UR de 102 pb considera una secuencia compuesta por los 45 pb del UR inicial más el de 57 pb, descrito por SHEKAR *et al.* (2005).

La identificación de las regiones variables del ADN, han permitido tipificar al genoma del VSMB en diferentes países de América (MULLER *et al.*, 2010; RAMOS-PAREDES *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2020), África (TANG *et al.*, 2013; ONIHARY *et al.*, 2021) y Asia (DIEU *et al.*, 2004; PRADEEP *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2016; MIN *et al.*, 2023). Además, ha permitido reconstruir las rutas epidemiológicas que ha seguido el VSMB durante su dispersión a través del mundo (ZENG, 2021), así como también evaluar los cambios que se pueden presentar en su virulencia (MARKS *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2016; RAMOS-PAREDES *et al.*, 2017; MIN *et al.*, 2023).

En el Perú, el VSMB aún sigue afectando la rentabilidad del cultivo de langostinos, ya sea mediante eventos de mortalidad por un corto periodo de tiempo o por la restricción que causa su presencia en la comercialización en diferentes mercados del mundo. Debido a la ausencia de información sobre los genotipos del VSMB, en el presente estudio se evaluaron los marcadores moleculares, los ORFs 14/15, 23/24, 75, 94, 125 y un gen transposasa presuntiva del ADN de VSMB, con el objetivo de detectar las variantes genotípicas del VSMB que se encuentran presentes en el cultivo de langostinos de la costa norte del Perú.

in Thailand (Accession: AF369029), deletions were identified in the ORF (*open reading frame*) 14/15, ORF 23/24, and a region of DNA encoding a putative transposase. Regarding the VNTRs, ORFs 75, 94, and 125 exhibited significant polymorphisms.

The VNTRs of ORFs 94 and 125 are formed by a repetitive unit (RU) of 54 and 69 bp, respectively, while ORF 75 is composed of two RUs: 45 and 57 bp according to SHEKAR *et al.* (2005), or 45 and 102 bp according to MARKS *et al.* (2004) and DIEU *et al.* (2004). The difference in the description of the 2 RUs does not alter the detection of the VNTR of ORF 75 because the 102 bp RU considers a sequence formed by the initial 45 bp RU plus the 57 bp described by SHEKAR *et al.* (2005).

Identification of variable DNA regions has facilitated WSSV genome typing across the Americas (MULLER *et al.*, 2010; RAMOS-PAREDES *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2020), África (TANG *et al.*, 2013; ONIHARY *et al.*, 2021), and Asia (DIEU *et al.*, 2004; PRADEEP *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2016; MIN *et al.*, 2023). This information has enabled the reconstruction of the epidemiological routes taken by WSSV during its global dissemination (ZENG, 2021), and the assessment of potential changes in virulence (MARKS *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2016; RAMOS-PAREDES *et al.*, 2017; MIN *et al.*, 2023).

In Peru, WSSV continues to impact shrimp farming profitability, leading to short-term mortality events or imposing restrictions on commercialization across various international markets. Given the dearth of information on WSSV genotypes, our study assessed molecular markers, including ORFs 14/15, 23/24, 75, 94, 125, and a putative transposase gene in WSSV DNA, aiming to identify genotypic variants prevalent in shrimp farming along Peru's northern coast.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección de muestras

Los análisis se realizaron en 89 muestras de langostinos (*Litopenaeus vannamei*) positivos al VSMB y que fueron recolectadas entre los años 2014 y 2021 en campos de cultivo semi-intensivo ubicados en la provincia de Contralmirante Villar (3 campos), Tumbes (6 campos) y Zarumilla (5 campos), el número de muestras por cada provincia se grafica en la Figura 1. Del total de muestras, 88 fueron langostinos con pesos de 8 a 15 gramos y la muestra restante fue de postlarvas. Las muestras seleccionadas fueron positivas a VSMB por la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando como indicador la presencia de un producto de amplificación en la primera etapa de la PCR anidada con los iniciadores 146 descritos por Lo *et al.* (1996). Esta selección, se realizó con la finalidad de descartar alguna interferencia en los resultados, debido a la ausencia de productos amplificados por la PCR en algunas regiones del ADN viral en muestras con bajo nivel de infección con VSMB.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### Sample selection

The analysis was carried out on 89 samples of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) that tested positive for WSSV. These samples were collected between 2014 and 2021 from semi-intensive farming fields located in the provinces of Contralmirante Villar (3 fields), Tumbes (6 fields), and Zarumilla (5 fields). Figure 1 illustrates the distribution of samples across the provinces. Among the samples, 88 consisted of shrimp weighing between 8 and 15 grams, while the remaining sample comprised postlarvae. The selection process for these samples involved confirming WSSV positivity through PCR, specifically by detecting amplification products in the first stage of nested PCR using the primers 146 as described by Lo *et al.* (1996). This step was crucial to ensure the reliability of the results, particularly to account for instances where PCR amplification failed in certain regions of viral DNA, particularly in samples with low levels of WSSV infection.

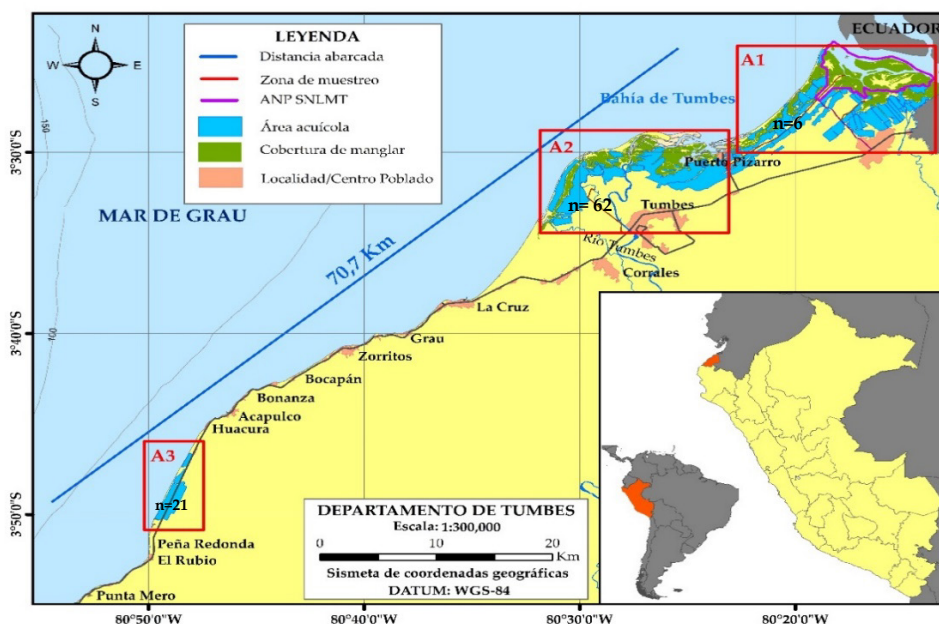


Figura 1.- Ubicación y número de muestras recolectadas por zonas de muestreo. A1: Campos de cultivo de Zarumilla, A2: Campos de cultivo de Tumbes, A3: Campos de cultivo de Contralmirante Villar. n= número de muestras recolectadas

Figure 1. Location and number of samples collected by sampling zones. A1: Zarumilla culture fields, A2: Tumbes culture fields, A3: Contralmirante Villar culture fields. n= number of samples collected

## Extracción de ADN

El ADN fue extraído de una cantidad aproximada de 100 mg del tejido homogenizado de branquias de cada una de las 88 muestras de langostinos adultos y del homogenizado de una muestra en forma de pool de 50 postlarvas. Para esta actividad, se utilizó el método CTAB-DTAB descrito por ALFARO *et al.* (2010) realizando modificaciones en la cantidad de tejido (100 mg en lugar de 25 mg) y en la resuspensión final del ADN con 150  $\mu$ L de agua libre de nucleasas (Merck). La concentración y calidad del ADN obtenido fue analizado en un espectrofotómetro Nanodrop One (Thermo Scientific) siendo inmediatamente conservado a  $-20$  °C hasta su análisis por la PCR.

