

UNIVERSIDAD NACIONAL  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
POSTGRADO EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



**Presencia y factores de riesgo en Whispovirus, *Vibrio parahaemolyticus*<sub>(AHPND)</sub> y *Enterocytozoon hepatopenaei* en camarones de cultivo en Costa Rica**

**SUSTENTANTE**

**NELSON PEÑA NAVARRO**

**“CAMPUS BENJAMÍN NUÑEZ”**

**HEREDIA**

**FEBRERO, 2019**

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar por el grado de *Magister Scientiae***

**Presencia y factores de riesgo en Whispovirus, *Vibrio parahaemolyticus*<sub>(AHPND)</sub> y *Enterocytozoon hepatopenaei* en camarones de cultivo en Costa Rica**

**SUSTENTANTE**

**NELSON PEÑA NAVARRO**

**Tesis presentada para aspirar al grado académico de *Magister Scientiae* en  
Enfermedades Tropicales**

Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Postgrado  
de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

## MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

---

**Caterina Guzmán Verri, Ph.D.**  
**Representante del Consejo Central del Posgrado**

---

**Sandra Estrada, M.Sc.**  
**Coordinadora PCVET**

---

**Gaby Dolz, Ph.D.**  
**Tutora**

---

**Ingo S. Wehrtmann, Dr. rer.nat.**  
**Lector**

---

**Ruth Castro Vásquez, M.Sc.**  
**Lectora**

---

**Nelson Peña Navarro**  
**Sustentante**

## DEDICATORIA

A mis padres:

Gerardo Peña Soto y Marlene Navarro Murillo, por brindarme los mejores años de su vida y apoyarme en mi educación a pesar de los momentos difíciles y por estar pendientes siempre de mí.

A mi esposa:

Nancy León Ulate, por la paciencia que ha tenido y el apoyo que me ha brindado para salir adelante en todo momento, por sus consejos y recomendaciones. Por ser la tercera lectora de este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la fortaleza, paciencia y sabiduría para sacar adelante este proyecto.

A mis hermanos porque siempre me han demostrado su apoyo en mis diferentes proyectos.

A los padres de Nancy, por apoyarme en este proceso y facilitarme su casa cuando necesitaba cursar las lecciones de la maestría.

Al Fondo Institucional de Desarrollo Académico (FIDA), por financiar este proyecto, lo cual fue fundamental para lograr los resultados obtenidos.

A la Universidad Técnica Nacional y a los miembros que la conforman, por brindarme el permiso para cursar esta maestría y apoyarme en el proceso de ejecución de la misma.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología y Telecomunicaciones (MICITT), por la beca brindada y el apoyo para culminar con éxito el programa de maestría.

A la Dra. Gaby Dolz, por su compromiso en este proyecto, por lo consejos y seguimiento brindado, por la confianza depositada y por creer en este proyecto tan importante para el desarrollo de acuicultura costarricense.

A la MSc. Ruth Castro, por ser una educadora dedicada, por su confianza y compromiso, por demostrar calidad profesional y humana.

Al Dr. Ingo Wehrtmann, por nuevamente comprometerse en un proyecto conmigo, por el apoyo en la lectura de este documento y las recomendaciones brindadas.

Al Dr. Bernardo Vargas Leitón, por la ayuda para desarrollar el análisis estadístico de este estudio

A la Dra. Carolina Elizondo Ovaras, del Programa Nacional de Salud Acuícola del SENASA, por el apoyo recibido.

Al equipo de trabajo del LARED, de la Universidad Técnica Nacional por la ayuda en los muestreos realizados en algunas de las fincas utilizadas en este proyecto.

Al equipo de docentes de la maestría, que en su mayoría fueron de excelente calidad, anuentes a colaborar y apoyar el proceso de aprendizaje.

A todos los productores de camarón que participaron en este proyecto, que confiaron en mí y en la posibilidad de estudiar sobre las enfermedades que los afectan, que me recibieron como un amigo y donaron sus animales.

A mis compañeros de la dirección de investigación de la UTN, Ing. Guillermo Hurtado y MSc. Juan Barquero por la ayuda que me han brindado, por apoyar este proyecto y por ser promotores del desarrollo de la acuicultura de este país.

A mis buenos amigos de la maestría, Eunice Víquez, Josué Colindres, Víctor Álvarez, Ramsés Alfaro, Luis Choc y especialmente a Alexander Varela, compañero de luchas en el diagnóstico de enfermedades de camarón en Costa Rica.

## Índice General

Miembros del Tribunal Examinador .....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Índice de cuadros .....	ix
Índice de figuras .....	x
Resumen general .....	xii
Introducción general.....	1
Necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) .....	2
Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) .....	5
Microsporidiosis hepatopancreática (MHP) .....	7
Artículo 1 .....	10
Detección molecular y factores de riesgo asociados a la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) en <i>penaeus vannamei</i> cultivado en costa rica10	
Resumen .....	10
Abstract .....	12
1. Introducción .....	14
2. Materiales y Métodos .....	17
2.1. Área de estudio, tipo y diseño .....	17
2.2. Recolección de información.....	17
2.3. Toma de muestras de agua y camarón .....	17
2.4. Toma de parámetros físico-químicos del agua y coordenadas geográficas .....	18
2.5. Técnicas moleculares .....	18
2.6. Análisis estadístico.....	20
3. Resultados .....	30
4. Discusión.....	42
5. Conclusiones .....	48
6. Recomendaciones .....	49
7. Referencias bibliográficas .....	50

Artículo 2 .....	58
Virus del síndrome de la mancha blanca y <i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> en cultivos del camarón blanco en el pacífico de Costa Rica.....	58
Resumen .....	58
Abstract .....	59
1. Introducción .....	61
2. Materiales y Métodos .....	64
2.1. Área de estudio, tipo y diseño .....	64
2.2. Recolección de información.....	64
2.3. Toma de muestras de agua y camarón .....	64
2.4. Toma de parámetros físico-químicos del agua y coordenadas geográficas .....	65
2.5. Técnicas moleculares .....	65
2.6. Análisis estadístico.....	67
3. Resultados .....	69
4. Discusión.....	73
5. Conclusiones .....	77
6. Recomendaciones .....	78
7. Referencias bibliográficas .....	79
Discusión general.....	84
Conclusiones generales .....	92
Recomendaciones generales.....	94
Referencias Bibliográficas .....	95
Anexo .....	103
1. Encuesta .....	103

## ÍNDICE DE CUADROS

ARTÍCULO 1	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Protocolo de los PCR utilizados para amplificar el gen $\beta$ -actina, plásmido, <i>pir A</i> , <i>pir B</i> y <i>Vibrio</i> spp.....	29
<b>Cuadro 2.</b> Características de manejo realizadas en los 15 sistemas productivos de camarón marino de cultivo, en las provincias de Guanacaste y Puntarenas, Costa Rica.....	30
<b>Cuadro 3.</b> Encuesta sobre enfermedades infecciosas: conocimiento, “percepción” de la presencia de enfermedades infecciosas y uso de antibióticos en 15 sistemas productivos de camarón marino de cultivo, en las provincias de Guanacaste y Puntarenas, Costa Rica.....	32
<b>Cuadro 4.</b> Parámetros físico-químicos de la calidad del agua de 15 fincas productoras de camarón en Costa Rica, durante el 2017 y 2018.....	33
<b>Cuadro 5.</b> Porcentaje de identidad nucleotídica de las secuencias de los genes <i>pir A</i> y 16S para <i>Vibrio</i> spp. comparadas contra las referencias de la base de datos del GenBank.....	37
<b>Cuadro 6.</b> Distribución de muestras positivas y negativas de AHPND y <i>Vibrio</i> spp. para los factores de riesgo y sus categorías en las fincas productivas de camarón en Costa Rica, 2017-2018.....	39
<b>Cuadro 7.</b> Asociación entre los parámetros físico-químicos del agua con la presencia de genes de <i>pir A</i> , <i>pir B</i> , plásmido de AHPND y <i>Vibrio</i> spp., obtenidos de las fincas productivas de camarón muestreadas en Costa Rica, 2017-2018.	41
<b>ARTÍCULO 2</b>	
<b>Cuadro 1.</b> Protocolo de los PCR utilizados para amplificar el gen $\beta$ -actina, WSSV y <i>EHP</i> .....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

### ARTÍCULO 1

Pág.

- Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR, mostrando la presencia de (A)  $\beta$ -actina, (B) plásmido pVA-1, (C) toxina *pir* A, (D) toxina *pir* B, (E) *Vibrio* spp. en camarones *Penaeus vannamei* en Costa Rica. M: marcador de peso molecular de 100 kb. 1: ADN extraído de muestras de hepatopáncreas puro; 2: ADN extraído de muestras de hepatopáncreas dilución 1/10; C-: control negativo..... 34
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR, mostrando la presencia de (A)  $\beta$ -actina, (B) plásmido pVA-1, (C) toxina *pir* A, (D) toxina *pir* B en camarones *Penaeus vannamei* en cinco fincas de Costa Rica. M: marcador de peso molecular de 100 kb. 1, 2, 3, 4, 5: Muestras de hepatopáncreas positivas de las fincas 1, 4, 6, 11 y 12; C-: control negativo; C+: control positivo..... 35
- Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR, mostrando la presencia de *Vibrio* spp. en camarones *Penaeus vannamei* en cinco fincas de Costa Rica. M: marcador de peso molecular de 100 kb. 1, 2, 3, 4, 5, 6: Muestras de hepatopáncreas positivas de las fincas 1, 3, 4, 6, 11 y 12. C-: control negativo; C+: control positivo..... 36
- Figura 4.** Distribución geográfica de las fincas productivas de camarón negativas y positivas a genes asociados al plásmido, las toxinas que ocasionan AHPND y genes asociados a *Vibrio* spp. en Costa Rica, 2017-2018..... 38

## ARTÍCULO 2

- Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR, mostrando la amplificación de (A) WSSV (B) EHP. M: marcador de peso molecular de 100 kb. Líneas 1: ADN extraído de muestras de hepatopáncreas puro; 2: ADN extraído de muestras de hepatopáncreas dilución 1/10; C-: control negativo..... **69**
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de muestras de hepatopáncreas de camarón mostrando la presencia de WSSV por medio de PCR. M: marcador de peso molecular de 100 kb. Línea 1: Muestras de hepatopáncreas de camarones positivos; C+: control positivo C-: control negativo..... **70**
- Figura 3.** Alineamiento de la secuencia de una muestra de WSSV obtenida de Costa Rica (WSSV CRC) y la secuencia de WSSV obtenido de Taiwán, depositada en el GenBank (WSSV TWN) utilizando el programa ClustalW2... **70**
- Figura 4.** Distribución geográfica de las fincas productivas de camarón analizadas y ubicación de la finca positiva a WSSV en Costa Rica, 2017-2018.. **71**

## RESUMEN GENERAL

La necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND), el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) causan pérdidas económicas en la producción mundial de camarón. AHPND es ocasionada por bacterias *Vibrio parahaemolyticus* que contienen el plásmido pVA-1 con los genes de las toxinas *pir A* y *pir B*; esta enfermedad se caracteriza por producir atrofia del hepatopáncreas con descamación masiva de células epiteliales y muerte de los animales. El WSSV ocasiona destrucción sistémica de tejidos ectodérmicos y mesodérmicos, y puede causar mortalidades hasta el 100%, después de presentarse los signos clínicos. Mientras que EHP es un parásito microsporidio intracelular formador de esporas, el cual se replica en el citoplasma y genera lisis de las células epiteliales de los túbulos hepatopancreáticos. Es posible que estos tres patógenos estén ocasionando problemas sanitarios en las fincas de camarón en Costa Rica y sean los causantes de las mortalidades que se han venido presentando en los estanques de cultivo. El primer objetivo fue determinar la presencia y factores de riesgo asociados a AHPND y el segundo objetivo fue determinar la presencia de WSSV y EHP, lo anterior mediante técnicas moleculares (PCR y secuenciación) en muestras recolectadas de fincas que cultivan *Penaeus vannamei* ubicadas en el Golfo de Nicoya del Pacífico de Costa Rica. Entre 2017 y 2018 se recolectaron postlarvas, agua del primer bombeo y juveniles de camarón en 15 fincas, se seleccionaron fincas con un solo estanque. El día de la recolecta de los camarones juveniles se aplicó una encuesta a los productores para conocer sobre las condiciones de manejo y se midieron los parámetros físico-químicos del agua del estanque. En el primer estudio, las muestras se analizaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando diferentes protocolos e iniciadores para detectar el plásmido pVA-1, los genes de las toxinas *pir A* y *pir B*, y las bacterias del género *Vibrio*. Los datos de la encuesta y los resultados obtenidos por PCR se procesaron con el programa estadístico SAS para determinar factores de riesgo. Mientras que, en el segundo estudio, las muestras se analizaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

utilizando protocolos e iniciadores para detectar los genes de proteínas estructurales de WSSV y el gen SSU rRNA de EHP. En la primera investigación la presencia del plásmido pVA-1, gen *pir A* y gen *pir B* se determinó en cinco (33,3%) fincas, mientras que, *Vibrio* spp. en seis (40%). El hepatopáncreas de los juveniles de camarón fue el principal órgano blanco para la detección de los genes en estudio; no se encontraron casos positivos en estómago, postlarvas, ni en el agua. La secuenciación de los segmentos amplificados de los genes pVA-1, *pir A* y *pir B*, mostraron entre 99-100% de identidad con la cepa patógena XN89 aislada en camarones de Vietnam. La presencia de *V. parahaemolyticus* se logró demostrar en dos fincas. No se determinaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las condiciones de manejo entre fincas AHPND positivas y negativas, sin embargo, se establecieron entre las 15 fincas y las demás variables analizadas, tendencias de ausencia de AHPND en fincas con: 1) densidades de siembra menores a 100 mil animales por hectárea, 2) áreas de cultivo superiores a 4 hectáreas, 3) volúmenes de agua entre 35-40.000 m<sup>3</sup>, y 4) tasas de recambio de agua entre el 35-40%. Se determinó diferencias estadísticas significativas entre las muestras positivas a *Vibrio* spp. por PCR y el volumen de agua ( $p < 0,029$ ), la tasa de recambio de agua ( $p < 0,0354$ ) y el historial de la presencia de enfermedades ( $p < 0,049$ ). La presencia de AHPND (*pir A*, *pir B* y el plásmido pVA) y *Vibrio* spp. no se logró relacionar con parámetros físico-químicos del agua de las fincas ( $p < 0,05$ ) en el momento en que se tomaron las muestras de los camarones juveniles; sin embargo, fincas positivas mostraron niveles promedio bajos de oxígeno disuelto ( $2,82 \pm 1,55$  mg/L). En el segundo estudio, la presencia de WSSV se determinó en una de 15 fincas analizadas y EHP no se detectó. La secuenciación de los segmentos amplificados del gen VP41B mostraron un 100% de identidad a una secuencia aislada de camarón en Taiwán y un 99% a otra de México. En conclusión, se reporta por primera vez el diagnóstico molecular de AHPND, se confirma la presencia de WSSV en una finca camaronera y la ausencia de EHP en las fincas analizadas. Se recomienda notificar a las autoridades sanitarias y apoyar a los productores de camarón en el manejo de las fincas y en la implementación de protocolos de bioseguridad para prevenir y controlar AHPND y WSSV.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### Cultivo de camarón

La producción mundial de camarón alcanzó durante el año 2016 los 7,9 millones de toneladas (FAO, 2018), lo que representó un incremento del 200% con respecto a la última década. El crecimiento acelerado de la producción ha ocasionado la aparición de nuevas enfermedades, y esto a la vez ha provocado pérdidas económicas (Morales y Cuéllar-Anjel, 2014). La presencia de patógenos virales y bacterianos combinado con una inadecuada calidad del agua o del suelo, son la principal causa de mortalidad en camarones peneidos (Carroza et al., 2012). Además, un manejo inadecuado de los sistemas de cultivo incrementa el estrés en los animales, lo que genera un debilitamiento progresivo del sistema inmunológico, y por ende, una mayor susceptibilidad a contraer enfermedades (Gómez et al., 2001).

Las principales enfermedades que tienen un impacto económico en el cultivo de camarón en América y Asia son el síndrome de Taura (TS), el síndrome de la mancha blanca (WSS), la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHN), la mionecrosis infecciosa y hepatopancreatitis necrotizante (NHP), mismas que han generado pérdidas cuantiosas a la industria camaronera desde el año 1981 (Lightner et al., 2011). A su vez, han aparecido otras enfermedades ocasionando problemas en los sistemas de cultivo de camarón, tales como la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND), la microsporidiosis hepatopancreática (EHP) y la enfermedad de la mortalidad encubierta (CMNV) (Han et al., 2015a; Thitamadee et al., 2016; Kmmari et al., 2018).