## Amplificación por la PCR de las regiones del ADN de VSMB

La PCR fue desarrollada en un Termociclador 9800 Fast (Applied Biosystem) considerando 1  $\mu$ L de ADN de una concentración entre 50 y 100 ng/ $\mu$ L, 1  $\mu$ L de cada iniciador (*forward* y *reverse*) de 5  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ L del kit Dream Taq Green PCR (Thermo Scientific) y 9,5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. La detección del VSMB se realizó mediante la PCR anidada, utilizando los iniciadores 146 de Lo *et al.* (1996); para la amplificación de las regiones variables del ADN del VSMB, se utilizaron una lista de iniciadores (Tabla 1) específicos a los ORFs (ORFs 14/15, 23/24, 75, 94, 125) y una región de ADN que codifica para un gen transposasa presuntiva. La amplificación de estas regiones del ADN se realizó mediante la PCR simple, a excepción del ORF 125, en el cual también fue mediante la PCR anidada, debido que la PCR simple producía amplificaciones débiles en algunas muestras.

La PCR simple se realizó con una desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, una temperatura de hibridación (Th) por 30 segundos, 72 °C por un tiempo de polimerización (tp) y una polimerización a 72 °C por 5 minutos. La Th y el tp variaron de acuerdo con el juego de iniciadores utilizados y sus valores se describen en la Tabla 1. En la PCR anidada, la programación se modificó solamente en el número de ciclos, considerando 35 ciclos y 30 ciclos en la primera y segunda PCR respectivamente. Los productos amplificados fueron re-

## DNA extraction

DNA extraction was conducted using approximately 100 mg of homogenized gill tissue from each of the 88 adult shrimp samples, along with a homogenized pool sample containing 50 postlarvae. The CTAB-DTAB method described by ALFARO *et al.* (2010) was employed, with slight modifications including an increase in tissue amount to 100 mg and a final DNA resuspension in 150  $\mu$ L of nuclease-free water (Merck). Subsequently, the concentration and quality of the extracted DNA were assessed using a Nanodrop One spectrophotometer (Thermo Scientific). The DNA samples were promptly stored at  $-20$  °C until PCR analysis.

## PCR amplification of the WSSV DNA regions

The PCR procedure was carried out using a 9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystem). Each reaction mixture contained 1  $\mu$ L of DNA template with a concentration ranging from 50 to 100 ng/ $\mu$ L, 1  $\mu$ L of each forward and reverse primer at a concentration of 5  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ L of Dream Taq Green PCR Kit (Thermo Scientific), and 9.5  $\mu$ L of nuclease-free water. Detection of WSSV was accomplished using nested PCR with primers 146 described by Lo *et al.* (1996), while specific primers targeting variable regions of WSSV DNA were employed (Table 1) for amplifying ORFs (14/15, 23/24, 75, 94, 125) and a putative transposase gene. Standard PCR was used for amplification, except for ORF 125, where nested PCR was employed due to weak amplification observed in some samples using standard PCR.

Standard PCR was conducted with an initial denaturation at 95 °C for 5 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 seconds, annealing at a hybridization temperature (Th) for 30 seconds, extension at 72 °C for a polymerization time (tp), and a final extension at 72 °C for 5 minutes. The Th and tp varied depending on the primer sets employed, as detailed in Table 1. For nested PCR, the protocol was adjusted solely in terms of cycle numbers, with 35 cycles for the first PCR and 30 cycles for the subsequent PCR. Visualization

velados por electroforesis en un gel de agarosa (Merck) al 1,5% utilizando *Sybr Safe 1X* (Invitrogen) como intercalante y TAE 1X (Merck) como tampón de electroforesis.

**Análisis de secuencias**

Los productos amplificados por la PCR fueron agrupados de acuerdo con su tamaño y con el tipo de iniciador utilizado. Los grupos conformados por hasta 20 muestras fueron secuenciados en su totalidad, mientras que, en los grupos conformados por una cantidad mayor a 20 muestras, se seleccionó un grupo representativo de 20 muestras considerando el año y lugar de muestreo. El secuenciamiento fue realizado por la empresa MacroGen (Corea del Sur).

of the amplified products was achieved through electrophoresis on a 1.5% agarose gel (Merck), employing 1X *Sybr Safe* (Invitrogen) as an intercalating agent, and 1X TAE buffer (Merck) for the electrophoresis buffer.

**Sequence analysis**

The PCR-amplified products were organized based on their size and primer type used. Groups containing up to 20 samples were fully sequenced, while larger groups underwent representative subset selection (20 samples), considering sampling year and location. Sequencing was outsourced to MacroGen (South Korea).

Tabla 1.- Iniciadores utilizados para la detección del VSMB y evaluación las regiones de ADN variables  
 Table 1. Primers used for the detection of WSSV and evaluation of variable DNA regions

Nombre Name	Secuencia 3' - 5' Sequence 3' - 5'	*Th (°C)	**tp (s)	Referencia Reference	
146F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	62	90	Lo <i>et al.</i> , 1996	
146R1	TAATGCGGGTGTAAATGTTCTTACGA				
146F2	GTAAGTCCCCTTCCATCTCCA	62	60		
146R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT				
WO75-F	GTGAAGCAGTATCTCTAACACCAG	62	60	RAMOS-PAREDES <i>et al.</i> , 2017	
WO75-R	GGTGCCTAAAAGAAGTCGAGATC				
WO94-F	CGGTGTGCTGTTAGCCCGTGC	62	60		
WO94-R	GTATATGGCATCATGGCACCAC				
WO125-F	CAGAAAATTGTTGTCCCCTGTCTC	60	75		
WO125-R	CCCCTTTTCTAGTTCCATGCTCTC				
ORF125F_step1	AGTGACACCTAACTTGAATTGG	61	60		PEREIRA <i>et al.</i> , 2019
ORF125R_step1	CTTGGCTTCATCCTTATTACACC				
ORF125F_step2	TCCAAAGAAAAACGAAGATGGAAAC	58	60		
ORF125R_step2	TCCTCATATCAACAGTCAAGTCAAT				
14/15-F	CCGCCAGGAGAGATGCTAAG	60	90	JIANG <i>et al.</i> , 2017	
14/15-R	TGGACCAAATGACCTGGACG				
VR14/15-screen-F	GAGATGCGAACCCTAAAAG	50	90	DIEU <i>et al.</i> , 2004	
VR14/15-screen-R	ATGGAGGCGAGACTTGC				
23/24-F	ATTGCTCAAATAAGTTACTACACC	50	75	PEREIRA <i>et al.</i> , 2019, DIEU <i>et al.</i> , 2004	
VR23/24-screen-R	GTAAGTTTATTGCTGAGAAG				
VR23/24-CM-F	CAGATAATGCAAACACGAGACAC	51	120	DIEU <i>et al.</i> , 2011	
VR23/24-TV-R	ATGATTGTATTTCGTCGAAGG				
WTra-F	GTGGATAATATTCGTCTTCAAC	55	120	DIEU <i>et al.</i> , 2004	
WTra-R	CTCAAAGACAACGCATTAG				

\*Th: temperatura de hibridación, \*\*tp: tiempo de polimerización  
 \*Th: hybridization temperatura, \*\*tp: polymerization time

Las secuencias del ADN obtenidas en este trabajo, fueron editadas y alineadas mediante el programa MEGA7 y comparadas mediante el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank. Las variaciones en los ORFs 75, 94 y 125 fueron comparadas con las tres primeras cepas de VSMB secuenciadas (MARKS *et al.*, 2004) mientras que en los ORFs 14/15 y 23/24 se utilizaron 25 cepas adicionales (Tabla 2).

Para el análisis de la variabilidad genética, se consideró la variación del número de unidades repetitivas (URs) que se encuentran presentes en los ORFs 75, 94 y 125, así como el tamaño de las deleciones en los ORFs 14/15 y 23/24 y la región del ADN que codifica para una transposasa presuntiva. En los ORF 94 y 125 se consideraron URs únicos de 54 pb y 69 pb respectivamente, en el ORF 75 se consideró dos tipos de URs, de 45 pb y 57 pb.

DNA sequences obtained were edited and aligned using MEGA7 software, then compared through the BLAST program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) against sequences in the GenBank database. Variations in ORFs 75, 94, and 125 were assessed against the first three sequenced WSSV strains (MARKS *et al.*, 2004), with an additional 25 strains used for ORFs 14/15 and 23/24 (Table 2).

Genetic variability analysis considered changes in the number of repeat units (RUs) in ORFs 75, 94, and 125, along with deletions' sizes in ORFs 14/15 and 23/24 and a putative transposase-encoding DNA region. ORFs 94 and 125 featured single RUs of 54 bp and 69 bp, respectively, while ORF 75 included two RU types: 45 bp and 57 bp.

Tabla 2.- Lista de cepas del VSMB del GenBank utilizadas para el alineamiento de las secuencias obtenidas en el presente trabajo

Table 2. List of WSSV strains from GenBank used for the alignment of the sequences obtained in this work

Cepa de VSMB	Tamaño de Genoma (pb)	Año de colección	País de origen	Accesión del GenBank
TW	307,287	1994	Taiwán	AF440570.1
CN01	309,286	1994	China	KT995472.1
CN_95_DFPE	305,094	1995	China	MN840357.1
TH-96-II	312,000	1996	Tailandia	AY753327.1*
CN	305,119	1996	China	AF332093.3
TH	292,967	1996	Tailandia	AF369029.2
MEX2008	300,087	2008	México	KU216744.2
CN02	294,261	2010	China	KT995470.1
CN03	284,148	2010	China	KT995471.1
K-LV1	295,884	2011	Corea del Sur	JX515788.1
JP	283,858	2011	México	MG432479.1
LC1	278,223	2011	México	MG432481.1
DVI	290,879	2011	México	MG432477.1
LC10	270,274	2011	México	MG432480.1
CN04	281,054	2012	China	KY827813.1
LG	257,675	2012	México	MG432482.1
Ciba 003	276,835	2012	India	MH883319.1
ACF2	289,870	2012	México	MG432475.1
ACF4	277,297	2012	México	MG432476.1
IN AP4RU	280,591	2014	India	MG702567.1
PC	300,223	2015	China	KX686117.1
EC-15098	288,997	2015	Ecuador	MH090824.1
FSL39	292,912	2015	Brasil	MF784752.1
CWG3	281,160	2016	India	MW248108.1
AU	285,973	2016	Australia	MF768985.1
DBA1182	281,813	2018	India	MW248107.1
PG1	285,601	2019	India	MW248106.1
Perú	278,607	2020	Perú	OM350393.2

\* La accesión solo corresponde a una región 7800 pb del genoma de la cepa TH-96-II



### 3. RESULTADOS

#### Genotipos del VSMB detectados en el cultivo de langostinos

En este trabajo se logró detectar ocho genotipos del VSMB (Tabla 3) presentes en los langostinos de cultivo en las provincias de la Región Tumbes. Los genotipos de VSMB detectados mostraron diferentes perfiles de amplificación por la PCR en los ORFs 75, 94 y 125, mientras que en los ORFs 14/15, 23/24 y en el gen transposasa presuntiva, se observó un mismo perfil en todas las muestras. El genotipo VI, se presentó en las 3 provincias muestreadas, los genotipos I, II y III se encontraron en las provincias de Zarumilla y Tumbes, los genotipos IV y VII se detectaron en las provincias de Tumbes y Contralmirante Villar, el genotipo V se detectó en la provincia Tumbes, mientras que el genotipo VIII en la provincia Contralmirante Villar.

#### Variaciones genéticas en el ORF 75

Los productos de la PCR de esta región del ADN del VSMB (Fig. 2) presentaron tres perfiles diferentes. En cuatro muestras, se observó que la PCR amplifica en una misma reacción dos productos de aproximadamente 600 y 700 pb, en 10 muestras se amplificó solo un producto de 492 y, las 75 muestras restantes también amplificaron un único producto de PCR de 537 pb. La diferencia de tamaño en estos productos fue debido a la variación de la cantidad de los URs que los conforman. En el producto de 492 pb se detectó que los URs de 45 y 57 pb se encontraron respectivamente en 5 y 2 repeticiones, mientras que en el producto de 573 pb los URs estuvieron presentes en 6 y 2 repeticiones; tal como se muestra en la Figura 3.

### 3. RESULTS

#### WSSV genotypes detected in shrimp culture

This study unveiled eight genotypes of WSSV (Table 3) thriving among cultured shrimp across the provinces of the Tumbes Region. These WSSV genotypes showcased varying amplification profiles in ORFs 75, 94, and 125 through PCR analysis, while maintaining a consistent profile across all samples for ORFs 14/15, 23/24, and the putative transposase gene. Genotype VI emerged as the ubiquitous variant across all surveyed provinces, whereas genotypes I, II, and III were confined to Zarumilla and Tumbes. Genotypes IV and VII made appearances in Tumbes and Contralmirante Villar, with genotype V surfacing solely in Tumbes and genotype VIII exclusively in Contralmirante Villar.

#### Genetic variations in ORF 75

In the PCR analysis targeting this region of the WSSV DNA (Fig. 2), we observed three distinct patterns. In four samples, the PCR yielded two products, approximately 600 and 700 bp in a single reaction. Conversely, ten samples exhibited amplification of a single 492 bp product, while the remaining 75 samples also displayed a single PCR product, sized at 537 bp. These variations in product size were attributed to differences in the number of RUs present. Notably, the 492 bp product contained RUs of 45 and 57 base pairs, occurring in 5 and 2 repetitions, respectively. In contrast, the 573 bp product harbored these repeats in 6 and 2 repetitions, as depicted in Figure 3.