El cultivo de camarón en Costa Rica presentó un crecimiento del 59,7% durante el año 2013 con respecto al año anterior, exportándose más de 3,6 millones de dólares en los primeros siete meses del año 2013 (Valverde y Alfaro, 2014). *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) es la principal especie de cultivo en estanques de agua salobre (Peña y Varela, 2016) y su cultivo se ha concentrado en el Pacífico Norte, específicamente en las márgenes del Golfo de Nicoya, donde el área dedicada al cultivo es de aproximadamente 1000 hectáreas (Valverde y Alfaro, 2013).

En el año 2000, WSS fue diagnosticada por primera vez en el país en sistemas productivos instalados en el Golfo de Nicoya, ocasionando mortalidades entre 60 a 70% (SENASA, 2010), pero no es hasta el año 2008, que el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA, 2010) emite un decreto de declaración obligatoria de WSS.

Un estudio reciente desarrollado en Costa Rica por Peña y Varela (2016), analizó la presencia de ocho enfermedades de tipo viral, bacterial y protozoarios de tres fincas en tres diferentes áreas ubicadas en el Golfo de Nicoya, las cuales reportaban mortalidades del 70-100% en los camarones. Del total de organismos recolectados, 4/180 (2,2%) y 24/180 (13,3%) fueron positivos para IHHNV y NHP, respectivamente, diagnosticado mediante PCR. Los autores sugirieron asimismo la presencia de bacterias oportunistas del género *Vibrio*, basado en resultados de cultivos bacteriológicos (Peña y Varela, 2016). Tanto para AHPND como EHP, no existen antecedentes de la presencia de estas enfermedades en Costa Rica.

La aparición de una enfermedad, sin embargo, no puede atribuirse solamente a la presencia del patógeno en el cultivo y a la susceptibilidad del hospedero, sino también al efecto del ambiente (factores como temperatura y salinidad), que favorece la proliferación del patógeno e incide negativamente en el estado de salud de los animales (p.ej. tiempo de coagulación mayores y hemogramas alterados) (Tendencia et al., 2011).

### **Necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND)**

La necrosis aguda del hepatopáncreas es ocasionada por una bacteria halofílica Gram-negativa (Luan et al., 2007) llamada *Vibrio parahaemolyticus* (Krishna et al. 2014; Morales y Gómez, 2014; Nunan et al., 2014), que habita naturalmente ambientes marinos y estuarinos (Luan et al., 2007). Las cepas de *V. parahaemolyticus* que causan AHPND poseen un gran plásmido extracromosómico (63-69 kbp), estructura ausente en las cepas que no provocan la enfermedad (Hung et al., 2015). El plásmido asociado a AHPND se ha denominado pVA-1 (Han et al., 2015b).

Este plásmido porta dos toxinas llamadas *Pir A* y *Pir B*, que son factores de virulencia que causan el desprendimiento de las células epiteliales del túbulo del hepatopáncreas (Lightner et al., 2013; Tran et al., 2013; Nunan et al., 2014; Han et al.,

2015b). Cuando la cepa patógena de *V. parahaemolyticus* coloniza el estómago de los camarones, se liberan las dos toxinas que tienen capacidad proteolítica (Han et al., 2015b, Hung et al., 2015; Thitamadee et al., 2016). Dentro del plásmido, los genes que codifican las toxinas están flanqueados por una secuencia que codifica una transposasa, que es un elemento genético móvil y puede inducir transferencia horizontal de genes. Así el plásmido con los genes *pir A* y *pir B* puede propagarse potencialmente a través de la transposición, conjugación y captación de plásmidos, ocasionando que las cepas no patógenas se vuelvan patógenas (Han et al., 2015a). La toxina binaria que causa AHPND en los camarones ha sido reportada en otras bacterias como *Vibrio campbelli* (Dong et al., 2017), *Vibrio harveyi* (Liu et al., 2015) y *Vibrio owensii* (Kondo et al., 2015). El potencial de transferencia del plásmido aumenta cuando las bacterias están colonizando densamente el estómago y el hepatopáncreas del camarón (Han et al., 2015a).

El AHPND apareció por primera vez en China en el año 2009 y a partir del 2010 en el sureste de Asia: Vietnam (2010), Malasia (2011) y Tailandia (2012) (Nunan et al. 2014; Lee et al., 2015; Han et al., 2015a, Jun et al., 2016). En el 2013 se reportó por primera vez en México (OIE, 2013; Han et al., 2015a; Soto-Rodríguez et al., 2015; Escobedo, 2016), donde *V. parahaemolyticus* fue identificado como el agente causal de AHPND mediante diagnóstico histológico (Tran et al., 2013). En Centroamérica se reportó por primera vez en el año 2015 mediante PCR en dos países no especificados (Han et al., 2015b).

La transmisión ocurre principalmente por vía oral y cohabitación con la bacteria (OIE, 2013). Se cree que las bacterias que causan AHPND colonizan la cutícula del estómago donde producen las toxinas *pir A* y *pir B*. La ruta más probable para que las toxinas lleguen a estas células desde el estómago es pasando a través del tamiz gástrico en la cámara posterior, donde se filtran las bacterias, y posteriormente las toxinas causan lesiones patognómicas en las células epiteliales del túbulo del hepatopáncreas (Prachumwat et al., 2018).

Los signos clínicos observados comúnmente incluyen nado errático, tasa de crecimiento reducida, coloración pálida o blanquecina del hepatopáncreas, pérdida de la consistencia del órgano, atrofia del hepatopáncreas, cutícula blanda, intestino y estómago vacío o parcialmente lleno y túbulos melanizados dentro del hepatopáncreas

(Pantoja y Lightner, 2014a). Los camarones moribundos se encuentran en el fondo del estanque, donde las mortalidades pueden alcanzar hasta un 100% en pocos días. Esta enfermedad se desarrolla rápidamente en forma de brote; las larvas se infectan ya sea por agua, alimento o suelo contaminado en el momento de la siembra de los estanques. Las mortalidades más severas se presentan durante los primeros 20-30 días de cultivo, por lo tanto, los camarones afectados tienden a ser juveniles de tallas pequeñas (Hung et al., 2015; López et al., 2016; Thitamadee et al., 2016), aunque Escobedo (2016) indica un periodo de mortalidad masivo entre los 30-60 días.

El diagnóstico de AHPND se realiza de manera presuntiva por signos clínicos y de manera confirmatoria mediante estudio histopatológico (Morales y Gómez, 2014; Pantoja y Lightner, 2014a) o análisis molecular amplificando fragmentos del gen de las toxinas *pir* (Pantoja y Lightner, 2014a). El diagnóstico diferencial de AHPND incluye la hepatopancreatitis necrotizante y la necrosis séptica del hepatopáncreas (SHPND, por sus siglas en inglés; Pantoja y Lightner, 2014a). La primera ocasionada por la rickettsia *Hepatobacter penaei*, mientras que para la segunda se han reportado como agentes etiológicos cepas de *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. penaeicida* y *V. campbellii* (Pantoja y Lightner, 2014a). Estas bacterias no producen toxinas, sino que ocasionan directamente daños en el hepatopáncreas (OIE, 2018; Nunan et al., 2013).

Para el tratamiento y control de la enfermedad se utilizan antibióticos, pero Hung et al. (2015) determinaron eventos de recombinación generando resistencia en las bacterias. Jun et al. (2016) también mencionaron el uso de bacteriófagos para controlar AHPND. Otra alternativa, es el uso de probióticos, que han sido utilizados para mejorar la calidad de las aguas y el crecimiento del camarón (Melgar et al., 2013); además parecen ser controladores biológicos que previenen la aparición de AHPND (Chumpol et al., 2017).

El alimento vivo (p.ej., almejas, ostras, poliquetos y carne de calamar fresca) suministrado a los reproductores de camarón puede estar infectado con la bacteria patógena, también en el sedimento de los estanques el agente puede permanecer viable, por lo que estos dos factores se consideran factores de riesgo (Thitamadee et al., 2016).

Para prevenir la infección se recomienda el revestimiento del fondo de los estanques con PVC flexible, ya que reduce la carga de organismos patógenos en el fondo

del estanque, además de agregar cal o dejar los estanques vacíos por 30 días, para que la acción del sol y el viento ayuden a eliminar los agentes en el sedimento del estanque (Cuéllar et al., 2014). Además, se recomienda evitar el traslado de animales de una finca a otro y utilizar probióticos (*Bacillus*) para prevenir las infecciones (Thitamadee et al., 2016).

### **Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)**

El virus que provoca el síndrome de la mancha blanca pertenece al género *Whispovirus*, familia Nimaviridae y se denomina virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) (Lo et al., 2012). Los viriones tienen un tamaño de 80-120 x 250-380 nm, poseen forma elíptica a cilíndrica y son envueltos. En el interior de la cápside se encuentra el genoma, un ADN de doble cadena, de un tamaño aproximado de 290 kbp (OIE, 2009; Pantoja y Lightner, 2014a). Las diferentes proteínas de WSSV poseen un rol importante en la infección. Hasta la fecha se han caracterizado más de 58 proteínas estructurales (Bustillo et al., 2009), además reductasas, kinasas, y un ADN polimerasa entre las proteínas no estructurales (Tsai et al., 2000; Yang et al., 2001; Chen et al., 2002). Ciertas proteínas estructurales como las VP28, VP68, VP281, VP466 e incluso la VP24 poseen un rol importante en la penetración del virus y por consiguiente en el proceso de la infección (Escobedo et al., 2008).

La distribución geográfica de WSSV incluye China, Japón, Corea, Tailandia, Indonesia, Taiwán, Vietnam, Malasia, India, EE. UU, México, Nicaragua, Honduras, Costa Rica, Panamá, Ecuador, Perú, Colombia, Brasil, Arabia Saudita, Mozambique y Madagascar, entre otros (OIE, 2009; Pantoja y Lightner, 2014a; Vásquez et al. 2016).

El primer país que reportó este virus fue Taiwán en 1992, siguiendo Japón, China y Korea en 1993 (Escobedo et al., 2008). Durante el periodo comprendido entre 1995 y 2000 apareció de forma simultánea en varias regiones, desde América hasta Asia, y en el 2002 se reportó en Francia e Irán (Escobedo et al., 2008). En el año 1999 se reportó WSSV en el sur de los EE.UU, América Central y el norte de Suramérica, mientras que en Costa Rica apareció desde el año 2000 (SENASA, 2010). Se cree que la propagación

a diversos continentes ocurrió mediante el comercio de camarones importados que venían congelados e infectados (Durand et al., 2000).

El virus se puede transmitir de forma vertical (*trans-ovum*) y horizontal por el consumo de tejido infectado (canibalismo) o por medio de agua contaminada (OIE, 2009). Experimentalmente se ha logrado la transmisión del virus por vía oral y por medio de inyecciones intramusculares (Escobedo et al., 2015).

También se han determinado vectores transmisores del virus, como rotíferos, moluscos, poliquetos, el crustáceo *Artemia salina*, copépodos y artrópodos acuáticos como *Ligia oceánica* (Isopoda) y algunas larvas de insectos Ephydriidae (Diptera) (OIE, 2009). Todas estas especies pueden acumular altas concentraciones de WSSV viables, aunque no hay evidencia de replicación del virus en ellos (OIE, 2009). Los rotíferos pueden ser portadores de WSSV a través de la ingestión de fitoplancton contaminado y convertirse en un vector en la transmisión de WSSV a larvas de camarón peneido (Esparza et al., 2009). Las aves son consideradas vectores mecánicos, ya que cuando se alimentan de camarones infectados, el virus es excretado por las heces hasta 48 horas después del consumo (Lightner, 2011), logrando propagar la enfermedad entre fincas cercanas. Otros vectores pueden ingresar por las entradas de agua y así llevar el agente que causa la enfermedad a los estanques de cultivo de camarón (Cuéllar-Anjel, 2013).

La replicación del agente se da en células del epitelio subcuticular del estómago, células de las branquias, y células epiteliales del intestino (Escobedo et al., 2008). Los viriones de WSSV al estar completamente formados, rompen la célula para ser liberados y comenzar un nuevo ciclo de infección en otras células susceptibles (Escobedo et al., 2008).

Con respecto a los signos clínicos, se observa una reducción del consumo de alimento, letargia, manchas blancas en la cutícula y coloración rojiza en camarones moribundos por la expansión de cromatóforos (OIE, 2009). Las manchas blancas representan depósitos anormales de sales de calcio en el epitelio cuticular; es posible que se deba a la disfunción del integumento provocado por la infección de WSSV (Pantoja y Lightner, 2014b). Se han reportado tasas de mortalidad de hasta el 100%, de tres a diez días después de que aparecen los primeros signos clínicos (Pantoja y Lightner, 2014b).

El diagnóstico puede ser presuntivo, o se basa en hallazgos histológicos o amplificación de segmentos específicos del virus mediante técnicas moleculares. El diagnóstico presuntivo se basa en el historial de la finca (la región de cultivo y el sitio de compra de las postlarvas), el diagnóstico histológico en la detección de núcleos hipertrofiados y vacuolizados del tejido epitelial y conectivo de estómagos o branquias (Pantoja y Lightner, 2014b), además de inclusiones intranucleares eosinofílicas. El diagnóstico definitivo se realiza mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Stentiford y Lightner, 2011). El diagnóstico diferencial del síndrome de la mancha blanca incluye vibriosis sistémica, síndrome de la cabeza amarilla y síndrome de Taura, así como intoxicaciones de origen químico o biológico (Cuéllar-Anjel, 2013).

La profilaxis y el control se basa en la reducción de los factores estresantes como los cambios bruscos de temperaturas y bajas calidades de agua, la implementación de medidas de bioseguridad y prácticas de saneamiento (drenado, secado, encalado) en las granjas de cultivo, para reducir la entrada de nuevos patógenos (Sánchez, 2010). Por ejemplo, incrementar la temperatura del agua de 27°C a 33°C mediante invernaderos ofrece una oportunidad para manejar la enfermedad al reducir la replicación viral (Sánchez, 2010). Además, se ha buscado crear líneas tolerantes mediante mejoramiento genético (Cuéllar-Anjel et al., 2011; Castillo et al., 2015). No existe un tratamiento profiláctico efectivo para prevenir las infecciones virales en camarones (Esparza et al., 2009; Badhul et al. 2012).

### **Microsporidiosis hepatopancreática (MHP)**

*Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) es un parásito microsporidio intracelular formador de esporas, que se replica en el citoplasma de las células epiteliales de los túbulos hepatopancreáticos (Tourtip et al., 2009). Pertenece al filo Microspora, clase Microsporea, orden Microsporida, familia Enterocytozoonidae y género *Enterocytozoon* (Tourtip et al., 2009). Los plasmodios son multinucleados y las esporas maduras son de forma ovalada, midiendo entre 0,7 y 1,1 µm. Las esporas contienen un solo núcleo, de 5

a 6 espirales del filamento polar, una vacuola posterior y un disco de anclaje unido al filamento polar (Tourtip et al., 2009).

El ciclo de vida de microsporidia consta de tres fases (Cali y Takvorian, 1999): la infectiva, que es la fase extracelular del ciclo de vida, en la que las esporas maduras se encuentran en el ambiente; son ingeridas por un hospedero apropiado y activadas en el intestino. La fase proliferativa, que es la fase del desarrollo intracelular, donde los organismos están en el citoplasma de la célula intestinal huésped y aumentan en número; y por último, la fase esporogénica, en la cual el organismo forma las esporas.

El agente que ocasiona la microsporidiosis (EHP) se reportó por primera vez en el año 1989 y 2001 en Malaysia y Australia, respectivamente (Hudson, et al., 2001; Rajendran et al., 2016), en el año 2009 en Tailandia y Vietnam (Ha, et al., 2010; Tang, et al., 2015; Rajendran et al. 2016), también se ha demostrado su presencia en China e India (Rajendran et al., 2016; Santhoshkumar et al. 2016).

Entre las especies de crustáceos susceptibles a EHP se encuentran *Penaeus monodon*, *Penaeus vannamei* y se sospecha que también afecta a *Penaeus japonicus* (Tangprasittipap et al., 2013). El primer caso de EHP en América Latina se reportó en México y se diagnosticó mediante técnicas histológicas e hibridación *in situ*, alertando sobre el impacto que podría ocasionar en la producción de camarón, en caso de extenderse a otras granjas de la región (Tang et al., 2017).

EHP se transmite vía horizontal entre camarones en estanques de cría (Tangprasittipap et al., 2013; Rajendran et al. 2016), lo que significa que se propaga progresivamente a medida que el cultivo se desarrolla. Se replica dentro del citoplasma de las células epiteliales del túbulo en el hepatopáncreas, lo que ocasiona que los camarones consuman menos alimento debido a que se genera lisis de las células de los túbulos hepatopancreáticos y por ende, se genera bajo crecimiento en los camarones (NACA, 2015; Tang et al., 2017).

No se conocen signos clínicos específicos, solamente se asocia con bajo crecimiento de los camarones y reducción en el consumo de alimento (Rajendran et al., 2016; Tang et al., 2017).