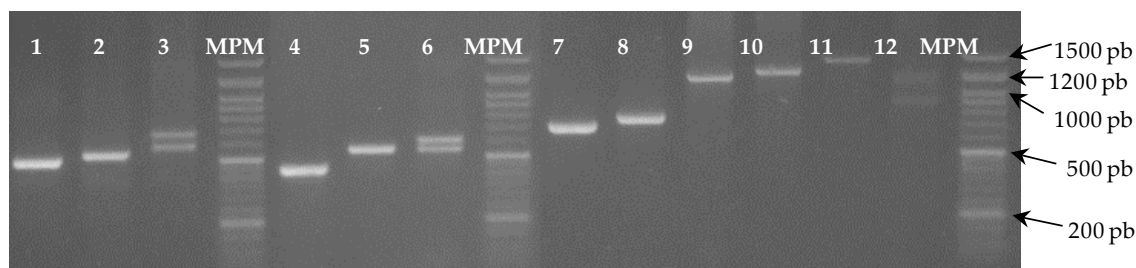


Figura 2.- Productos de PCR amplificados con iniciadores específicos a los ORFs que contienen unidades repetitivas en Tandem. De 1 a 3: Región del ORF 75, de 4 a 6: Región del ORF 94, de 7 a 12: Región del ORF 125  
MPM: Marcador de peso molecular de 50 pb (GeneDireX)

Figure 2. PCR products amplified with primers specific to ORFs containing repetitive units in tandem. From 1 to 3: Region of ORF 75, from 4 to 6: Region of ORF 94, from 7 to 12: Region of ORF 125  
MPM: 50 bp molecular weight marker (GeneDireX)



Tabla 3.- Genotipos de VSMB detectados en muestras de langostinos cultivados en la Región Tumbes

Table 3. WSSV genotypes detected in samples of cultured shrimp from the Tumbes Region

Genotipo Genotype	N° de muestras N° of samples	Fecha de muestreo Sampling date	ORF 75			ORF 94			ORF 125		
			UR de UR de	UR de UR de	UR de UR de	UR de UR de	UR de UR de	UR de UR de	UR de UR de	UR de UR de	UR de UR de
I	4	2014 (n*=1) 2017 (n=2) 2021 (n= 1)	45 pb 45 bp RU	57 pb 57 bp RU	54 pb 54 bp RU	45 pb 45 bp RU	57 pb 57 bp RU	54 pb 54 bp RU	69 pb 69 bp RU	69 pb 69 bp RU	685
II	3	2020 (n=3)	** ND	ND	ND	600 y 700 aprox.	650 y 700 aprox.	650 y 700 aprox.	** ND	** ND	900 y 1200 aprox.
III	10	2016 (n=7) 2017 (n=2) 2020 (n=1)	5	2	3	492	545	545	3	3	685
IV	14	2021 (n=14)	6	2	1	537	437	437	3	3	685
V	4	2019 (n=1) 2020 (n=3)	6	2	1	537	437	437	4	4	754
VI	39	2020 (n =19) 2021 (n=20)	6	2	1	537	437	437	7	7	962
VII	6	2020 (n=1) 2021 (n=5)	6	2	1	537	437	437	9	9	1100
VIII	9	2020 (n=9)	6	2	1	537	437	437	13	13	1376
TH***		1996	12	3	6	865	707	707	4	4	754
CN***		1996	15	4	12	1057	1031	1031	6	6	892
TW ***		1994	21	5	6	1384	707	707	6	6	892

\* n: número de muestras / number of samples

\*\*ND: No determinado, debido a la amplificación de 2 productos en una misma reacción de PCR / Not determined, due to the amplification of 2 products in the same PCR reaction.

\*\*\* Para el análisis de los ORFs 75, 94 y 125 en las secuencias de referencia se utilizaron las secuencias actualmente disponibles en el Genbank. El número de URs del ORF 75 se realizó con base en los URs de 45 y 57 pb / For the analysis of ORFs 75, 94, and 125 in the reference sequences, the sequences currently available in Genbank were used. The number of RUs of ORF 75 was performed based on the RUs of 45 and 57 bp

**Composición de los URs de 45 y 57 pb en el ORF 75**  
**Composition of the 45 and 57 bp RUs in ORF 75**

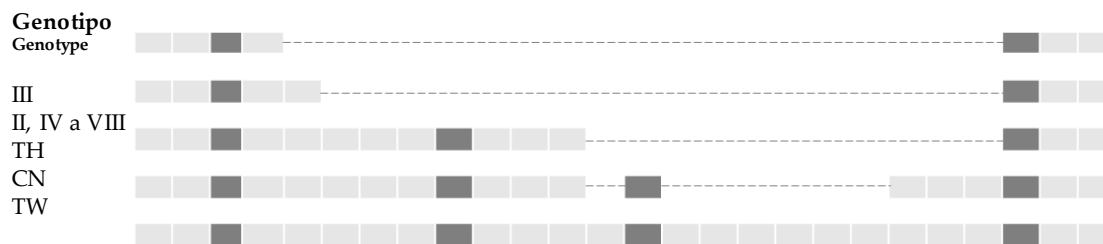


Figura 3.- Representación gráfica de la composición de los URs de 45 y 57 pb en el ORF 75 de las cepas de VSMB aisladas en este trabajo (genotipo II a VIII) y de las cepas de referencia (TH, CN y TW)

■: Unidad de repetición de 45 pb, ■: Unidad de repetición de 57 pb, las líneas discontinuas indican las secuencias ausentes

Figure 3. Graphical representation of the composition of the 45 and 57 bp RUs in ORF 75 of the WSSV strains isolated in this work (genotype II to VIII) and of the reference strains (TH, CN, and TW)

■: 45 bp repeat unit, ■: 57 bp repeat unit, dashed lines indicate missing sequences

**Variaciones genéticas en el ORF 94**

En esta región también se identificaron tres perfiles diferentes (Fig. 2) y estuvieron constituidos por el mismo tipo y cantidad de muestras que las identificadas con el ORF 75. En cuatro muestras, se observó una amplificación de un tipo de perfil formado por dos productos de aproximadamente 650 y 700 pb en una misma reacción, los dos perfiles restantes fueron detectados en 10 y 7 muestras que amplificaron productos de 437 y 545 pb, respectivamente. La diferencia de tamaño en estos productos fue debido a la variación de la cantidad de los URs que los conforman. En el producto de 437 pb se detectó que los URs de 54 pb se encontraron solo una vez, sin embargo, en el producto de 545 pb estuvo presente tres veces.

**Variaciones genéticas en el ORF 125**

Esta región de ADN del VSMB, fue la que presentó mayor diversidad, encontrándose hasta seis perfiles en el total de muestras analizadas (Fig. 2). En tres muestras, la PCR amplificó dos productos de aproximadamente 900 y 1200 pb en una misma reacción. Los cinco perfiles restantes correspondieron a un solo producto de PCR de 685 pb amplificado en 28 muestras, 754 pb en 4 muestras, 962 pb en 39 muestras, 1100 pb en 6 muestras y 1376 pb en 9 muestras. Al igual que en los ORFs 75 y 94 la variación de tamaño se relacionó con el número de URs de 69 pb presentes en cada producto amplificado.

**Genetic variations in ORF 94**

In this region, three distinct profiles were also identified (Fig. 2), with the same types and quantities of samples as those identified in the ORF 75 analysis. In four samples, a profile showing amplification of two products, approximately 650 and 700 bp, in a single reaction was noted. The remaining two profiles were detected in ten and seven samples, respectively, producing products of 437 and 545 bp. The variation in product size was attributed to differences in the number of RUs. Specifically, in the 437 bp product, the 54 bp RUs were found only once, while in the 545 bp product, they were present three times.

**Genetic variations in ORF 125**

In this particular region of the WSSV DNA, the highest degree of diversity was observed, with as many as six distinct profiles identified across all samples analyzed (Fig. 2). Notably, in three samples, PCR amplification yielded two products simultaneously, measuring approximately 900 and 1200 bp in a single reaction. Conversely, the remaining five profiles corresponded to single PCR products: 685 bp in 28 samples, 754 bp in 4 samples, 962 bp in 39 samples, 1100 bp in 6 samples, and 1376 bp in 9 samples. Consistent with our findings in ORFs 75 and 94, the variations in size were attributed to the differing numbers of 69 bp RUs present within each amplified product.