La detección de EHP se basa en histopatología, técnica LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle), microscopía electrónica (Rajendran et al., 2016), y

técnicas moleculares (PCR convencional y tiempo real), además de la hibridación *in situ* (Tourtip et al., 2009; Tangprasittipap et al., 2013; Tang et al., 2015). Los tejidos infectados muestran diferentes etapas de desarrollo del agente, incluyendo los primeros plasmodios esporogonales y las esporas maduras.

Con respecto al diagnóstico diferencial, algunos estudios sugieren que EHP puede confundirse con *Agmasoma penaei*, un microsporidio que se relaciona con la enfermedad del camarón algodonoso (Laisutisan et al., 2009), pero que raramente afecta tejido conectivo del hepatopáncreas y no infecta células de los túbulos epiteliales (NACA, 2015).

Como tratamiento y control se recomienda el uso de dietas que contengan antioxidantes y extractos de plantas herbales hepatoprotectivos (Santhoshkumar et al., 2016). No se conocen ni se han descrito factores de riesgo asociados hasta la fecha para este parásito.

## ARTÍCULO 1

### **Detección molecular y factores de riesgo asociados a la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) en *Penaeus vannamei* cultivado en Costa Rica**

#### **Resumen**

La enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) es ocasionada por bacterias *Vibrio parahaemolyticus* que contienen el plásmido pVA-1, el cual codifica los genes de las toxinas *pir A* y *pir B*. El AHPND se caracteriza por producir atrofia del hepatopáncreas con descamación masiva de células epiteliales y muerte de los camarones. Es posible que este patógeno esté ocasionando problemas sanitarios en las fincas de camarón en Costa Rica y los productores sospechan de la presencia del patógeno en el país. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia y factores de riesgo asociados a AHPND en fincas de camarones que cultivan *Penaeus vannamei* en Costa Rica. Entre 2017 y 2018 se recolectaron postlarvas, agua del primer bombeo y juveniles de camarón en 15 fincas estanques localizadas en el Golfo de Nicoya y el Pacífico Central del país. Las muestras se analizaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando diferentes protocolos e iniciadores para detectar el plásmido pVA-1, los genes de las toxinas *pir A* y *pir B*, y las bacterias del género *Vibrio*. El día de la recolecta de los camarones juveniles se aplicó una encuesta a los productores para conocer sobre las condiciones de manejo y se midieron los parámetros físico-químicos del agua del estanque. Estos datos y los resultados obtenidos por PCR se procesaron con el programa estadístico SAS para determinar factores de riesgo. La presencia del plásmido pVA-1, gen *pir A* y gen *pir B* se determinó en cinco (33,3%) fincas, mientras que, *Vibrio* spp. en seis (40,0%). En el hepatopáncreas de los camarones juveniles (día 50) se detectaron los genes en estudio, no así en las postlarvas (día 0) y en los estómagos de los camarones juveniles. La secuenciación de los segmentos amplificados de los genes pVA-1, *pir A* y *pir B*, mostraron entre 99-100% de identidad con la cepa patógena XN89 aislada en camarones de Vietnam, siendo diferente a las secuencias reportadas en México y Centroamérica. La presencia de *V.*

*parahaemolyticus* se logró demostrar en dos fincas. No se determinaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las condiciones de manejo entre fincas AHPND positivas y negativas, sin embargo, se establecieron entre las 15 fincas y las demás variables analizadas, tendencias de ausencia de AHPND en fincas con: 1) densidades de siembra menores a 100 mil animales por hectárea, 2) áreas de cultivo superiores a 4 hectáreas, 3) volúmenes de agua entre 35-40.000 m<sup>3</sup>, y 4) tasas de recambio de agua entre el 35-40%. Se determinaron diferencias estadísticas significativas entre las muestras positivas a *Vibrio* spp. por PCR y el volumen de agua ( $p < 0,029$ ), la tasa de recambio de agua ( $p < 0,0354$ ) y el historial de la presencia de enfermedades ( $p < 0,049$ ). La presencia de AHPND (*pir* A, *pir* B y el plásmido pVA) y *Vibrio* spp. no se logró relacionar con parámetros físico-químicos del agua de las fincas ( $p < 0,05$ ) en el momento en que se tomaron las muestras de los camarones juveniles; sin embargo, fincas positivas mostraron niveles promedio bajos de oxígeno disuelto ( $2,82 \pm 1,55$  mg/L). Se reporta por primera vez el diagnóstico molecular de AHPND en Costa Rica, por lo que se recomienda notificar a las autoridades sanitarias y capacitar a los productores sobre la enfermedad, el control y su erradicación.

**Palabras Clave:** *Vibrio parahaemolyticus*, genes *pir* A y *pir* B, plásmido pVA-1, enfermedades del camarón, síndrome de la mortalidad temprana.

## **Molecular detection and risk factors associated to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* cultured in Costa Rica**

### **Abstract**

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is caused by *Vibrio parahaemolyticus* containing the pVA-1 plasmid, which encodes for the *pir A* and *pir B* toxins. The AHPND is characterized by hepatopancreas atrophy with massive scaling of epithelial cells and shrimp death. It is possible that this pathogen is causing health problems on shrimp farms in Costa Rica and producers suspect the presence of the pathogen in the country. The objective of this work was to determine both the presence and risk factors associated to AHPND in shrimp farms that cultivated *Penaeus vannamei* in Costa Rica. Between 2017 and 2018, postlarvae, water from the first harvest and juvenile shrimp were collected in 15 farms with ponds located around the Golfo de Nicoya and the Central Pacific coast of the country. The samples were analyzed using the polymerase chain reaction (PCR) technique applying different protocols and initiators to detect pVA-1 plasmid, *pir A* and *pir B* toxins, and *Vibrio* bacteria. During the harvest day of the juvenile shrimp, a survey was applied to the producers to learn about the handling conditions; meanwhile the physical-chemical parameters of the pond waters were measured. These data and the results obtained by PCR were processed with the SAS statistical program to determine risk factors. The presence of plasmid pVA-1, gene *pir A* and gene *pir B* was determined in five farms (33.3%), and *Vibrio* spp. in six (40,0%) farms. The hepatopancreas was the main target organ for the detection of the studied genes; no positive cases were found in stomachs, post-larvae, or water. Positive cases were found in the samples taken at the beginning and the middle of the tank. The sequencing of the amplified segments of the genes pVA-1, *pir A*, and *pir B* showed between 99-100% identity with the pathogenic strain XN89 isolated in shrimps from Vietnam, being different from the sequences reported in Mexico and Central America. The presence of *V. parahaemolyticus* was demonstrated in two farms. No significant differences ( $p < 0.05$ ) were determined in the management conditions between positive and negative AHPND farms; however, were established between

the 15 farms and the other variables analyzed, trends of absence of AHPND were established in farms with: 1) stocking densities less than 100 thousand postlarvae per hectare, 2) cultivation areas greater than 4 hectares, 3) water volumes between 35-40,000 m<sup>3</sup>, and 4) water exchange rates between 35-40%. Significant statistical differences were detected between samples positive for *Vibrio* spp. by PCR and water volume ( $p < 0.029$ ), water exchange rate ( $p < 0.0354$ ) and disease history ( $p < 0.049$ ). The presence of AHPND (*pir A*, *pir B*, and plasmid pVA) and *Vibrio* spp. was not related to physical-chemical parameters of farm water ( $p < 0,05$ ) at the time the samples of juvenile shrimps were taken; however, positive farms showed low average levels of dissolved oxygen ( $2,82 \pm 1,55$  mg/L). For the first time the molecular diagnosis of AHPND is reported in Costa Rica. It is recommended to notify health authorities and to train producers on the control and eradication of the disease.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*, toxin *pir A* and *pir B*, plasmid pVA-1, shrimp disease, early mortality syndrome

## 1. Introducción

El síndrome de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) o también conocida como síndrome de la mortalidad temprana (EMS), es una enfermedad ocasionada por *Vibrio parahaemolyticus*, una bacteria Gram negativa que habita ambientes marinos y estuarinos (Luan et al., 2007). Pero también se ha reportado, que *V. campbelli* (ver Dong et al., 2017), *V. harveyi* (ver Liu et al., 2016) y *V. owensii* (ver Kondo et al., 2015) pueden producir AHPND. La enfermedad afecta a camarones marinos cultivados como *Penaeus vannamei*, *Penaeus monodon* y *Penaeus chinensis* (OIE, 2018), donde las mortalidades pueden llegar al 100% entre los 30-40 días de cultivo y casi hasta las 6-7 semanas (Ananda et al., 2017; Theethakaew et al., 2017).

*Vibrio parahaemolyticus* produce toxinas proteolíticas que destruyen el tejido y provocan disfunción del hepatopáncreas (Morales y Gómez, 2014). Los camarones afectados presentan letargia, palidez, exoesqueleto suave y atrofia del hepatopáncreas, mientras que el intestino se encuentra vacío o discontinuo (Dong et al., 2017).

El AHPND fue reportado por primera vez en China en el 2009 y progresivamente apareció en países como Vietnam en el 2010 (Nunan et al. 2014; Lee et al., 2015; Han et al., 2015a, Jun et al., 2016), Malasia en el 2011 (Nunan et al. 2014; Lee et al., 2015; Han et al., 2015a, Jun et al., 2016) y Tailandia en el 2012 (Nunan et al. 2014; Lee et al., 2015; Han et al., 2015a, Jun et al., 2016). En Latinoamérica se reportó por primera vez en el 2013 en los estados de Nayarit, Sinaloa y Sonora en México, y luego en dos países no especificados de Centroamérica durante el 2015, donde se presentaron mortalidades atípicas en los primeros 30 días de cultivo (OIE, 2018; Han et al., 2015b; Soto-Rodríguez et al., 2015; Escobedo, 2016).

Como diagnóstico diferencial de AHPND se mencionan la hepatopancreatitis necrotizante (NHP), causada por la rickettsia *Hepatobacter penaei* y la necrosis hepatopancreática séptica (SHPND), causada por *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. penaeicida* y *V. campbellii* (Pantoja y Lightner, 2014).

El AHPND se da por la presencia de un plásmido denominado pVA-1, que codifica los genes para las toxinas *pir A* y *pir B*. Generalmente este plásmido se encuentra en *V. parahaemolyticus* (Lightner et al., 2013; Tran et al., 2013; Nunan et al., 2014; Han et al., 2015b). Estudios han determinado que se necesita la combinación de las dos toxinas para inducir un efecto; sin embargo, también se ha demostrado que *Pir B* solo puede inducir proteólisis y daño celular (Lai et al., 2015).

El plásmido puede transferirse entre cepas de *V. parahaemolyticus*, pero también otras bacterias pueden adquirir el plásmido pVA por medio de transferencia de genes (Han et al., 2015b; Lee et al., 2015). El plásmido pVA-1 codifica también otros factores de virulencia tales como tripsinas, proteasas y proteínas de secreción que contribuyen con la patogenicidad (Prachumwat et al., 2018), adicional a la transposición, conjugación y captación de plásmidos (Han et al., 2015a).

La importación de reproductores de camarones vivos y crías infectadas pueden introducir y propagar la enfermedad en un país (Thitamadee et al., 2016). Además, el alimento vivo (almejas, ostras, poliquetos y carne de calamar fresca) suministrado a los reproductores de camarón puede estar contaminado con la bacteria, fue así como, mediante poliquetos infectados, se introdujo la enfermedad desde China a Tailandia (Thitamadee et al., 2016). Finalmente, temperaturas por encima de los 30°C aumentan el crecimiento de las bacterias (Prachumwat et al., 2018).

La enfermedad presenta tres fases distintas (Morales y Gómez, 2014): (1) la fase aguda, en donde se da la pérdida de la función de las células que recubren los túbulos del hepatopáncreas, por lo que, es común observar células desprendidas con núcleos aun intactos; (2) la fase de transición, que presenta inflamación intertubular, melanización de las áreas más afectadas, principalmente en la región proximal de los túbulos; y (3) la fase terminal, con inflamación intertubular muy marcada, melanización multifocal extensa de los túbulos necrosados e infección bacteriana secundaria masiva por especies oportunistas de *Vibrio* spp.

El diagnóstico de AHPND se puede realizar mediante histopatología, donde las células del hepatopáncreas muestran inflamación y melanización, además, se pueden visualizar bacterias (OIE, 2018). En los últimos años, se ha utilizado con

más frecuencia la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debido a que es una técnica de diagnóstico rápida y altamente específica, permitiendo la detección típica de la bacteria causante de AHPND (Luan et al., 2007; Han et al., 2015c).

Existen varios protocolos de PCR para el diagnóstico de AHPND; la mayoría se basan en la detección del plásmido pVA-1 (Nunan et al., 2014) utilizando diferentes cebadores (López et al., 2016). Otros protocolos de PCR amplifican secuencias de los genes que codifican los genes *pir A* y *pir B* en el plásmido pVA-1 (Lee et al., 2015), como el PCR VpPirA-284 que amplifica el gen *pir A* (Han et al., 2015a) y el PCR VpPirB-392 que amplifica *pir B* (Thitamadee et al., 2016). Estos dos protocolos parecen tener una baja sensibilidad, por lo que se recomienda utilizar un paso de enriquecimiento antes de la extracción de ADN de muestras ambientales, como sedimentos y biofilms, donde las bacterias se encuentran en cantidades bajas (Han et al., 2015a; OIE, 2018). Por otro lado, para el diagnóstico de *Vibrio* spp. se han utilizado protocolos de PCR que amplifican el gen 16S rRNA, debido a que es una región muy conservada en el ADN bacterial (Vigliotta et al., 2007; Joshi et al., 2014).

En el 2013, el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) de Costa Rica suspendió la importación de crustáceos o subproductos provenientes de países afectados con la enfermedad como medida preventiva y AHPND no ha sido confirmada hasta la fecha en Costa Rica (SENASA, 2013). Sin embargo, en base a las altas mortalidades reportadas en camarones ubicadas alrededor del Golfo de Nicoya desde el año 2016, y el hallazgo de camarones presentando atrofia del hepatopáncreas, los productores sospechan de la presencia del patógeno en nuestro país. Es por esto, que en el presente trabajo se planteó el objetivo de determinar la posible presencia de agentes que ocasionan AHPND en muestras de agua, postlarvas y camarones juveniles de 15 fincas mediante la técnica de PCR, y asociar la posible presencia de éstos a los parámetros de la calidad del agua, el manejo sanitario y el manejo productivo, determinando factores de riesgo asociados a AHPND que brinden a los productores información que les permita aumentar la producción y disminuir las mortalidades de los camarones.

## **2. Materiales y métodos**

### *2.1. Área de estudio, tipo y diseño*

Se realizó un estudio transversal descriptivo durante los años 2017-2018 en 15 fincas pertenecientes a la Cámara de Productores de Camarón de Costa Rica (CAPROCAM), de aproximadamente un total de 90 fincas a nivel nacional (Dra. Carolina Elizondo, SENASA, comunicación personal, 2019), mismas que presentaban únicamente un estanque de producción, ya que se presumió que eran las fincas menos tecnificadas. Las fincas se ubicaron alrededor del Golfo de Nicoya y Pacífico Central de Costa Rica (Punta Morales, Colorado de Abangares, Quebrada Honda, Lepanto y Jicaral). Las fincas se visitaron al inicio del ciclo de producción (Enero del 2017 y hasta Junio del 2018) y 6-7 semanas después de la siembra, ya que es cuando se han reportado las más altas mortalidades ocasionadas por AHPND en las fincas (Ananda et al., 2017; Theethakaew et al., 2017).

### *2.2. Recolección de información*

Al inicio del ciclo de producción, en el momento de la siembra de las postlarvas, se aplicó un instrumento precodificado a cada productor, para conocer las condiciones generales de la finca (área de cultivo, área del estanque y uso de agua), sistema de producción (densidad de siembra, origen de la postlarva, volumen de agua, tasa de recambio, métodos de alimentación, conversión alimenticia, tipo de alimento, duración de ciclos de cultivo, registro de parámetros de calidad de agua, tiempo de secado) y manejo sanitario (conocimiento sobre enfermedades, presencia de enfermedades, uso y aplicación de antibióticos, entre otros) (Anexo 1). Las preguntas fueron de tipo dicotómicas y categóricas.

### *2.3. Toma de muestras de agua y camarón*

Durante el proceso de llenado del estanque, previo a la siembra, se tomó una muestra de 10 ml de agua antes de ingresar al estanque, la cual se almacenó en tubos vacutainer. El día de la siembra se recolectaron 100 postlarvas (día 0) antes de sembrar, las cuales se almacenaron en tubos con alcohol al 70%. Después de 6-7 semanas de realizada la siembra, se visitaron otra vez las fincas, y se tomaron durante las mañanas cinco camarones juveniles (5-10 g) en tres sitios diferentes (a la entrada de agua, en el medio del estanque y en el sitio de desagüe del mismo) con atarraya, y con la finalidad de tener una mayor posibilidad de obtener un camarón con los agentes analizados, además de analizar si podría existir una diferencia de la presencia del agente con respecto al lugar de muestreo dentro del estanque. A estos individuos se les extrajo el hepatopáncreas y el estómago y se almacenaron en alcohol al 70%. Todas las muestras fueron transportadas en refrigeración (4-8°C) al laboratorio y se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta su procesamiento.

#### *2.4. Toma de parámetros físico-químicos del agua y coordenadas geográficas*

El día de la recolecta de los camarones juveniles se tomaron, con un multiparámetro portátil, los siguientes parámetros físico-químicos del agua: temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/L), pH y salinidad (ppm). Además, se registraron las coordenadas geográficas en las cuatro esquinas del estanque con un sistema de posicionamiento global (GPS, por sus siglas en inglés), promediando el valor obtenido con la finalidad de obtener un centroide y una mejor precisión del sitio.

#### *2.5. Técnicas moleculares*

El agua tomada previa a la siembra se centrifugó a 16000 g x 10 min, y tanto el sobrenadante como el precipitado del agua, las postlarvas, los hepatopáncreas y los estómagos de camarones juveniles se sometieron a extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit Dneasy® Blood and Tissue (Qiagen), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para la extracción de

ADN de los hepatopáncreas y estómagos, el procedimiento fue precedido por el siguiente protocolo de extracción (Carmona et al., 2016): se agregaron 300  $\mu$ l de solución PBS a la muestra (grupos de 5 hepatopáncreas o 5 estómagos), centrifugando a 5000 g x 5 min a 4°C y luego se agregó un volumen de 200  $\mu$ l de una solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (proporción 50:48:20), se mezcló con vortex por un minuto, y se centrifugó a 30000 g x 5 min a 4°C, removiendo 150  $\mu$ l de la fase acuosa. La fase acuosa se sometió a extracción de ADN con el kit Dneasy® Blood and Tissue (Qiagen). Finalmente se midió la concentración de ADN (ng/ $\mu$ l) de cada muestra extraída mediante espectrofotómetro (Nanodrop™)

Las muestras (agua, postlarvas, hepatopáncreas y estómagos de camarones juveniles) se analizaron mediante cinco protocolos de PCR (Cuadro 1): en el primer PCR se amplificó el gen  $\beta$ -actina de las muestras de camarón (postlarvas, hepatopáncreas y estómagos) según el protocolo descrito por Dhar et al. (2001) para determinar la correcta extracción de ADN de las muestras y descartar inhibiciones en la amplificación del ADN. El segundo PCR amplificó un segmento del gen del plásmido pVA-1 según el protocolo descrito por Nunan et al. (2014), mientras que el tercer y cuarto PCR amplificaron segmentos de los genes asociados a las toxinas *pir A* y *pir B*, respectivamente (Han et al., 2015a). Con el quinto PCR se intentó identificar la especie de *Vibrio* presente en la muestra mediante amplificación de la subunidad 16S del gen rRNA (Vigliotta et al., 2007).

La mezcla de la reacción para los PCR comprendió templado de ADN (0,8 – 1,6  $\mu$ M), iniciadores en concentración 10  $\mu$ M y Master Mix 0,6  $\mu$ M (DreamTaq, Thermofisher®), volumen final de 25  $\mu$ l. Como controles positivos se utilizó ADN de tejido positivo a AHPND, adquirido en la Universidad de Arizona, EE.UU. Como control negativo se usó agua libre de nucleasas (Fermentas®). Las secuencias de los iniciadores y el protocolo de amplificación de los diferentes PCR se detallan en el Cuadro 1.

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa (1%) en TBE 1X (Tris base, ácido bórico, EDTA, pH 8, 0,5M). La corrida electroforética se realizó a 100 voltios durante 45 min. Como marcador de peso molecular se empleó GenRuler 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas®) y como

colorante GelRed® Nucleic Acid Gel Strain. Los fragmentos de amplificación con un tamaño 339 pb ( $\beta$ -actina), 470 pb (pVA-1), 284 pb (*pir A*), 392 pb (*pir B*) y 1488 pb (*Vibrio* spp.) se consideraron positivos y todos menos los de  $\beta$ -actina se enviaron a secuenciar a Macrogen (Seúl, Corea). Las secuencias parciales se alinearon con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® y se compararon mediante el algoritmo BLASTn (Joshi et al. 2014; Han et al., 2015a) con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el GenBank.

## 2.6. Análisis estadístico

En una base de datos se digitaron los resultados de las encuestas y de los PCR de plásmido, *pir A*, *pir B* y *Vibrio* spp. Se creó un mapa con el programa QGIS 2.14.0. para mostrar la distribución de las camaroneras analizadas y casos positivos identificados.

Se realizó un análisis descriptivo, donde se obtuvieron los porcentajes de las frecuencias observadas para cada una de las variables analizadas en la encuesta. Se definieron los factores de riesgo por importancia (área de cultivo, área del estanque, lugar de extracción del agua, densidades de siembra, origen de la postlarva, volumen de agua en el estanque, tasa de recambio del estanque, conversión alimenticia, aplicación de periodos de secado, parámetros físico-químicos del agua) y se compararon estadísticamente con la presencia de AHPND, que estaba definida por las fincas positivas en PCR a plásmido, *pir A*, *pir B* y *Vibrio* spp.

Las respuestas obtenidas de las encuestas se procesaron en el programa estadístico SAS® versión 24, donde se realizaron tablas dinámicas. Además, se utilizaron tablas de contingencia con las frecuencias observadas, con un nivel de confianza de  $\alpha=0,05$ , se aplicó el estadístico Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher (Morales et al., 2011).

Cuadro 1. Protocolo de los PCR utilizados para amplificar el gen  $\beta$ -actina, plásmido pVA-1, toxina *pir A*, toxina *pir B* y *Vibrio* spp.

Gen	Cebador	Secuencia	Tamaño del producto (pb)	Protocolo de amplificación	Referencia
$\beta$ -actina	Actin-F Actin-R3	CCCAGAGCAAGAGAGGTA GCGTATCCTTCGTAGATGGG	339	10 min de desnaturalización inicial a 95°C, 35 ciclos repetidos de desnaturalización (95°C por 45 s), alineación (55°C por 1 min) y extensión (72°C por 2 min) y una temperatura final de extensión de 72°C por 7 min.	Dhar et al. (2001)
Plásmido pVA-1	89F 89R	GTCGCTACTGTCTAGCTGAA ACGGCAAGACTTAGTGTACC	470	5 min de desnaturalización inicial a 95°C, 30 ciclos repetidos de desnaturalización (95°C por 45 s), alineación (58°C por 30 s) y una temperatura final de extensión de 72°C por 2 min.	Nunan et al. (2014)
<i>pir A</i>	VpPirA-284F VpPirA-284R	TGACTATTCTCACGATTGGACTG CACGACTAGCGCCATTGTTA	284	3 min desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización (94°C por 30 s), alineación (60°C por 30 s) y extensión (72°C por 30 s), extensión final 72°C por 7 min.	Han et al. (2015a)
<i>pir B</i>	VpPirB-392F VpPirB-392R	TGATGAAGTGATGGGTGCTC TGTAAGCGCCGTTTAACTCA	392	3 min desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización (94°C por 30 s), alineación (60°C por 30 s) y extensión (72°C por 30 s), extensión final 72°C por 7 min.	Han et al. (2015a)
16S rRNA	16SEB20- 42-F 16SEB1488-R	TGGCTCAGGAYGAACGCTGGCGG TACCTTGTTACGACTTCACC	1488	3 min de desnaturalización inicial a 95°C, 40 ciclos repetidos de desnaturalización (95°C por 20 s), alineación (67°C por 20 s) y extensión (72°C por 30 s) y una temperatura final de extensión de 72°C por 3 min.	Vigliotta et al. (2007)

### 3. Resultados

#### 3.1. Análisis descriptivo de la producción

Los resultados obtenidos de las encuestas aplicadas a las 15 fincas, 10 se encontraron situadas en Guanacaste (Fincas 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 14 y 15) y 5 en Puntarenas (Fincas 5, 6, 7, 8 y 13), se muestran en el Cuadro 2. Más de la mitad de los productores (53,3%) cultivaron en áreas de estanque de entre 30-45 000 m<sup>2</sup>, utilizando principalmente agua del estero (73,3%), y sembrando densidades de postlarva entre 100-300 000 unidades por hectárea (60% de las fincas); de estas larvas el 73,3% provenían de Guatemala y el resto de Nicaragua (Cuadro 2).

Los volúmenes de agua utilizados en el estanque y recambios realizados fueron diversos, sin embargo, un 40% de los productores utilizó volúmenes de 20-35 mil m<sup>3</sup> de agua y tasas de recambio diarias entre el 10-20% (Cuadro 2). La utilización de comederos resultó ser la técnica de alimentación más empleada (66,6%), con factores de conversión alimenticia entre el 1-1.2 (40,0%).

La mayoría de los productores utilizaron alimento balanceado (30-35% proteína) convencional (93,3%), el 66,6% prefirió ciclos de producción de tres meses, realizando tres cosechas anuales (60,0%). Un total de 40,0% de los productores realizó medición de los parámetros de calidad de agua más importantes y se determinó que un 20% de los productores nunca realiza la medición de los parámetros (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características de manejo realizadas en los 15 sistemas productivos de camarón marino de cultivo, en las provincias de Guanacaste y Puntarenas, Costa Rica.

Características	Guanacaste	Puntarenas	Total
	N=10 (%)	N=5 (%)	N=15 (%)
<b>Área de estanque (m<sup>2</sup>)</b>			
10-30 000	3 (30,0)	2 (40,0)	5 (33,3)
30-45 000	6 (60,0)	2 (40,0)	8 (53,3)
45-55 000	1 (10,0)	1 (20,0)	2 (13,3)
<b>Uso de agua</b>			

Mar	3 (30,0)	1 (20,0)	4 (26,7)
Estuario	7 (70,0)	4 (80,0)	11 (73,3)
<b>Densidad de siembra (ha)</b>			
<100	1 (10,0)	1 (20,0)	2 (13,3)
100-300 000	6 (60,0)	3 (60,0)	9 (60,0)
300-500 000	3 (30,0)	1 (20,0)	4 (26,7)
<b>Origen de postlarva</b>			
Nicaragua	4 (40,0)	0	4 (26,7)
Guatemala	6 (60,0)	5 (100,0)	11 (73,3)
<b>Volumen de agua (m<sup>3</sup>)</b>			
10-15 000	1 (10,0)	3 (60,0)	4 (26,7)
20-35 000	4 (40,0)	2 (40,0)	6 (40,0)
35-50 000	5 (50,0)	0	5 (33,3)
<b>Tasa de recambio (%)</b>			
<10	2 (20,0)	2 (40,0)	4 (26,7)
10-20	4 (40,0)	2 (40,0)	6 (40,0)
20-40	4 (40,0)	1 (20,0)	5 (33,3)
<b>Método de alimentación</b>			
Comederos	7 (70,0)	3 (60,0)	10 (66,6)
Mixto (Boleo+Comedero)	3 (30,0)	2 (40,0)	5 (33,3)
<b>Conversión alimenticia</b>			
<1	3 (30,0)	1 (20,0)	4 (26,7)
1-1.2	5 (50,0)	1 (20,0)	6 (40,0)
1.2-1.4	1 (10,0)	3 (60,0)	4 (26,7)
>2	1 (10,0)	0	1 (6,7)
<b>Tipo de alimento</b>			
Orgánico	0	1 (20,0)	1 (6,7)
Convencional	10 (100,0)	4 (80,0)	14 (93,3)
<b>Duración del ciclo de producción (meses)</b>			
≤3	2 (20,0)	3 (60,0)	5 (33,3)
≥3-4	8 (80,0)	2 (40,0)	10 (66,6)
<b>Ciclos de cultivo (anual)</b>			
2	5 (50,0)	1 (20,0)	6 (40,0)
≥3	5 (50,0)	4 (80,0)	9 (60,0)
<b>Medición de parámetros de calidad de aguas</b>			
Turbidez	0	1 (20,0)	1 (6,7)
Oxígeno+Temperatura	1 (10,0)	0	1 (6,7)
Oxígeno+Temperatura+Salinidad	3 (30,0)	1 (20,0)	4 (26,7)
Oxígeno+Temperatura+Salinidad+pH	4 (40,0)	2 (40,0)	6 (40,0)
Ninguno	2 (20,0)	1 (20,0)	3 (20,0)

Con respecto al manejo sanitario de las fincas destaca que, el 93,3% de los productores tenía conocimiento sobre enfermedades infecciosas y pensaban que éstas estaban presentes en sus fincas. Se determinó que el uso de antibióticos en las fincas es común (100% Guanacaste, 80% Puntarenas), sobre todo oxitetraciclinas (46,7%, 7/15) o combinaciones de oxitetraciclinas y enroflaxina (33,3%, 5/15), y donde la mayoría (73,3%, 11/15) los utiliza una vez por campaña, en el momento en que se presenta mortalidad en el estanque, lo cual asocian con

infecciones bacteriales (Cuadro 3). Los productores conocían sobre AHPND, pero solo tres (10% Guanacaste, 40% Puntarenas) indicaron que la enfermedad podría estar presente en sus fincas. Por otro lado, solo una finca (6,7% ) ubicada en Puntarenas no conocía sobre enfermedades infecciosas que pueden afectar a los camarones ni de enfermedades que podrían estar presentes en su finca, mientras que, en Guanacaste, solo una finca no aplicaba antibióticos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Encuesta sobre enfermedades infecciosas: conocimiento, “percepción” de la presencia de enfermedades infecciosas y uso de antibióticos en 15 sistemas productivos de camarón marino de cultivo, en las provincias de Guanacaste y Puntarenas, Costa Rica.

<b>Características</b>	<b>Guanacaste</b>	<b>Puntarenas</b>	<b>Total</b>
	<b>N=10 (%)</b>	<b>N=5 (%)</b>	<b>N=15 (%)</b>
<b>Conocimiento sobre enfermedades infecciosas</b>			
WSSV	10 (100,0)	4 (80,0)	14 (93,3)
AHPND	10 (100,0)	4 (80,0)	14 (93,3)
NHP	2 (20,0)	3 (60,0)	5 (33,3)
IHHNV	5 (50,0)	2 (40,0)	7 (46,7)
Parásitos	6 (60,0)	2 (40,0)	8 (53,3)
Ninguna	0 (0,0)	1 (25,0)	1 (6,7)
<b>Percepción de presencia de enfermedades* infecciosas</b>			
WSSV	10 (100,0)	4 (80,0)	14 (93,3)
AHPND	1 (10,0)	2 (40,0)	3 (20,0)
NHP	9 (90,0)	4 (80,0)	13 (86,7)
IHHNV	6 (60,0)	3 (60,0)	9 (60,0)
Parásitos	9 (90,0)	4 (80,0)	13 (86,7)
No sabe	0 (0,0)	1 (25,0)	1 (6,7)
<b>Uso de antibióticos</b>			
Oxitetraciclinas	5 (50,0)	2 (13,3)	7 (46,7)
Enroflaxina	0	2 (13,3)	2 (13,3)
Ambas	5 (50,0)	0	5 (33,3)
No aplican	0	1 (20,0)	1 (6,7)
<b>Aplicación de antibióticos por campaña</b>			
Una vez	7 (70,0)	4 (80,0)	11 (73,3)
Dos veces	3 (30,0)	0	3 (20)
No aplican	0	1 (20,0)	1 (6,7)

### 3.2. *Parámetros de calidad del agua*

Ninguna de las 15 fincas analizadas mostró parámetros físico-químicos óptimos en el agua de los estanques (Cuadro 4). Cuatro fincas (26,6%) mostraron solamente

un parámetro alterado (temperatura), nueve fincas (60,0%) dos parámetros (temperatura/oxígeno o temperatura/salinidad) mientras que en dos fincas se determinaron tres y cuatro parámetros alterados, respectivamente (Cuadro 4). Los valores máximos, mínimos, promedios, y desviaciones estándar se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Parámetros físico-químicos de la calidad del agua de 15 fincas productoras de camarón en Costa Rica, durante el 2017 y 2018.