### Variaciones genéticas en la región codificante a un gen transposasa presuntiva

La PCR con los iniciadores que flanquean al gen transposasa (Tabla 1) amplificaron una región de 151 pb en todas las muestras de VSMB analizadas durante este trabajo. El alineamiento en la base de datos del GenBank mediante el programa BLAST, produjo en la secuencia de 151 pb, una similitud de 100% en 32 secuencias del VSMB y adicionalmente también se logró con una secuencia del virus de *Procambarus clarkii*. En cambio, la secuencia completa de 1489 pb, que fue obtenida de la cepa TW (Accesión: AF440570), no logró alinearse con otras cepas del VSMB del GenBank, pero si en otros organismos como bacterias y vertebrados con una similitud que varía entre 89 y 99%.

### Variaciones genéticas en el ORF14/15

La PCR con los iniciadores VR14/15-screen-F/R dirigidos al ORF 14/15, amplificaron un producto de 1431 pb en todas las muestras analizadas. Mediante análisis con el BLAST, se detectó que este fragmento de ADN está presente también en 4 cepas del VSMB, estas cepas fueron aisladas en China (Accesión: KT995470), Taiwán (Accesión: AF440570), Ecuador (Accesión: MH090824, RESTREPO *et al.*, 2018) y Perú (Accesión: OM350393) con una similitud mayor a 99,7%. El alineamiento en MEGA7 mostró que las cepas aisladas en este trabajo presentan una delección de 5138 pb (Fig. 4) en comparación con la cepa TH-96-II (Accesión: AY753327.1).

### Variaciones genéticas en el ORF 23/24

La PCR con los iniciadores VR23/24-CM-F /TV-R dirigidos al ORF 23/24, amplificaron un producto de 988 pb en todas las muestras analizadas. Mediante análisis en BLAST se detectó que este fragmento de ADN está presente también en ocho cepas del VSMB, seis de estas cepas fueron aisladas en México (PARRILLA-TAYLOR *et al.*, 2018), una cepa en Ecuador (Accesión: MH090824, RESTREPO *et al.*, 2018) y una cepa en Perú (Accesión: OM350393). El alineamiento en MEGA7 mostró que las cepas aisladas en este trabajo presentan una delección de 11110 pb (Fig. 5), en comparación con la cepa de Taiwán (Accesión: AF440570).

### Genetic variations in the coding region of a putative transposase gene

The PCR conducted using primers flanking the transposase gene (Table 1) yielded a 151 bp fragment across all the WSSV samples analyzed in this study. Sequence alignment against the GenBank database using the BLAST program revealed a 100% match for the 151 bp sequence with 32 WSSV sequences, along with a match to a sequence from the *Procambarus clarkii* virus. However, the complete 1489 bp sequence obtained from the TW strain (Accession: AF440570) failed to align with other WSSV strains in the GenBank database. Interestingly, it did align with sequences from bacteria and vertebrates, exhibiting similarities ranging from 89% to 99%.

### Genetic variations in ORF14/15

The PCR using VR14/15-Screen-F/R primers targeting ORF 14/15 yielded a 1431 bp product across all samples tested. Upon BLAST analysis, it was revealed that this DNA segment is also found in 4 distinct WSSV strains, isolated in China (Accession: KT995470), Taiwan (Accession: AF440570), Ecuador (Accession: MH090824, RESTREPO *et al.*, 2018), and Peru (Accession: OM350393) exhibiting a similarity exceeding 99.7%. Alignment in MEGA7 unveiled a 5138 bp deletion (Fig. 4) in the strains obtained in this study compared to the TH-96-II strain (Accession: AY753327.1).

### Genetic variations in ORF 23/24

The PCR using the VR23/24-CM-F/TV-R primers targeting ORF 23/24 amplified a 988 bp product in all analyzed samples. BLAST analysis revealed the presence of this DNA fragment in eight WSSV strains: six from Mexico (PARRILLA-TAYLOR *et al.*, 2018), one from Ecuador (Accession: MH090824, RESTREPO *et al.*, 2018), and one from Peru (Accession: OM350393). Alignment in MEGA7 indicated a 11110 bp deletion (Fig. 5), in the strains isolated in this study, as compared to the strain from Taiwan (Accession: AF440570).

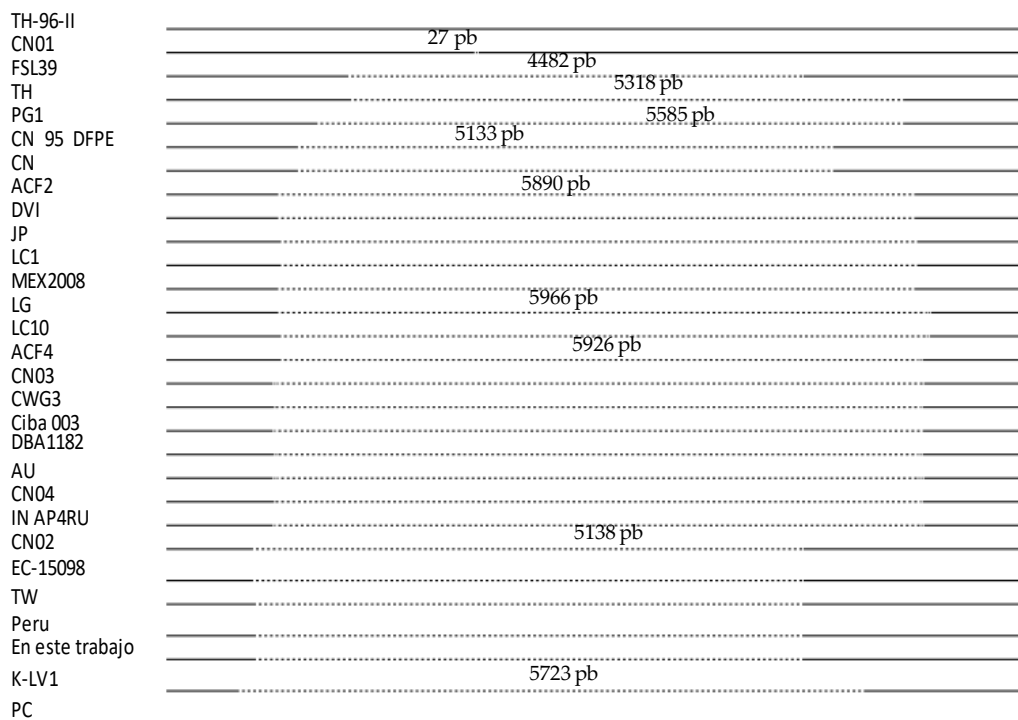


Figura 4.- Esquema comparativo de la región ORF14/15 de las cepas de VSMB aisladas en este trabajo y en los genomas del VSMB reportadas en el GenBank. Líneas punteadas indican la región de ADN ausente en cada cepa, los números describen la cantidad de pares de bases (pb) ausentes

Figure 4. Comparative schematic of the ORF14/15 region of the WSSV strains isolated in this work and the WSSV genomes reported in GenBank. Dotted lines indicate the region of DNA absent in each strain; numbers describe the number of base pairs (bp) absent