Finca	Provincia	Oxígeno (mg/L)	Temperatura (°C)	pH	Salinidad (ppt)
Óptimo		≥4,0	28-30	7,5-8,5	15-30
1	Guanacaste	<b>2,96</b>	<b>31,16</b>	7,54	25,44
2	Guanacaste	4,60	<b>31,46</b>	7,90	26,80
3	Guanacaste	4,50	<b>31,50</b>	8,09	23,20
4	Guanacaste	4,10	30,09	<b>4,51</b>	<b>42,32</b>
5	Puntarenas	4,30	<b>29,34</b>	<b>7,31</b>	<b>63,03</b>
6	Puntarenas	<b>3,40</b>	<b>32,16</b>	7,90	<b>43,47</b>
7	Puntarenas	6,50	<b>27,20</b>	7,88	26,73
8	Puntarenas	<b>3,50</b>	<b>31,40</b>	<b>7,18</b>	<b>57,60</b>
9	Guanacaste	<b>3,00</b>	<b>34,53</b>	8,24	22,39
10	Guanacaste	<b>0,60</b>	<b>33,17</b>	7,75	22,01
11	Guanacaste	<b>0,13</b>	<b>34,03</b>	7,67	21,57
12	Guanacaste	<b>3,51</b>	<b>33,10</b>	7,73	30,47
13	Puntarenas	<b>3,80</b>	29,38	<b>6,75</b>	<b>37,82</b>
14	Guanacaste	<b>2,28</b>	<b>31,25</b>	7,72	28,81
15	Guanacaste	5,13	<b>32,17</b>	7,65	29,12
<b>Promedio</b>		3,49	31,46	7,45	33,40
<b>Desv. Est</b>		1,62	1,92	0,89	12,98
<b>Máx.</b>		6,50	34,53	8,24	63,03
<b>Mín.</b>		0,13	27,20	4,51	21,57

Desv. Est.= Desviación estándar, Máx.= máximo, Mín.= mínimo

### 3.3. Implementación del protocolo de extracción de ADN y de las técnicas moleculares

Los mejores resultados para mantener la integridad del ADN de las muestras se obtuvieron preservando las muestras (postlarvas y órganos de camarones juveniles) en alcohol al 70% a -20°C hasta su procesamiento. El ARN later no resultó ser un medio de preservación adecuado ya que provocó la degradación del ADN en el hepatopáncreas, estómagos y postlarvas. Para la extracción de los hepatopáncreas

de los camarones se estableció, debido a esto, un tratamiento de las muestras con la solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, antes de someter las muestras a la extracción mediante ensayo comercial; esto resultó ser esencial e indispensable. En la Figura 1 se muestran los protocolos de PCR implementados para amplificar segmentos de los genes de  $\beta$ -actina, pVA-1, *pir A*, *pir B*, y *Vibrio* spp. Las amplificaciones presentaban mejores resultados cuando las extracciones se utilizaban sin diluir o en dilución 1/10.

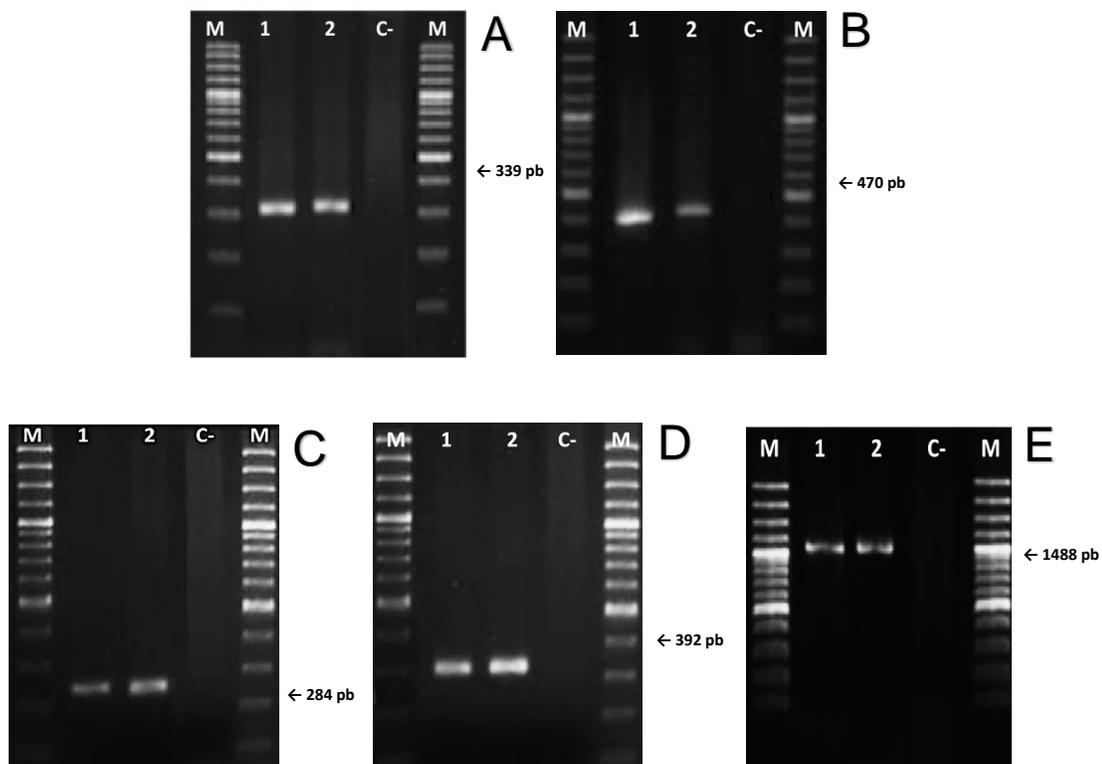


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR, mostrando la presencia de (A)  $\beta$ -actina, (B) plásmido pVA-1, (C) *pir A*, (D) *pir B*, (E) *Vibrio* spp. en camarones *Penaeus vannamei* en Costa Rica. M: marcador de peso molecular de 100 kb. 1: ADN extraído de muestras de hepatopáncreas puro; 2: ADN extraído de muestras de hepatopáncreas dilución 1/10; C-: control negativo.

### 3.4. Detección de los genes *pir A*, *pir B*, *pVA-1* y *Vibrio* spp. por PCR

En cinco (33,3%) de 15 fincas (40% Guanacaste, 20% Puntarenas) se detectó la presencia del plásmido *pVA-1*, y de los genes *pir A* y *pir B* mediante PCR (Figura 2), mientras que en estas cinco fincas y una adicional (40%) se detectó la presencia de *Vibrio* spp. (Figura 3).

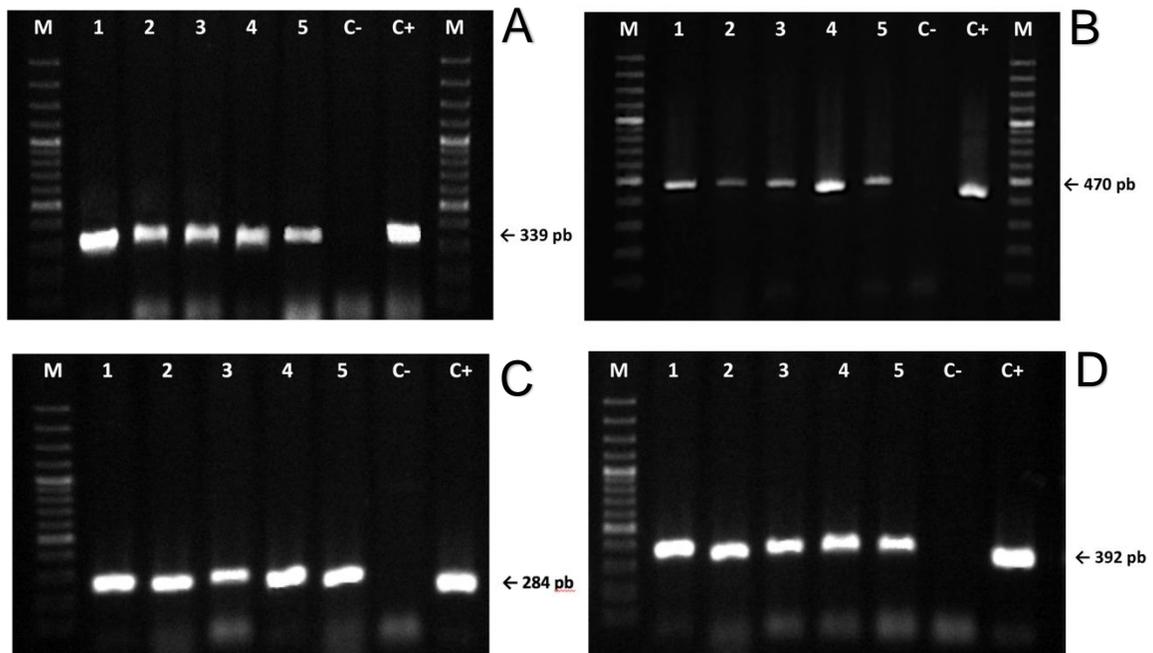


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR, mostrando la presencia de (A)  $\beta$ -actina, (B) plásmido *pVA-1*, (C) toxina *pir A*, (D) toxina *pir B* en camarones *Penaeus vannamei* en cinco fincas de Costa Rica. M: marcador de peso molecular de 100 kb. 1, 2, 3, 4, 5: Muestras de hepatopáncreas positivas de las fincas 1, 4, 6, 11 y 12; C-: control negativo; C+: control positivo

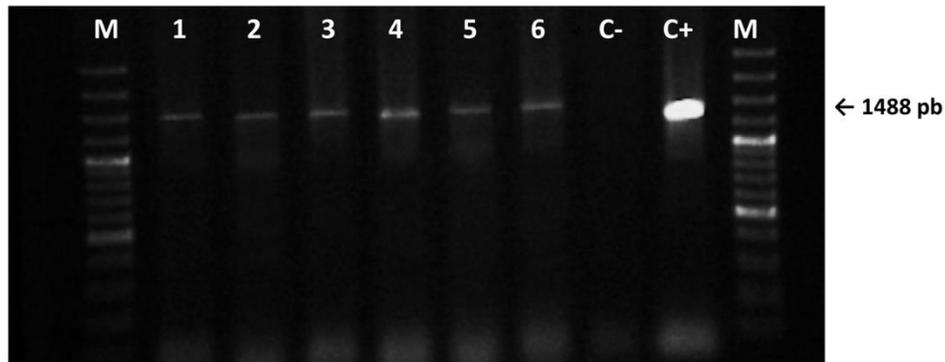


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR, mostrando la presencia de *Vibrio* spp. en camarones *Penaeus vannamei* en cinco fincas de Costa Rica. M: marcador de peso molecular de 100 kb. 1, 2, 3, 4, 5, 6: Muestras de hepatopáncreas positivas de las fincas 1, 3, 4, 6, 11, 12. C-: control negativo; C+: control positivo

El plásmido pVA, *pir A* y *pir B* y la presencia de *Vibrio* spp. se detectó en las cinco fincas (Guanacaste: 1, 4, 11 y 12; Puntarenas: 6) en los hepatopáncreas de los camarones, no así en los estómagos. De estas fincas, dos respondieron en la encuesta sospechar de la presencia de AHPND en sus fincas, mientras que, todas las fincas utilizaban antibióticos. Todas las muestras de agua (sobrenadante y sedimento) del primer bombeo de las 15 fincas y las postlarvas de 14 fincas resultaron negativas para plásmido pVA-1, *pir A*, *pir B* y *Vibrio* spp. Solamente postlarvas de la finca 3 (Guanacaste) resultaron positivas para *Vibrio* spp., las cuales se habían adquirido en Guatemala (Figuras 3 y 4). Sin embargo, en esa finca no se determinó la presencia del plásmido pVA, *pir A* y *pir B*.

En dos casos (Guanacaste: 11; Puntarenas: 6) se determinó la presencia del agente solamente en camarones juveniles recolectados en la entrada del agua del estanque, en un caso (Guanacaste: 12) en la mitad del estanque y en dos casos no se determinó el lugar exacto.

### 3.5. Secuenciación

Las secuencias del gen *pir A* de las muestras de Costa Rica resultaron 100% (fincas 1, 4, 11: 284/284pb, GenBank MH685878) y 99% (finca 6: 284/287pb, GenBank MH685877, y finca 12: 281/284pb, GenBank MH700244) idénticas con la secuencia de *pir A* encontrada en *V. parahaemolyticus* XN89 (GenBank KU145400.1) de Vietnam (Cuadro 5).

Las secuencias de *pir B* detectadas en camarones en las cinco fincas en Costa Rica mostraron una identidad nucleotídica del 100% (392/392pb, GenBank MH714298) entre ellas y con la secuencia de *pir B* encontrada en el mismo *V. parahaemolyticus* XN89 (KU145400.1) infectando camarones en Vietnam. De igual manera, todas las secuencias del plásmido pVA-1 (490pb/490pb, GenBank MH822862) mostraron una identidad nucleotídica del 100% entre ellas y con pVPE61a (AP014860.1) encontrado en *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en camarones de Vietnam.

Todas las fincas positivas amplificaron además la subunidad 16S del gen rRNA (Cuadro 5). La secuenciación identificó la presencia de *V. parahaemolyticus* en las fincas 4 y 12, mientras que en las restantes fincas (1, 3, 6, 11) no se pudo determinar la especie de *Vibrio*.

Cuadro 5. Porcentaje de identidad nucleotídica de las secuencias de los genes *pir A* y 16S para *Vibrio* spp. comparadas contra las referencias de la base de datos GenBank.

Finca	<i>gen pir A</i>			<i>gen 16SrRNA</i>		
	%	pb/pb	Referencia	%	pb/pb	Referencia
1	100	284/284	KU145400.1	99	319/321	HE610324.1
3	-	-	-	97	1340/1385	MH315863.1
4	100	284/284	KU145400.1	99	1335/1348	MF372380.1
6	99	284/287	KU145400.1	98	1162/1182	EF659432.1
11	100	284/284	KU145400.1	97	1360/1396	HE610324.1
12	99	281/284	KU145400.1	99	1451/1469	MF372380.1

### 3.6. Distribución geográfica de AHPND en fincas camaroneras de Costa Rica

La distribución geográfica de las fincas negativas y positivas a AHPND se muestra en la Figura 3. La mayoría de fincas positivas a AHPND se encontraron en el cantón de Abangares, Guanacaste (Fincas 1, 4, 11, 12), mientras que, solamente una (6,7%) resultó positiva en el cantón de Puntarenas, Puntarenas (Finca 6). En la Finca 3 (punto verde) se determinó la presencia de una bacteria del género *Vibrio* en el estanque, pero no se determinó la presencia de genes asociados al plásmido o a las toxinas que ocasionan AHPND.

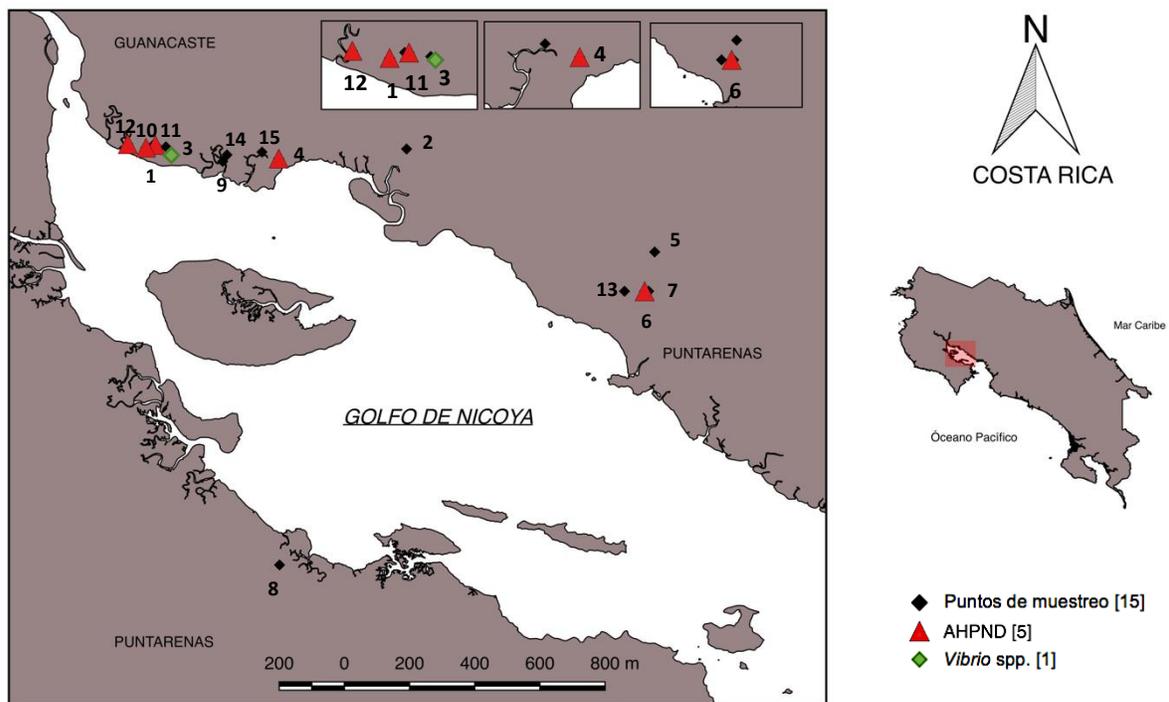


Figura 4. Distribución geográfica de las fincas productivas de camarón negativas y positivas a genes asociados al plásmido, las toxinas que ocasionan AHPND y genes asociados a *Vibrio* spp. en Costa Rica, 2017-2018 (Recuadros indican zonas ampliadas de fincas positivas).

### 3.7. Relación entre los factores de riesgo, la presencia de AHPND y *Vibrio* spp.

No se encontraron diferencias significativas entre la presencia de AHPND (plásmido pVA, *pir* A y *pir* B) en la finca y variables de producción, sin embargo, se observó una tendencia a la ausencia de plásmido pVA, *pir* A y *pir* B en aquellas fincas que mantenían densidades de siembra entre 100-300 000 animales por hectárea (46,7%), áreas de cultivo superiores a 4 hectáreas (26,7%), volúmenes de agua entre 30-50 000 m<sup>3</sup> (20,0%) y tasas de recambio de agua menores al 10% diario (26,7%) (Cuadro 6).

Se determinaron diferencias estadísticas significativas entre las muestras positivas a *Vibrio* spp. y el volumen de agua ( $p < 0,029$ ) cuando se encontraba entre 20-25 mil m<sup>3</sup>, la tasa de recambio de agua ( $p < 0,0354$ ) cuando se realizaba entre el 35-40% y el historial de la presencia de enfermedades ( $p < 0,049$ ) cuando se hacía referencia al conocimiento de WSSV, NHP, IHHNV y parásitos (Cuadro 6).

Tampoco se determinó diferencias significativas entre presencia de genes pVA, *pir* A y *pir* B con tipo de alimento, tiempo del ciclo de producción, aplicación de raleos, aplicación de antibióticos y presencia de depredadores.

Cuadro 6. Distribución de muestras positivas y negativas de AHPND y *Vibrio* spp. para los factores de riesgo y sus categorías en las fincas productivas de camarón en Costa Rica, 2017-2018.

Factor	Categoría	AHPND				<i>Vibrio</i> spp.			
		N	Positivo (%)	Negativo (%)	Pr<=P	N	Positivo (%)	Negativo (%)	Pr<=P
Densidad de siembra (ha)	<100 000	2	50	50	0,4406	2	50	50	1
	100-300 000	9	22,22	77,78		9	33,33	66,67	
	300-500 000	4	50	50		4	50	50	
Área de cultivo (ha)	< 2	4	50	50	0,3906	4	50	50	0,5684
	2-3	3	66,67	33,33		3	66,67	33,33	
	3-4	3	0	100		3	0	100	
	> 4	5	20	80		5	40	60	
País de origen de semilla	Guatemala	11	36,36	63,64	1	11	36,36	63,64	1
	Nicaragua	4	25	75		4	50	50	
Uso de agua	Mar	4	50	50	0,5604	4	75	25	0,2352

	Estuario	11	27,27	72,73		11	27,27	72,73	
<b>Volumen de agua (m<sup>3</sup>)</b>	10-15 000	4	50	50	0,2088	4	50	50	<b>0,0290</b>
	20-25 000	3	66,67	33,33		3	100	0	
	30-35 000	3	0	100		3	0	100	
	35-40 000	1	100	0		1	100	0	
	40-45 000	1	0	100		1	0	100	
	40-50 000	3	0	100		3	0	100	
	<b>Tasa de recambio del agua</b>		4				4		
	< 10%		0	100	0,2234		0	100	<b>0,0354</b>
	10-20%	6	50	50		6	50	50	
	20-30%	4	0	13,33		2	0	100	
	35-40%	1	66,67	33,33		3	100	0	
<b>Conversión alimenticia</b>	< 1	4	0	100	0,4059	4	0	100	0,1257
	1-1.2	6	50	50		6	50	50	
	1.2-1.4	4	50	50		4	75	25	
	> 2	1	0	100		1	0	100	
<b>Periodo de secado (días)</b>	8	2	0	100	0,7103	2	0	100	0,5504
	15	1	0	100		1	0	100	
	30	6	66,67	33,33		6	66,67	33,33	
	45	3	33,33	66,67		3	66,67	33,33	
	60	1	0	100		1	0	100	
	> 60	1	0	100		1	0	100	
	No	1	0	100		1	0	100	
<b>Historial de enfermedades*</b>	No aplica	1	0	100		1	0	100	
	1.2		0	100	0,4752		0	100	<b>0,0490</b>
	1.4	1	0	100		1	0	100	
	1.3.4	2	0	100		2	0	100	
	1.4.5	2	50	50		2	50	50	
	1.2.3.4	1	0	100		1	0	100	
	1.2.4.5	1	100	0		1	100	0	
	1.3.4.5	4	75	25		4	100	0	
	1.2.3.5	2	0	100		2	0	100	
	No aplica	1	0	100		1	0	100	

Números en negrita indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

\*1: Síndrome de la mancha blanca 2: Vibriosis 3: Necrosis del hepatopáncreas 4: Parásitos 5: Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

### 3.8. Relación entre la calidad del agua, la presencia de AHPND y *Vibrio* spp.

La presencia de AHPND (plásmido pVA, *pir* A y *pir* B) y *Vibrio* spp. no se relacionó con la cantidad de oxígeno disuelto, la temperatura, el pH y la salinidad del agua de

las fincas camaroneras muestreadas ( $p < 0,05$ ) en el momento en que se tomaron las muestras; sin embargo, fincas positivas mostraron niveles promedio bajos de oxígeno disuelto ( $2,82 \pm 1,55$  mg/L) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Asociación entre los parámetros físico-químicos del agua con la presencia de genes de *pirA*, *pirB*, plásmido de AHPND y *Vibrio* spp., obtenidos de las fincas productivas de camarón muestreadas en Costa Rica, 2017-2018.

Variables Cuantitativas	AHPND		<i>Vibrio</i> spp.		
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Oxígeno (mg/L)	Media	2,82	3,82	3,10	3,75
	D.E	1,5578	1,6233	1,5530	1,7030
	I.C (95%)	0,8858-4,7542	2,6598-4,9822	1,4703-4,7297	2,4365-5,0546
	Pr>l t l	0,2749		0,4703	
Temperatura (T°)	Media	32,11	31,14	32,00	31,10
	D.E	1,5534	2,0776	1,4114	2,1995
	I.C (95%)	30,1792-34,0368	29,6538-32,6262	30,5255-33,4878	29,4093-32,7907
	Pr>l t l	0,3769		0,3901	
pH	Media	7,71	7,65	7,79	7,60
	D.E	0,1494	0,4495	0,0955	0,1491
	I.C (95%)	7,4722-7,9478	7,3255-7,9685	7,5208-8,0512	7,2540-7,9416
	Pr>l t l	0,7928		0,3985	
Salinidad (ppt)	Media	32,65	30,50	31,079	31,41
	D.E	9,8753	11,2461	3,9352	4,1229
	I.C (95%)	20,3922-44,9158	21,8533-39,1423	20,9627-41,1940	21,6610-41,1590
	Pr>l t l	0,7268		0,9559	

D.E: Desviación estándar; I.C: Intervalo de confianza; Pr>l t l: Diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ )

## 4. Discusión

### 4.1. *Análisis descriptivo de la producción*

Las fincas camaroneras estudiadas poseen áreas de cultivo extensivas, conversiones alimenticias y densidades de siembra superiores a 100 000 postlarvas/ha, en comparación con la tecnificación de las fincas, lo que podría estar ocasionando resultados productivos bajos y la aparición de enfermedades, ya que según Valverde y Alfaro (2013), áreas de cultivo entre 1,3 ha hasta 5,8 ha, y densidades de siembra entre los 100-150 000 postlarvas/ha, ocasionan sobrevivencias inferiores al 60%

Las áreas de cultivo analizadas presentaron diferencias de manejo, así las fincas de Guanacaste mostraron mejores indicadores productivos comparativamente con las ubicadas en Puntarenas, principalmente en el volumen del agua del estanque (35-50 000 m<sup>3</sup>; Guanacaste: 50%; Puntarenas: 0%), las conversiones alimenticias (1-1,2; Guanacaste: 50%; Puntarenas: 20%) y tasas de recambio del agua (20-40%; Guanacaste: 40%; Puntarenas: 20%), posiblemente debido a que los productores están mejor capacitados y cuentan con sistemas productivos menos extensivos.

### 4.2. *Parámetros de la calidad del agua*

Se determinaron parámetros de la calidad del agua por debajo o encima de los óptimos, lo que puede generar alteraciones en el desarrollo normal de los camarones, ya que parámetros de agua no óptimos pueden ocasionar problemas físicos y metabólicos a los camarones, que los hacen más susceptibles a contraer enfermedades (Lavilla-Pitogo et al., 2000; Lazur, 2007). La mala calidad del agua detectada en las fincas analizadas se puede deber al desconocimiento de la importancia de la medición o a la falta de equipo especializado para realizarla, que permita monitorear diariamente los parámetros y controlar los cambios en la calidad del agua. Comprobar constantemente la calidad del agua es determinante para

prevenir la aparición de bacterias oportunistas como las del género *Vibrio* spp., y las fluctuaciones de los parámetros de agua son considerados factores de riesgo asociados a la presencia de AHPND (Putth y Polchana, 2016). Es así como Putth y Polchana (2016) lograron determinar diferencias estadísticas de la presencia de AHPND cuando el oxígeno estuvo por debajo de 3 mg/L.

#### 4.3. Diagnóstico molecular y detección de genes

Solamente una (negativa a AHPND) de las quince fincas analizadas no aplicaba antibióticos en la campaña de producción; de las catorce que sí utilizaban, cinco resultaron positivas a AHPND y seis a *Vibrio* spp. En dos de las tres fincas en las que los productores sospechaban que los camarones estaban infectados con cepas de AHPND debido a que se presentaban signos compatibles como mortalidades, presencia de aves, baja producción, entre otros, se confirmó su presencia. El uso rutinario de antibióticos puede ocasionar resistencia bacterial (Hien et al., 2016). Es por eso que se recomienda realizar diagnóstico molecular cuando se observan mortalidades en los estanques (Han et al., 2015d), para determinar si la causa es una bacteria, y así recomendar el uso de un antibiótico específico si fuese necesario y luego de confirmar la presencia de AHPND.

El uso de antibióticos, como se constató en el presente trabajo, puede destruir los sistemas microbianos beneficiosos y reducir la efectividad de los tratamientos antibacteriales (De Schryver et al., 2014), como ya se ha reportado en otros continentes (Hien et al., 2016). Estudios recientes han demostrado la existencia de cepas de AHPND que presentan genes de resistencia a la tetraciclina (Han et al., 2015d). Es por eso, que se debe informar a las autoridades y a los productores sobre las desventajas del uso rutinario de antibióticos en la producción de camarones, e incentivar y capacitar a estos, para que mejoren los parámetros del agua y consideren el uso de probióticos como una alternativa para reducir las bacterias patógenas y, así reducir el uso de medicamentos (Hong et al., 2016; Cornejo-Granados et al., 2017, Pinoargote y Ravishankar 2018).

Las técnicas moleculares implementadas en el presente trabajo apoyaron el diagnóstico de la enfermedad (Varela et al., 2017). Los cuatro PCRs implementados demostraron alta especificidad para el diagnóstico de AHPND y *Vibrio* spp., lo que concuerda con los estudios de Han et al. (2015a) y Nunan et al. (2014), mientras que, la OIE (2018) recomienda el uso de los PCRs que detectan los genes *pir A* y *pir B* (Han et al., 2015a).

Se reporta por primera vez la presencia de AHPND en fincas camaroneras de *Penaeus vannamei* del Golfo de Nicoya de Costa Rica, determinada mediante técnicas moleculares, lo cual complementa los reportes sobre la presencia de AHPND en México (Gómez et al., 2014; Nunan et al., 2014) y países no especificados de Centroamérica (Han et al., 2015b). Se recomienda informar a las autoridades de SENASA para que implementen los protocolos de control epidemiológico y puedan prevenir la diseminación del agente entre los sistemas productivos (Morales et al., 2016; OIE, 2018).

En el presente trabajo no se encontró AHPND en postlarvas, las cuales fueron importadas desde Guatemala y Nicaragua. Solamente postlarvas de una finca resultaron positivas para *Vibrio* spp. por PCR, lo cual pudo deberse a contaminación en el proceso de aclimatización antes de la siembra, en el laboratorio de maduración o que las postlarvas vinieran contaminadas desde el país de importación. Según Aguirre et al. (2001), la fase crítica de las postlarvas para contraer la bacteria, es en la metamorfosis en la última etapa, la cual se desarrolla en el laboratorio de maduración.

La presencia de AHPND se detectó únicamente en hepatopáncreas de camarones juveniles, información que concuerda con lo reportado por la OIE (2018). No se obtuvieron resultados positivos para los estómagos, posiblemente debido a la fase de desarrollo de la enfermedad, dado que las bacterias en la fase terminal de AHPND migran al hepatopáncreas por el incremento de la infección y por ser un órgano con una mayor cantidad de nutrientes (Pantoja y Lightner, 2014). También es posible que el uso de un medio de enriquecimiento (NaCl, CaCl<sub>2</sub>) hubiera logrado una mejor preservación de la muestra (Sirikharin et al., 2015), pero en el presente estudio no se aplicó esta técnica ya que no se contempló entre los objetivos de la

investigación. Estudios realizados por Lai et al. (2015) indicaron la posibilidad de detectar solo el gen *pir B* en el hepatopáncreas de camarones que presentan signos de AHPND. Sin embargo, en el presente estudio se diagnosticó en todos los casos positivos la presencia de los genes *pir A* y *pir B*, concordando con lo expuesto por las investigaciones más recientes sobre AHPND, que indican la necesidad de encontrar los dos genes de las toxinas para confirmar la presencia de la enfermedad (Phiwsaiya et al., 2017; Theethakaew et al., 2017; Han et al., 2015a; Han et al., 2015b).

Tres de las fincas positivas (1,11 y 12) se encontraban muy cercanas entre sí, siendo posible que AHPND se estuviese propagando por medio del agua. En el presente trabajo no se detectó la presencia de AHPND en el agua, probablemente debido a que no se realizó un análisis bacteriológico en agar selectivo de las muestras (Chonsin et al., 2016) o un enriquecimiento de la muestra (Sirikharin et al., 2015), situación que debe ser investigada en futuros trabajos, incluyendo el análisis del agua que ingresa a los estanques y la que se encuentra dentro del estanque y puede estar siendo contaminada por la presencia de las bacterias en los sedimentos u otros medios. Sin embargo, se han confirmado casos positivos de AHPND en bacterias aisladas del agua de los estanques en estudios realizados en Tailandia (Chonsin et al., 2016), por lo que, no se descarta su presencia en este recurso. Ante esto, se recomienda a los productores implementar técnicas de cero recambio de agua del estanque durante el periodo de producción, la desinfección del agua con carbonato de calcio, óxido de calcio, cloro, entre otros (Gräslund y Bengtsson, 2001), monitoreo de cargas bacteriales en los estanques por medio de análisis bacteriológico y tratamiento de sedimentos que eliminen el exceso de materia orgánica por medio de la aplicación de probióticos que poseen bacterias nitrificantes como *Bacillus* spp. (Dalmin et al., 2001).

Las muestras positivas se encontraron principalmente en la entrada de agua y al medio del estanque, lo que no concuerda con lo que reporta la literatura (Morales y Cuéllar, 2014), donde los camarones más fuertes y saludables se localizan en la entrada del agua fresca y oxigenada, mientras que, los más débiles y enfermos se encontrarán en la salida del estanque.

Es relevante realizar más estudios donde los muestreos sean de forma sistemática, representativa y homogénea dentro de los estanques (Morales y Cuéllar, 2014), con la finalidad de analizar una posible estratificación de los organismos dentro del estanque en función de si están enfermos o sanos.

#### 4.4. *Secuenciación*

Las secuencias del plásmido y de las toxinas *pir A* y *pir B* detectadas en Costa Rica no fueron similares a las reportadas en México y los dos países no especificados de Centroamérica (Han et al., 2015b), sino similares al genotipo asiático (Phiwsaiya et al., 2017), posiblemente debido a algún tipo de importación proveniente de algún país asiático como animales congelados o alguna cepa bacteriana que provenía de los países donde se importa la larva. Recientemente, en Texas, Estados Unidos, se identificaron muestras positivas a AHPND, siendo éstas similares al genotipo mexicano y no al asiático (Dhar, 2018), no concordando con los resultados obtenidos en Costa Rica, lo que podría indicar la inclusión de diversas cepas patógenas en la región.

*Vibrio parahaemolyticus* ha sido identificado como el principal agente causal de AHPND (Krishna et al., 2014; Han et al., 2015a, b; Phiwsaiya et al., 2017; Theethakaew et al., 2017), lo cual concuerda con los hallazgos de la presente investigación. La finca con las postlarvas positivas a *Vibrio* spp. y negativas a AHPND, posiblemente presentaba solo contaminación bacteriana, o necrosis séptica del hepatopáncreas o necrosis del hepatopáncreas, lo cual no fue analizado en el presente estudio (Morales y Gómez, 2014).