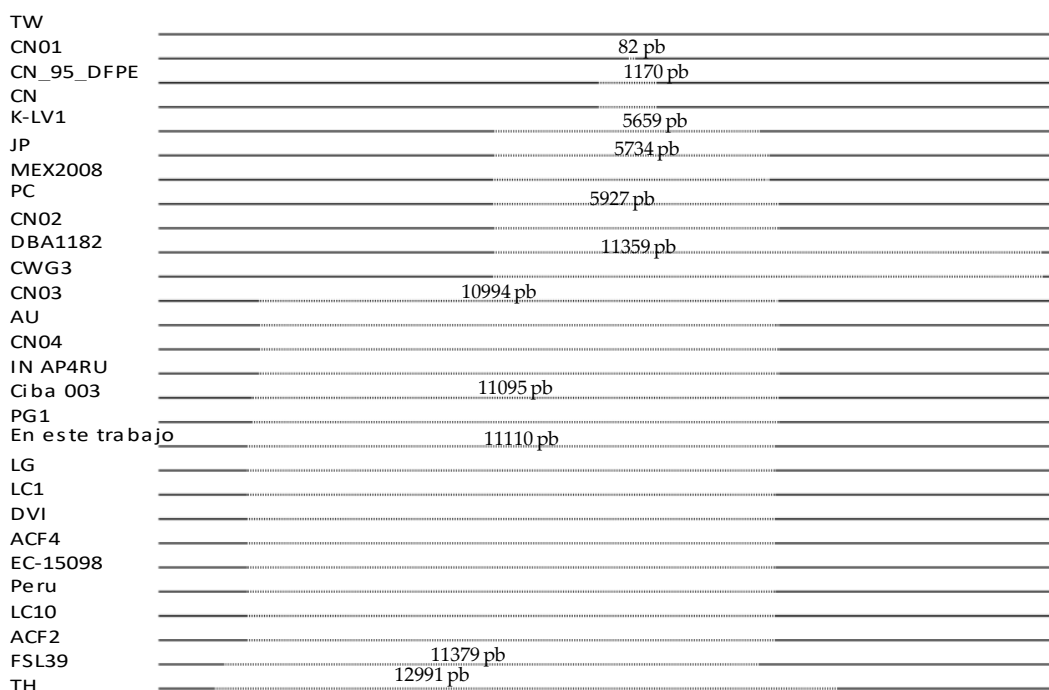


Figura 5.- Esquema comparativo de la región ORF23/24 de las cepas de VSMB aisladas en este trabajo y en los genomas del VSMB reportadas en el GenBank. Líneas punteadas indican la región de ADN ausente en cada cepa, los números describen la cantidad de pares de bases (pb) ausentes

Figure 5. Comparative schematic of the ORF23/24 region of the WSSV strains isolated in this work and the WSSV genomes reported in GenBank. Dotted lines indicate the region of DNA absent in each strain; numbers describe the number of base pairs (bp) absent

#### 4. DISCUSIÓN

Las regiones variables del ADN del VSMB, han permitido tipificar el genotipo de las cepas del VSMB en diferentes países donde se realiza el cultivo de langostinos peneidos. Haciendo uso de esta herramienta, el presente trabajo logró detectar ocho genotipos del VSMB en muestras de langostinos cultivados en la costa norte de Perú (Región Tumbes). Estos genotipos han sido clasificados en función del análisis de los VNTRs en los ORFs 75, 94 y 125, debido a que el gen transposasa presuntiva y los ORFs 14/15 y 23/24 no presentaron variabilidad en sus secuencias.

En comparación con las cepas del VSMB aisladas en otros países, los ocho genotipos detectados presentan un número intermedio de URs en los ORFs 75 y 94. La cantidad de URs es menor que las cepas de referencia de Taiwán (WANG *et al.*, 1995), China y Tailandia (Tabla 3), de igual forma, también es menor que cuatro cepas de Brasil (MULLER *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2020) y seis cepas de México (RAMOS-PAREDES *et al.*, 2017). En comparación con cinco cepas aisladas en Vietnam (DIEU *et al.*, 2004), la cantidad de URs detectados en este trabajo es similar en el ORF 75 pero inferior al número de URs del ORF 94. En cambio, las muestras de este trabajo presentan mayor cantidad de URs en los ORFs 75 y 94 que las cepas de VSMB aisladas en Madagascar, Mozambique y Arabia Saudita (TANG *et al.*, 2013).

A nivel del ORF 125, las cepas de los países anteriormente mencionados presentan en promedio de cinco a nueve URs, en cambio en este trabajo se ha detectado genotipos con un menor (2, 3 y 4) y mayor (13) número de URs, sugiriendo que las cepas de VSMB de esta zona geográfica de Perú estarían presentando mayor diversificación en esta región del ADN.

El tamaño del gen transposasa presuntiva identificado en este estudio, es igual a la mayoría de las cepas de VSMB reportadas en el GenBank, con la única excepción en la cepa aislada en Taiwán en la que tiene 1489 pb (WANG *et al.*, 1995), mientras que en el resto de cepas de VSMB secuenciadas es de 151 pb. Por el contrario, el 90% de la secuencia de 1489 pb tiene una elevada similitud con regiones de ADN de diferentes

#### 4. DISCUSSION

The variability within the DNA regions of WSSV has proven instrumental in delineating the genotypic landscape of WSSV strains across diverse regions where penaeid shrimp aquaculture thrives. Leveraging this analytical framework, our investigation unveiled eight distinct WSSV genotypes prevalent in shrimp samples cultured along the northern coast of Peru, specifically within the Tumbes Region. These genotypes were stratified based on the scrutiny of VNTRs within the ORFs 75, 94, and 125, as other genomic segments including the putative transposase gene and ORFs 14/15 and 23/24 remained invariant in their sequences.

Comparative analysis with WSSV strains sourced from various global locales revealed that the eight identified genotypes exhibited an intermediary count of RUs within the ORFs 75 and 94. Notably, this count was lower than that observed in reference strains from Taiwan (WANG *et al.*, 1995), China, and Thailand (Table 3). Similarly, it is also lower than four strains from Brazil (MULLER *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2020) and six strains from Mexico (RAMOS-PAREDES *et al.*, 2017). Conversely, it paralleled the RU count in ORF 75 but lagged in ORF 94 compared to five strains isolated in Vietnam (DIEU *et al.*, 2004). Intriguingly, our findings unveiled a higher RU count within ORFs 75 and 94 in our samples compared to WSSV strains hailing from Madagascar, Mozambique, and Saudi Arabia (TANG *et al.*, 2013).

At the ORF 125 level, strains from the aforementioned countries typically show an average of five to nine RUs. However, in this study, genotypes with both fewer (2, 3, and 4) and more (13) RUs have been identified, suggesting a greater diversification of WSSV strains from this Peruvian geographic region in this DNA region.

The size of the putative transposase gene identified in this study aligns with that of most WSSV strains documented in GenBank, except for the strain isolated in Taiwan, which measures 1489 bp (WANG *et al.*, 1995). In contrast, the rest of the sequenced WSSV strains have a size of 151 bp. However, 90% of the 1489 bp sequence shares a high similarity with DNA regions of

organismos, lo que originaría el riesgo de producir falsos positivos a VSMB. Considerando, la ausencia de variaciones, así como, el riesgo de producir falsos positivos, no sería recomendable utilizar esta región de ADN para estudios de diversidad genética del VSMB.

La región variable del ORF 14/15 del genoma de VSMB, corresponde a una secuencia aproximada de 5 kb que ha sido descrita completamente en las cepas TH-96-II, (MARKS *et al.*, 2005) y CN01 (LI *et al.*, 2016) aisladas en Tailandia y China, respectivamente. Además, en el GenBank se reporta también dos cepas aisladas en Egipto y Estados Unidos (Accesión: KR083844.1 y KF771904.1) que tendrían el 98% de esta secuencia. En las muestras analizadas en este trabajo, la región de ADN ausente es de 5138 pb, siendo similar a 4 cepas que fueron aisladas en Taiwán (WANG *et al.*, 1995), China (LI *et al.*, 2016), Ecuador (RESTREPO *et al.*, 2018) y también a una cepa aislada en Perú (Accesión: OM350393.2) por el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES).