#### 4.5. *Relación de factores de riesgo, AHPND y Vibrio spp.*

No se logró determinar la asociación entre la presencia de AHPND y los factores de riesgo analizados, debido a que el estudio se realizó con únicamente 15 fincas y por la cantidad de finca activas en el país, se podría hacer necesario el muestreo del 50% de las camaroneras o incluso más. Pero sí se observaron

tendencias entre algunos factores de riesgo y la ausencia de *Vibrio* spp., principalmente cuando el volumen de agua fue alto (>40 000 m<sup>3</sup>), la tasa de recambio de agua baja (<30%) y un historial sobre enfermedades poco numeroso. Se hace necesaria más investigaciones que abarquen una mayor cantidad de fincas camaroneras para ofrecer robustez a los estudios sobre factores de riesgo asociados a la enfermedad bacterial. Investigaciones como las realizadas en este estudio son importantes de realizar y divulgar, ya que pueden ayudar a los productores a mejorar variables en sus fincas con el fin de optimizar la producción y prevenir o disminuir enfermedades infecciosas.

#### 4.6. Conclusiones y recomendaciones

Se recomienda en un futuro estudio, determinar las mortalidades y pérdidas económicas que ocasiona AHPND en las fincas camaroneras de Costa Rica. En este estudio no se analizaron los resultados de los parámetros productivos de las fincas analizadas ni la cantidad de producto obtenido en la cosecha, por lo que no se logró determinar el efecto del patógeno sobre la mortalidad, las conversiones alimenticias y su asociación con otros agentes causales de enfermedades. Además, se debe continuar con investigaciones sobre variables de manejo y capacitar a los productores sobre el manejo de la calidad del agua, con la finalidad de mantener un ambiente sano para los animales, que limite la proliferación de bacterias y maximice el crecimiento de los camarones. Se deben realizar estudios sobre la presencia de genes de resistencia a la tetraciclina en cepas de AHPND, y desarrollar investigaciones que prueben el valor de los probióticos en el cultivo de camarones. Las autoridades sanitarias deberán iniciar campañas de capacitación en el uso de medicamentos, manejo de sedimentos, buenas prácticas de manejo, y determinar, si eventualmente el uso de probióticos ayuda a mejorar la producción, así como incentivar a los productores a controlar los parámetros físico-químicos del agua.

## 5. Conclusiones

- De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó por primera vez para Costa Rica mediante diagnóstico molecular la presencia de AHPND en fincas camaroneras de Costa Rica, donde una tercera parte de las fincas analizadas (33,3%) fue positiva a AHPND, siendo el hepatopancreas el principal órgano blanco.
- Se determinó una similitud de 100% entre los genes de AHPND de Costa Rica y Vietnam, no así con el genotipo mexicano, lo que podría indicar la presencia de nuevas cepas bacteriales presentes en la región y que posiblemente no han sido investigadas.
- La mayoría de fincas mostró parámetros de calidad de agua por debajo de los recomendados, sobre todo del oxígeno disuelto, demostrando la necesidad que tienen los productores de mejorar las técnicas de manejo y el control de sus producciones.
- Se hace necesario el muestreo de más fincas que brinden más información sobre el manejo productivo y sanitario, esto podría mejorar el análisis estadístico entre la presencia de AHPND, *Vibrio* spp. y parámetros físico-químicas del agua.
- Se deben profundizar los estudios sobre los factores de riesgo, ya que varían de acuerdo a factores ambientales y humanos, además de evaluar las variables que podrían estar generando la aparición de enfermedades como las analizadas en esta investigación.
- El uso de antibióticos sigue siendo un factor a discutir entre los productores y especialistas del sector, ya que todas las fincas positivas a AHPND usaron antibióticos.

## 6. Recomendaciones

- Informar a las autoridades sanitarias y los productores sobre los hallazgos específicos obtenidos en este estudio.
- Capacitar a productores sobre buenas prácticas de manejo de la finca, monitoreo de los parámetros físico-químicos del agua, y medidas para prevenir y controlar AHPND, sobre todo el correcto manejo del sedimento.
- Reducir el uso de antibióticos con la finalidad de evitar la resistencia bacterial en los estanques y buscar alternativas que puedan sustituir el uso de estos medicamentos.
- Realizar diagnóstico molecular cuando hay sospecha de la presencia de AHPND.
- Para trabajos futuros, analizar sedimentos y calcular pérdidas entre fincas positivas y negativas, ampliar el número de fincas para generar robustez del análisis estadístico, realizar estudios de resistencia a antibióticos y estudios sobre la utilidad de probióticos.
- Obtener las secuencias completas del genoma de interés, con la finalidad de generar información que permita un análisis robusto del origen filogenético y filogeográfico.
- Se recomienda, además, aislar las bacterias que ocasionan AHPND en Costa Rica por medio de técnicas bacteriológicas, para determinar su patogenicidad por medio de bioensayos con organismos libres de enfermedades.

## 7. Referencias Bibliográficas

- Aguirre-Guzmán, G., Vazquez-Juárez, R. & Ascencio, F. (2001) Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. *J. Inv. Path.* 78:215–219
- Ananda R., Sridhar R., Balachandran, C., Palanisammi, A., Ramesh, S., & Nagarajan, K. (2017). Pathogenicity profile of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immun.* 67: 368-381.
- Cardona, E., Gueguen, Y., Magre, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F., Noguir, F. & Saulnier, D. (2016). Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology* 16(1):157.
- Chonsin, K., Matsuda, S., Theethakaew, C., Kodama, T., Junjhon, J., Suzuki, Y., et al., (2016). Genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from farmed Pacific white shrimp and ambient pond water affected by acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Thailand. *FEMS Microbiol. Lett.* 363(2): 1-8.
- Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A.A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A., Sánchez, F., Vichido, R., Brieba, L.G., Viana, M.T., Sotelo-Mundo, R.R., Ochoa-Leyva, A. (2017), Microbiome of pacific whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between wild, aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Sci. Rep.* 7(1):11783.
- Cuéllar-Anjel, J., Lara, C., Morales, V., De Gracia, A. & García, O. (2010). Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*, 122 pp. OIRSA-OSPESCA, Panamá.
- Dalmin, G., Kathiresan, K. & Purushothaman, A. (2001): Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J. Exp. Biol.* 39, 939–942.
- De Schryver, P., Defoirdt, T. & Sorgeloos, P. (2014). Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathog.* 10

(4).

- Dhar, A., Roux, M., & Klimpel, K. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using Real-Time quantitative PCR and SYBR Green Chemistry. *J. Clin. Microbiol.* 39(8): 2835-2845.
- Dhar, A. (2018). First report of the presence of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Texas, USA. The abstracts of the World Aquaculture Meeting in Las Vegas, Nevada, USA (February 19-22, 2018). Recuperado de: <https://www.shrimpnews.com/FreeReportsFolder/NewsReportsFolder/USAtxResearchAHPNDfound.html> [Consultado el 30 de diciembre del 2018].
- Dong, X., Hailiang, V., Xie, G., Peizhuo, Z., Chengcheng, G., Yan, L., & Huang, J. (2017). An isolate of *Vibrio campbelli* carrying the pir<sup>VP</sup> gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease. *Emerg. Microbes Infect.* 6: 1-3.
- Escobedo-Bonilla, C.M. (2016). Emerging Infectious diseases affecting farmed shrimp in Mexico. *Austin J. Biotechnol. Bioeng.* 3(2):1062.
- Gómez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., Lozano, R. & Betancourt-Lozano, M. (2014). Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc.* 2(2): 1-2.
- Gräslund, S. & Bengtsson, B. (2001). Chemicals and biological products used in south-east Asian shrimp farming and their potential impact on the environment: a review. *Sci. Total. Environ.* 280: 93-131.
- Han, J.E., Tang, K.F.J., Tran, L.H., & Lightner, D.V. (2015a). *Photobacterium* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 113: 33-40.
- Han, J.E., Tang, K.F.J., & Lightner, D.V. (2015b). Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 115: 245-251.
- Han, J.E., Mohny, L.L., Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., & Lightner, D.V. (2015c). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps.

- Aquaculture Aquacult. Rep.* 2: 17-21.
- Han, J.E., L. Mohny, K. Tang, C. Pantoja, & D.V. Lightner. (2015d). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquacult. Rep.* 2:17-2.
- Han, J.E., Tang, K.F.J., Aranguren, L.F., Piamsomboon, P. (2017). Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, pir AB vp (-) *V. parahaemolyticus*, and pir AB vp (+) *V. campbellii* strains. *Aquaculture* 470: 84-90.
- Hien, N.T., Huong, N.T.L., Chuong, V.D., Nga, N.T.V., Quang, P.H., Hang, B.T.V., & Long, N.V. (2016). Status of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and other emerging diseases of penaeid shrimps in Viet Nam. In: R. V. Pakingking Jr., E. G. T. de Jesus-Ayson, & B. O. Acosta (Eds.), Addressing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia: Proceedings of the ASEAN Regional Technical Consultation on EMS/AHPND and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia, Makati City, Philippines, pp. 88-95.
- Hong, X.P., Lu, L.Q. & Xu, D. (2016). Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquacult. Int.* 24: 577-593.
- Joshi, J., Srisala, J., Truong, Y.H., Chen, I.T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Lo, C.F., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K. & Thitamadee, S. (2014). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 428–429: 297-302.
- Kondo, H., Tinwongger, S., Proespraiwong, P., Mavichak, R., Unajak, S., Nozaki, R. & Hirono, I. (2014). Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announc.* 2(2): 1-2.
- Kondo, H., Van, P.T., Dang, L.T. & Hirono, I. (2015). Draft genome sequence of non-

- Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.* 3(5): 1-2.
- Krishna, B., Kumar, V., Mohan, J.R., Rai, P., Mallappa, B., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2014). Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. *Aquaculture* 433: 247-251.
- Lai, H.C., Ng, T.H., Ando, M., *et al.*, (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 47:1006-1014.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Lio-Po, G.D., Cruz-Lacierda, E.R., Alapide-Tendencia, E.V. & De la Peña, L.D. (2000). Diseases of penaeid shrimps in the Philippines. (2nd ed.). Tigbauan, Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Lazur, A. (2007). Growout Pond and Water Quality Management, JIFSAN Good Aquacultural Practices Program (Joint Institute for Food Safety & Applied Nutrition), University of Maryland, Symons Hall, College Park.
- Lee, C.T., Chen, I.T., Yang, Y.T., Ko, T.P., Huang, Y.T., Huang, J.Y., Huang, M.F., Lin, S.J., Chen, C.Y. & Lin, S.S. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112(39): 10798-803
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C., Noble, B.L., Nunan, L.M., Tran, L. & Gomez, S. (2013). Documentation of an emerging disease (Early Mortality Syndrome) in SE Asia & Mexico. Recuperado de: [http://www.enaca.org/publications/health/ahpnsterminalworkshop/Presentation%202002\\_LIGHTNER\\_Diagnostic%20studies.pdf](http://www.enaca.org/publications/health/ahpnsterminalworkshop/Presentation%202002_LIGHTNER_Diagnostic%20studies.pdf) [Consultado el 16 de noviembre del 2017].
- Lin, S.J., Hsu, K.C. & Wang, H.C. (2017). Structural insights into the cytotoxic mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* PirA<sup>VP</sup> and PirB<sup>VP</sup> toxins. *Mar. Drugs*.15: 373.
- Liu, F., Liu, G. & Li, F. (2016). Characterization of two pathogenic Photobacterium strains isolated from *Exopalaemon carinicauda* causing mortality of

- shrimp. *Aquaculture* 464: 129-135.
- López-León, P., Luna-González, A., Escamilla-Montes, R., Flores-Miranda, M.C., Fierro-Coronado, J.A., Álvarez-Ruiz, P., & Diarte-Plata. (2016). Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44(3): 470-479.
- Luan, X., Chen, J., Zhang, X., Jia, J., Sun, F., & Li, Y. (2007). Comparison of different primers for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 242-247.
- Morales, M.S., Ruiz, A., Pereira, A., Solís, V.T., & Conroy, G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivados en ocho regiones de Latinoamérica. *Rev. FCV-LUZ* 21(5): 434-446.
- Morales, M.S. & Gómez-Gil, B. (2014). Enfermedades bacterianas. In: Morales V & J Cuéllar-Anjel (eds). Guía técnica. Patología e inmunología de camarones penaeidos, pp. 167-194. OIRSA, Panamá.
- Morales, V. & Cuéllar-Anjel, J. (2014). Guía técnica. Patología e inmunología de camarones penaeidos, pp. 167-194. OIRSA, Panamá.
- Morales, V., Cuéllar-Anjel J., Tello, R., & Montoya, L. (2016). Manual regional de procedimientos de emergencia para la prevención y el control de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND). Coordinación Regional de Salud Animal y Grupo *ad hoc* en Sanidad Acuícola. pp. 1-36. OIRSA, Panamá.
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Org.* 111: 81-86.
- OIE (2018). Acute hepatopancreatic necrosis disease. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Recuperado de: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/chapitre\\_ahpnd.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_ahpnd.pdf) [Consultado el 16 de Octubre del 2018].
- Pantoja, C. & D.V. Lightner. (2014). *EMS/AHPND Descripción de la enfermedad en Asia y América*. p.172-177. En: Morales, V. & J. Cuéllar-Anjel (eds.). Guía

- Técnica – Patología e Inmunología de Camarones *Penaeidos*. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.
- Peña, N. & Varela, A. (2016). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas en el camarón blanco *Penaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 51(3): 553-564.
- Phiwsaiya, K., Charoensapsri, W., Taengphu, S., Dong, H., Sangsuriya, P., Nguyen, G., et al., (2017). A natural *Vibrio parahaemolyticus*  $\Delta$  pirA Vp pirB Vp+ mutant kills shrimp but produces neither Pir Vp toxins nor acute hepatopancreatic necrosis disease lesions. *Appl. Environ. Microbiol.* 83(16): 1-15.
- Pinoargote, G. & Ravishankar, S. (2018). Evaluation of the efficacy of probiotics in vitro against *Vibrio parahaemolyticus*, causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *J. Prob. Health* 6(1): 193.
- Prachumwat, A., Taengchaiyaphum, S., Mungkongwongsiri, N., Diva, J.A.C., Flegel, T.W. & Sritunyalucksana, K. (2018). Update on early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease by April 2018. *J. World Aquacult. Soc.* 2018: 1-13.
- Putth, S., & Polchana, J. (2016). Current status and impact of early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) outbreaks on Thailand s shrimp farming. In Pakingking J., Ayson, R., Grace, E. & Acosta, B. (eds). Addressing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and other transboundary diseases for improved aquatic animal health in Southeast Asia (pp. 79–87). Tigbauan, Philippines: Southeast Asian Fisheries Development.
- SENASA (2013). Decreto DG-R052-2013 sobre AHPNS /EMS, Septiembre 03, 2013. Costa Rica. Recuperado de: <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/081013061519.pdf> [Consultado el 16 de Octubre del 2018].
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T.D., Mavichak, R. et al. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS One*, 10(5): e0126987
- Soto-Rodríguez, S.A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Blancourt-Lozano, M., &

- Mora-Covarrubias, M.S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 1689-1699.
- Tendencia, E.A., Bosma, R.H., & Verreth, J.A.J. (2010). WSSV risk factors related to water physico-chemical properties and microflora in semi-intensive *Penaeus monodon* culture ponds in the Philippines. *Aquaculture* 302: 164-168.
- Theethakaew, C., Nakamura, S., Motooka, D., Matsuda, S., Kodama, T., Chonsin, K, Suthienkul, O., & Iida, T. (2017). Plasmid dynamics in *Vibrio parahaemolyticus* strains related to shrimp acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS). *Infect. Genet. Evol.* 51:211-218.
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P.V., Sritunyalucksana, K, Flegel, T.W., & Itsathphaisam, O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture* 462: 69-87.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R., Mohny, L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K., & Lightner, D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 105: 45-55.
- Valverde, J.A., & Alfaro, J. (2013). La experiencia del cultivo comercial de camarones marinos en estanques de producción en Costa Rica. *Rev. Mar. Cost.* 5: 87-105.
- Varela, A., Peña, N. & Aranguren, F. (2017). Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*. *Agron. Mesoam.* 28(3): 735-745.
- Vigliotta, G., Nutricati, E., Carata, E., Tredici, S.M., De Stefano, M., Pontieri, P., Massardo, D.R., Prati, M.V., De Bellis, L., & Alifano, P. (2007). *Clonothrix fusca* Roze 1896, a filamentous, sheathed, methanotrophic gamma-proteobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3556-3565.
- Yang, Y.T., Chen, I.T., Lee, C.T., Chen, C.Y., Lin, S.S., Hor, L.I., et al., (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which

cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.* 2(2): 1-2.