De acuerdo al análisis filogenético realizado por ZENG (2021) con base a las deleciones en el ORF 14/15, las cepas aisladas en este trabajo se ubicarían en el clado I y tendrían como ancestro originario a la cepa TH-96-II. La región ausente del ADN del VSMB en las cepas aisladas, implicaría la pérdida de los ORFs I, II, III y IV, que no tienen una función conocida de acuerdo con la anotación del genoma de la cepa TH-96-II realizada por MARKS *et al.* (2005).

En el ORF 23/24, las muestras analizadas en este trabajo, presentaron una deleción de 11110 pb en comparación con la cepa de Taiwán (WANG *et al.*, 1995) que se encuentra en el GenBank. Además de esta cepa, MARKS *et al.* (2005) menciona que la cepa TH 96 II, también presenta la región ORF 23/24 completa, sin embargo, esta secuencia no está disponible en el GenBank para su verificación. La deleción en el ORF 23/24 que se ha detectado en este trabajo, también se encuentra en seis cepas aisladas en México (PARRILLA-TAYLOR *et al.*, 2018), una cepa aislada en Ecuador (RESTREPO *et al.*, 2018) y una cepa aislada por SANIPES en Perú (Accesión: OM350393.2).

various organisms, posing a risk of yielding false positives for WSSV. Considering the absence of variations and the risk of false positives, it would not be advisable to utilize this DNA region for studies on the genetic diversity of WSSV.

The variable region of the ORF 14/15 in the WSSV genome spans approximately 5 kb, extensively characterized in strains TH-96-II, (MARKS *et al.*, 2005) and CN01 (LI *et al.*, 2016) isolated in Thailand and China, respectively. Notably, GenBank lists two additional strains isolated in Egypt and the United States (Accession: KR083844.1 and KF771904.1) exhibiting a 98% sequence homology to this region. In our analysis, the absent DNA segment measured 5138 pb, mirroring findings in four strains from Taiwan (WANG *et al.*, 1995), China (LI *et al.*, 2016), Ecuador (RESTREPO *et al.*, 2018), and a strain from Peru (Accession: OM350393.2) as identified by the Organismo Nacional de Sanidad Pesquera – Sanipes.

In accordance with the phylogenetic analysis conducted by ZENG (2021) based on deletions observed in the ORF 14/15, the strains isolated in this study appear to align within clade I, with the strain TH-96-II identified as their likely ancestral source. The absence of a specific DNA region in the WSSV strains isolated in this research suggests the loss of ORFs I, II, III, and IV. Interestingly, these regions lack defined functions according to the genome annotation of strain TH-96-II as outlined by MARKS *et al.* (2005).

Regarding the ORF 23/24, the samples examined in this study exhibit a substantial deletion of 11110 bp in contrast to the reference strain from Taiwan (WANG *et al.*, 1995) available in the GenBank database. Notably, although strain TH 96 II is noted by MARKS *et al.* (2005) to possess the complete ORF 23/24 region, unfortunately, this specific sequence is not accessible in GenBank for validation purposes. Additionally, the observed deletion in the ORF 23/24 region aligns with findings from six strains isolated in Mexico (PARRILLA-TAYLOR *et al.*, 2018), one strain isolated in Ecuador (RESTREPO *et al.*, 2018), and one strain isolated by SANIPES in Peru (Accession: OM350393.2).

Los ocho genotipos del VSMB fueron detectados en zona costera de aproximadamente 71 km de longitud (Fig. 1), estos resultados confirmarían la capacidad de los ORFs 75, 94 y 125 para genotipificar al VSMB en una pequeña escala espacial tal como lo propusieron DIEU *et al.* (2010). En cambio, en los ORFs 14/15 y 23/24, las variaciones genotípicas se muestran más estables a esta escala espacial, incluso siendo idéntico a las muestras reportadas por RESTREPO *et al.* (2018) que fueron aisladas en una zona relativamente cerca (Ecuador) al realizado en el presente estudio. La similitud encontrada entre las cepas de Perú y Ecuador, sugeriría que tienen un ancestro común y que estarían relacionadas con las cepas de VSMB presentes en México, dado que seis cepas aisladas en este país (PARRILLA-TAYLOR *et al.*, 2018) comparten un patrón idéntico en el ORF 23/24 (Fig. 5) y muy similar en el ORF 14/15 (Fig. 4).

Este trabajo ha permitido identificar la existencia de diferentes genotipos de VSMB presentes en los langostinos de cultivo de Tumbes, representando una línea base tanto, para futuras investigaciones epidemiológicas detalladas de las vías de transmisión del virus como, para la diferenciación en sus niveles de virulencia, tal como se ha demostrado en diferentes genotipos de VSMB (LI *et al.*, 2016; RAMOS-PAREDES *et al.*, 2017; MIN *et al.*, 2023).

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección General de Investigaciones en Acuicultura del IMARPE por el financiamiento de este proyecto mediante el Presupuesto por Resultados (PpR), al Blgo. Percy Montero por su apoyo en la edición de figuras y a las empresas langostineras de la Región Tumbes que permitieron la obtención de muestras de langostinos.

The detection of eight WSSV genotypes along a coastal stretch of approximately 71 km (Fig. 1) underscores the efficacy of ORFs 75, 94, and 125 in genotyping WSSV within a localized spatial context, echoing the assertions made by DIEU *et al.* (2010). In contrast, genotypic variations within ORFs 14/15 and 23/24 appear more stable at this scale, mirroring samples reported by RESTREPO *et al.* (2018) in Ecuador, suggesting a shared ancestry. The observed similarity between strains from Peru and Ecuador hints at a common lineage, potentially linking them to VSMB strains in Mexico, where six isolated strains (PARRILLA-TAYLOR *et al.*, 2018) exhibit identical patterns in ORF 23/24 (Fig. 5) and closely resemble those in ORF 14/15 (Fig. 4).

This study not only identifies diverse WSSV genotypes in Tumbes' cultured shrimp but also establishes a foundation for future in-depth epidemiological inquiries into virus transmission routes and the differentiation of virulence levels across various WSSV genotypes (LI *et al.*, 2016; RAMOS-PAREDES *et al.*, 2017; MIN *et al.*, 2023).

### Acknowledgments

The authors extend their gratitude to the IMARPE's Directorate-General for Aquaculture Research for the financial support provided through the Results-Based Budgeting (RBB) scheme. Special thanks are also due to Biol. Percy Montero for his invaluable assistance in figure editing. Additionally, we acknowledge the cooperation of shrimp farming companies in the Tumbes Region, whose collaboration facilitated the acquisition of shrimp samples for this study.



## 5. REFERENCIAS

- ALFARO R., GUEVARA M. & GONZALES I. (2010). Prevalencia y distribución de los principales agentes etiológicos que afectan a los langostinos silvestres en Tumbes, Perú. *Revista peruana de biología*, 17(3), 359-364. [a11v17n3.pdf \(scielo.org.pe\)](https://doi.org/10.1111/17n3.pdf)
- CHOU, H., HUANG, C., WANG, C., CHIANG, H. & LO, C. (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Organ.*, 23(3), 165-173. <https://doi.org/10.3354/DAO023165>
- DIEU, B., VLAK, J. & ZWART, M. (2011). Effects of extensive and intensive shrimp farming on the genetic composition of white spot syndrome virus populations, pp. 145-156. In: M. Bondad-Reantaso, J. Jones, F. Corsin y T. Aoki (Eds.). *Diseases in Asian Aquaculture VII* (pp. 145-156). Asian Fisheries Society, Fish Health Section, Selangor.
- DIEU, B., MARKS H., ZWART M. & VLAK J. (2010). Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of virus spread at intermediate spatiotemporal scales. *Journal of General Virology*, 91(5), 1164-78. <https://doi.org/10.1099/vir.0.018028-0>
- DIEU, B. T. M., MARKS, H., SIEBENGA, J., GOLDBACH, R., ZUIDEMA, D., DUONG, T. & VLAK, J. (2004). Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. *Journal of General Virology*, 85(12), 3607-18. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80344-0>
- FLEGEL, T. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 13, 433-442. <https://doi.org/10.1023/A:1018580301578>
- HOSSAIN, S., CHAKRABORTY, A., JOSEPH, B., OTTA, S., KARUNASAGAR, I. & KARUNASAGAR, I. (2001). Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 198(1-2), 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00571](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00571)
- JIANG, L., XIAO J., LIU L., PAN Y., YAN S. & WANG Y. (2017). Characterization and prevalence of a novel white spot syndrome viral genotype in naturally infected wild crayfish, *Procambarus clarkii*, in Shanghai, China. *Virus Disease*, 28(3), 250-261. <https://doi.org/10.1007/s13337-017-0394-4>
- LI, F., GAO, M., XU, L. & YANG, F. (2016). Comparative genomic analysis of three white spot syndrome virus isolates of different virulence. *Virus Genes*, 53, 249-258. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1421-z>
- LO, C. F., LEU, J. H., HO, C. H., CHEN, C. H. & PENG, S. E. CHEN, Y. T., CHOU, C. M., YEH, P. Y., HUANG, C. J., CHOU, H. Y., WANG, C. H. & KOU, G. H. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25(1-2), 133-141. <https://doi.org/10.3354/dao025133>
- LO, C., HO, C., PENG, S., CHEN, C., HSU, H., CHIU, Y., CHANG, C., LIU, K., SU, M., WANG, C. & KOU, G. (1996a). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27, 215-225. <https://doi.org/10.3354/DAO027215>
- MARKS, H., GOLDBACH, R., VLAK, J. & VAN HULTEN, M. (2004). Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. *Archives Virology*, 149(4), 673-697. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0248-9>
- MARKS, H., VAN DUIJSE, J., ZUIDEMA, D., VAN HULTEN, M. & VLAK, J. (2005). Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp. *Virus Research*, 110(1-2), 9-20. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.01.002>
- MAYO, M. (2002). A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives Virology*, 147(8), 1655-1663. <https://doi.org/10.1007/s007050200039>
- MIN, J., JEONG, H. & KIM, K. (2023). Identification of Various indel-II variants of the white spot syndrome virus isolated from frozen shrimp and bivalves obtained in the Korean commercial market. *Animals*, 13(3348), 1-14. <https://doi.org/10.3390/ani13213348>
- MULLER, I., ANDRADE, T., TANG-NELSON, K., MARQUES, M. & LIGHTNER, D. (2010). Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. *Diseases of Aquatic Organisms*, 88(2), 91-98. <https://doi.org/10.3354/dao02142>
- ONIHARY, A., RAZANAJATOVO, I., RABETAFIKA, L., BASTARAUD, A. HERAUD, J. & RASOLOFO, V. (2021). Genotype Diversity and Spread of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Madagascar (2012-2016). *Viruses*, 13, 12-13. <https://doi.org/10.3390/v13091713>
- PARRILLA-TAYLOR, D., VIBANCO-PÉREZ, N., DURÁN-AVELAR, M., GOMEZ-GIL, B., LLERA-HERRERA, R. & VÁZQUEZ-JUAREZ, R. (2018). Molecular variability and genetic structure of white spot syndrome virus strains from northwest Mexico based on the analysis of genomes. *FEMS Microbiology Letters*, 365(20), 1-9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny216>
- PEREIRA, J., DE SOUZA, E., CANDIDO, J., DANTAS, M., NUNES, A., RIBEIRO, K., TEIXEIRA, D. & LANZA D. (2019). Alternative PCR primers for genotyping of Brazilian WSSV isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 162, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.02.003>
- PRADEEP, B., SHEKAR, M., GUDKOV, N., KARUNASAGAR, I. & KARUNASAGAR, I. (2008). Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. *Diseases of Aquatic Organisms*, 78(3), 189-198. <https://doi.org/10.3354/dao01878>
- RAMÍREZ, B., GUEVARA, M., ALFARO, R., MONTOYA, V., MAL, H., SERNA, M., DHAR, A. & ARANGUREN, L. (2020). A cross-sectional study of shrimp pathogens in wild shrimp, *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Tumbes, Peru. *Aquaculture Research*, 52(3), 1118-26. <https://doi.org/10.1111/are.14969>
- RAMOS-PAREDES, J., GRIJALVA-CHON, J. & IBARRA-GAMEZ, J. (2017). Virulence and genotypes of white spot syndrome virus (WSSV) infecting Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in north-western Mexico. *Journal of Fish Diseases*, 40(3), 425-35. <https://doi.org/10.1111/jfd.12598>
- RESTREPO, L., REYES, A., BAJAÑA, L., BETANCOURT, I. & BAYOT, B. (2018). Draft Genome Sequence of a White Spot Syndrome Virus Isolate Obtained in Ecuador. *Genome Announcements*, 6(26), 1-2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00605-18>

- RODRIGUES, E., FALCAO, R., GUIMARAES, G., VINICIOS, B. & MIYOSHI, S. (2020). Identification and genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) isolated from *Litopenaeus vannamei* in the state Rio Grande do Norte. *Brazilian Journal of Development*, 6(7), 45379-45385. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-236>
- SHEKAR, M., KARUNASAGAR, I. & KARUNASAGAR, I. (2005). A computer based identification of variable number tandem repeats in white spot syndrome virus genomes. *Current Science*, 89(5), 882-887. <https://www.jstor.org/stable/24111037>
- TANG, K., GROUMELLE, M. & LIGHTNER, D. (2013). Novel, closely related, White spot syndrome virus (WSSV) genotypes from Madagascar, Mozambique and the Kingdom of Saudi Arabia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 106(1), 1-6. <https://doi.org/10.3354/dao02645>
- VAN HULTEN, M., WITTEVELDT, J., PETERS, S., KLOOSTERBOER, N., TARCHINI, R., FIERS, M., SANDBRINK, H., LANKHORST, R. & VLAK, J. (2001). The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 286, 7-22. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1002>
- VAZQUEZ-BOUCARD C., ALVAREZ-RUIZ P., ESCOBEDO-FREGOSO C., ANGUIANO-VEGA G., DURAN-AVELAR M., SERRANO V. & ESCOBEDO-BONILLA C. (2010). Detection of white spot syndrome virus (WSSV) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Short Communication, *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(3), 245-247. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.04.00>
- VIJAYAN K. K., STALIN RAJ V., BALASUBRAMANIAN C. P., ALAVANDI S. V., THILLAI SEKHAH V. & SANTIAGO T. C. (2005). Polychaete worms a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 63(2-3), 107-111. <https://doi.org/10.3354/dao063107>
- WANG, C., LO, C., LEU, J., CHOU, C., YEH, P., CHOU, H., TUNG, M., CHANG, C., SU, M. & KOU, G. (1995). Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23, 239-242. <https://doi.org/10.3354/dao023239>
- WANG, Y., LO, C., CHANG, P. & KOU, G. (1998). Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture*, 164(1-4), 221-231. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00188-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00188-4)
- YANG, F., HE, J., LIN, X., LI, Q., PAN, D., ZHANG, X. & XU, X. (2001). Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *Journal of Virology*, 75(23), 11811-11820. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.23.11811-11820.200>
- ZENG, Y. (2021). Molecular epidemiology of white spot syndrome virus in the world. *Aquaculture*, 537, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736509>