## ARTÍCULO 2

### **Virus del síndrome de la mancha blanca y *Enterocytozoon hepatopenaei* en cultivos del camarón blanco en el Pacífico de Costa Rica**

#### **Resumen**

El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) pertenece al género *Whispovirus*, el cual ocasiona destrucción sistémica de tejidos ectodérmicos y mesodérmicos, y puede causar mortalidades hasta el 100%, después de presentarse los signos clínicos. *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) es un parásito microsporidio intracelular formador de esporas, el cual se replica en el citoplasma y genera lisis de las células epiteliales de los túbulos hepatopancreáticos. Se han presentado mortalidades en las fincas camaroneras de Costa Rica y los signos clínicos se han asociado a estas dos enfermedades. WSSV ya se ha diagnosticado en el país, pero para EHP no se tiene información, por lo que se hace necesario definir su diagnóstico mediante técnicas moleculares. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de estos agentes mediante técnicas moleculares (PCR y secuenciación) en muestras recolectadas de fincas camaroneras ubicadas en el Golfo de Nicoya del Pacífico de Costa Rica. Entre 2017 y 2018 se recolectaron postlarvas, agua del primer bombeo y juveniles de *Penaeus vannamei* en 15 fincas con un estanque localizadas en el Golfo de Nicoya y el Pacífico Central del país. Las muestras se analizaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando protocolos e iniciadores para detectar proteínas estructurales de WSSV y el gen SSU rRNA de EHP. El día de la recolecta de los camarones juveniles se aplicó una encuesta a los productores para conocer sobre las condiciones de manejo. Además, se midieron los parámetros físico-químicos del agua del estanque. La presencia de WSSV se determinó en una finca y EHP no se detectó. La secuenciación de los segmentos amplificados del gen VP41B mostraron un 100% de identidad a una secuencia aislada de camarón en Taiwán y un 99% a otra de México. Considerando los resultados obtenidos, se recomienda notificar a las autoridades sanitarias y apoyar a los productores de camarón en el manejo de

las fincas y en la implementación de protocolos de bioseguridad para prevenir y controlar WSSV.

**Palabras Clave:** virus, parásito, microsporidiosis hepatopancreática, enfermedad infecciosa, enfermedad emergente.

### **White spot syndrome virus and *Enterocytozoon hepatopenaei* in white shrimp farms in the Pacific coast of Costa Rica**

#### **Abstract**

The white spot syndrome virus (WSSV), part of the genus *Whispovirus*, causes systematic destruction of ectodermal and mesodermal tissues producing up to 100% mortality after the appearance of clinical signs. *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is an intracellular microsporidium parasite that forms spores, replicates in the cytoplasm and generates lysis of the epithelial cells of the hepatopancreatic tubules. Mortalities have occurred in shrimp farms in Costa Rica and clinical signs have been associated with these two diseases. WSSV has been diagnosed in the country, but for EHP there is no information, so it is necessary to define its diagnosis using molecular techniques. The objective of this study was to determine the presence of these agents by molecular techniques (PCR and sequencing) in samples collected from shrimp farms located around the Golfo de Nicoya at the Pacific coast of Costa Rica. Between 2017 and 2018, postlarvae, water from the first pumping and juvenile shrimps were collected in 15 farms with one pond located around the Golfo de Nicoya and the Central Pacific of the country. The samples were analyzed using the polymerase chain reaction (PCR) technique employing protocols to detect WSSV structural proteins and EHP's SSU rRNA gene. The day when juvenile shrimps were harvested, a survey was applied to the producers to obtain information regarding the handling conditions. In addition, the physical-chemical parameters of the tank water were measured. The presence of WSSV was determined in one farm and EHP was not detected. Sequencing of the amplified segment of the VP41B gene of WSSV revealed 100% identity to an isolated shrimp sequence from Taiwan and 99% to another from Mexico. Considering these results, it is recommended to notify the

health authorities, support shrimp producers in the general management of the farms and in the implementation of biosecurity protocols to prevent and control WSSV.

**Key words:** virus, parasite, hepatopancreatic microsporidiosis, infectious disease, emerging disease.

## 1. Introducción

El virus del síndrome de la mancha blanca (white spot syndrome virus, WSSV por sus siglas en inglés) pertenece al género *Whispovirus*, familia Nimaviridae (Lo et al., 2012), un virus ADN doble cadena envuelto (Haq et al., 2012). El virus posee un amplio rango de hospedadores, entre estos se encuentran los crustáceos, principalmente cangrejos, langostinos y langostas (OIE, 2018). Se han determinado diferentes variantes de WSSV que se diferencian por su virulencia, ocasionando enfermedad y mortalidad hiperaguda, aguda y crónica (Bustillo et al., 2009), por destrucción sistémica de tejidos ectodérmicos y mesodérmicos, que incluyen las branquias, el epitelio cuticular, la glándula antenal, el órgano linfoide y el tejido hematopoyético. Los núcleos de las células infectadas se hipertrofian y cuando se tiñen con hematoxilina y eosina (H&E) muestran inclusiones centrales basófilas (Crockford, 2008).

Las especies infectadas con WSSV de peneidos asiáticas como americanas presentan manchas o puntos blancos en la cutícula del exoesqueleto (Wu et al., 2001) y una decoloración de rosado a rojo (Crockford, 2008; OIE, 2018). Sin embargo, éste no se considera un signo confiable para el diagnóstico preliminar de la enfermedad ya que algunas bacterias pueden producir manchas similares, con una alta alcalinidad del agua o estrés (Bustillo et al., 2009; Haq et al., 2012; OIE, 2018). Para la detección de WSSV se han utilizado técnicas de hibridación *in situ* (ISH), técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y métodos de detección inmunológica (Haq et al., 2012). El diagnóstico presuntivo se realiza mediante examen histológico de tejidos de camarones con la enfermedad clínica, mientras que para el diagnóstico confirmatorio se lleva a cabo la PCR e ISH o microscopía de transmisión electrónica, siendo la PCR el método de elección por su alta sensibilidad, especificidad y rapidez (Crockford 2008, OIE, 2018). Son múltiples los PCRs que se han implementado para la detección de WSSV, sin embargo, el que se utiliza generalmente es el PCR 002 diseñado por Dhar et al. (2001) que amplifica el gen VP41B.

El diagnóstico diferencial del síndrome de la mancha blanca incluye vibriosis sistémica, síndrome de la cabeza amarilla y síndrome de Taura, así como intoxicaciones de origen químico o biológico (Cuéllar-Anjel, 2013). No existe un tratamiento profiláctico efectivo para prevenir las infecciones virales en camarones (Esparza et al., 2009; Haq et al., 2012).

Para evitar la entrada del agente en una finca se deben de implementar medidas de bioseguridad como impedir el ingreso de personas externas a la finca, utilizar larvas libres de patógenos, movimiento responsable de organismos acuáticos, control de organismos muertos, entre otros. Una vez detectado WSSV en la finca se recomienda reducir factores estresantes como cambios bruscos de temperaturas, salinidad y oxigenación del agua, e implementar prácticas de saneamiento en las granjas de cultivo como desinfección de estanques con productos químicos o exponiéndolos al sol (Sánchez, 2010).

La presencia de WSSV se ha reportado en China, Japón, Corea, Tailandia, Indonesia, Taiwán, Vietnam, Malasia, India, EE. UU, México, Nicaragua, Honduras, Panamá, Ecuador, Perú, Colombia, Brasil, Arabia Saudita, Mozambique y Madagascar (OIE, 2018; Pantoja y Lightner, 2014; Vásquez et al., 2016). En el año 2000 se reportó por primera vez en sistemas productivos de camarón ubicados en el Golfo de Nicoya (SENASA, 2010), ocasionando mortalidades entre 60 y 70%. En el año 2008, el Servicio Nacional de Salud Animal emitió la obligatoriedad de declarar la enfermedad WSSV si se presenta en alguna finca de nuestro país (SENASA, 2010). En Costa Rica, SENASA (2017) desde el 2006 ha reportado 98 casos de la presencia de WSSV distribuidos de la siguiente manera: 2006 (4 casos), 2007 (4 casos), 2010 (4 casos), 2011 (6 casos), 2012 (28 casos), 2013 (34 casos), 2014 (5 casos), 2015 (3 casos) y 2016 (10 casos).

*Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), por el otro lado, es un parásito microsporidio intracelular formador de esporas, que ocasiona la enfermedad denominada microsporidiosis hepatopancreática (HPM) (Aranguren et al., 2017). Este agente se replica en el citoplasma de las células epiteliales de los túbulos hepatopancreáticos en *Penaeus monodon* y *P. vannamei* (ver Tourtip et al., 2009), generando la lisis de estas células (Tang et al., 2017).

Entre los principales signos clínicos se mencionan el crecimiento retardado, que ocasiona una variabilidad en las tallas de los camarones, caparazón blando, letargo, consumo de alimento reducido e intestino medio vacío (Aranguren et al., 2017). Algunos estudios han determinado que EHP es un factor de riesgo para la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) y para la necrosis séptica del hepatopáncreas (SHPND) (Aranguren et al., 2017).

El EHP se diagnostica mediante examen histológico, ISH y PCR (Tangprasittipap et al., 2013; Tang et al., 2015). Histológicamente se observan cuerpos de inclusión basófilos dentro del citoplasma de las células epiteliales del hepatopáncreas, los que parecen ser plasmodios esporogonales, mientras que en el lumen se observan esporas (Aranguren et al., 2017) y desprendimiento leve de células epiteliales tubulares (Tourtip et al., 2009). Los métodos de detección mediante PCR amplifican el gen del ARN ribosómico de la subunidad pequeña de EHP, denominado SSU rRNA-PCR (Aranguren et al., 2017; Tang et al. 2017) y el gen de la proteína de las esporas (SWP) (Jaroenlak et al., 2016)

Algunos estudios sugieren que EHP puede confundirse con *Agmasoma penaei*, un microsporidio que se relaciona con la enfermedad del camarón algodonoso (Laisutisan et al., 2009). Como tratamiento y control, se recomienda el uso de dietas que contengan antioxidantes y extractos de plantas herbales hepatoprotectivos (Santhoshkumar et al., 2016), que son incluidas en el alimento, aunque son limitados los estudios que comprueban su efectividad.

EHP ha sido reportado en países como China, Indonesia, Malasia, Vietnam, Tailandia, India (Tang et al., 2015, 2016; Rajendran et al., 2016; Shen et al., 2017), y recientemente en Venezuela (Tang et al., 2017). En Costa Rica no existen reportes de EHP y las investigaciones sobre WSSV son limitadas con respecto a la implementación de técnicas de diagnóstico, además de que se ha presentado una reducción en la aparición de la enfermedad desde el año 2014, por lo que se planteó el objetivo, de determinar la presencia de estos agentes mediante técnicas moleculares (PCR y secuenciación) en muestras recolectadas de fincas camaroneras ubicadas en el Golfo de Nicoya del Pacífico de Costa Rica.

## **2. Materiales y métodos**

### *2.1. Área de estudio, tipo y diseño*

Se realizó un estudio transversal descriptivo durante los años 2017-2018 en 15 fincas pertenecientes a la Cámara de Productores de Camarón de Costa Rica (CAPROCAM), de aproximadamente un total de 90 fincas a nivel nacional (Dra. Carolina Elizondo, SENASA, comunicación personal, 2019), mismas que presentaban únicamente un estanque de producción, ya que se presumió que eran las fincas menos tecnificadas. Las fincas se ubicaron alrededor del Golfo de Nicoya y Pacífico Central de Costa Rica (Punta Morales, Colorado de Abangares, Quebrada Honda, Lepanto y Jicaral). Las fincas se visitaron al inicio del ciclo de producción (Enero del 2017 y hasta Junio del 2018) y 6-7 semanas después de la siembra, ya que es cuando se han reportado las más altas mortalidades ocasionadas por AHPND en las fincas (Ananda et al., 2017; Theethakaew et al., 2017).

### *2.2. Recolección de información*

Al inicio del ciclo de producción, en el momento de la siembra de las postlarvas (pL10), se aplicó un instrumento pre codificado a cada productor, para conocer las condiciones generales de la finca (área de cultivo, área del estanque y uso de agua), sistema de producción (densidad de siembra, origen de la postlarva, volumen de agua, tasa de recambio, métodos de alimentación, conversión alimenticia, tipo de alimento, duración de ciclos de cultivo, registro de parámetros de calidad de agua) y manejo sanitario (conocimiento sobre enfermedades, presencia de enfermedades, uso y aplicación de antibióticos, entre otros) (Anexo 1). Las preguntas fueron de tipo dicotómicas y categóricas.

### *2.3. Toma de muestras de agua y camarón*

Durante el proceso de llenado del estanque, previo a la siembra, se tomó una muestra de 10 ml de agua antes de ingresar al estanque, la cual se almacenó en tubos vacutainer. El día de la siembra se recolectaron 100 postlarvas (día 0) antes de sembrar, las cuales se almacenaron en tubos con alcohol al 70%. Después de 6-7 semanas de realizada la siembra, se visitaron otra vez las fincas, y se tomaron durante las mañanas cinco camarones juveniles (5-10 g) en tres sitios diferentes (a la entrada de agua, en el medio del estanque y en el sitio de desagüe del mismo) con atarraya, y con la finalidad de tener una mayor posibilidad de obtener un camarón con los agentes analizados, además de analizar si podría existir una diferencia de la presencia del agente con respecto al lugar de muestreo dentro del estanque. A estos individuos se les extrajo el hepatopáncreas y el estómago y se almacenaron en alcohol al 70%. Todas las muestras fueron transportadas en refrigeración (4-8°C) al laboratorio y se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta su procesamiento.

#### *2.4. Toma de parámetros físico-químicos del agua y coordenadas geográficas*

El día de la recolecta de los camarones juveniles, se midió con un multiparámetro portátil los siguientes parámetros físico-químicos del agua: temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/L), pH y salinidad (ppm). Además, se registraron las coordenadas geográficas en las cuatro esquinas del estanque con un sistema de posicionamiento global (GPS, por sus siglas en inglés), promediando el valor obtenido con la finalidad de obtener un centroide y una mejor precisión del sitio.

#### *2.5. Técnicas moleculares*

El agua recolectado previo a la siembra se centrifugó a 16000 g x 10 min, y tanto el sobrenadante como el precipitado del agua. Las postlarvas, los hepatopáncreas y los estómagos de camarones juveniles se sometieron a extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit Dneasy® Blood and Tissue (Qiagen), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para la extracción de

ADN de los hepatopáncreas y estómagos, el procedimiento fue precedido por el siguiente protocolo de extracción (Carmona et al., 2016): se agregaron 300  $\mu$ l de solución PBS a la muestra (grupos de cinco hepatopáncreas y cinco estómagos), centrifugando a 5000 g x 5 min a 4°C y luego se agregó un volumen de 200  $\mu$ l de una solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (proporción 50:48:20), se mezcló con vortex por un minuto, y se centrifugó a 30000 g x 5 min a 4°C, removiendo 150  $\mu$ l de la fase acuosa. La fase acuosa se sometió a extracción de ADN con el kit Dneasy® Blood and Tissue (Qiagen). Finalmente se midió la concentración de ADN (ng/ $\mu$ l) de cada muestra extraída mediante espectrofotómetro (Nanodrop™)

Las muestras (agua, postlarvas y camarones juveniles) se analizaron mediante tres protocolos de PCR (Cuadro 1): en el primer PCR se amplificó el gen  $\beta$ -actina de las muestras de camarón (postlarvas, hepatopáncreas y estómagos) según el protocolo descrito por Dhar et al. (2001) para determinar la correcta extracción de ADN de las muestras y descartar inhibiciones. En el segundo PCR se amplificó un segmento del gen VP41B de WSSV según el protocolo descrito por Dhar et al. (2001), y en el tercer PCR un segmento del gen SSU rRNA de EHP según el protocolo descrito por Tang et al. (2015).

La mezcla de la reacción para los PCR comprendió templado de ADN (0,8 – 1,6  $\mu$ M), iniciadores en concentración 10  $\mu$ M y Master Mix 0,6  $\mu$ M (DreamTaq, Thermofisher®), volumen final de 25  $\mu$ l. Como controles positivos se utilizó ADN de WSSV y EHP, adquirido en la Universidad de Arizona, EE.UU. Como control negativo se usó agua libre de nucleasas (Fermentas®). Las secuencias de los iniciadores y el protocolo de amplificación de los diferentes PCR se detallan en el Cuadro 1.

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa (1%) en TBE 1X (Tris base, ácido bórico, EDTA, pH 8, 0,5M). La corrida electroforética se realizó a 100 voltios durante 45 min. Como marcador de peso molecular se empleó GenRuler 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas®) y como colorante GelRed® Nucleic Acid Gel Strain. Los fragmentos de amplificación con un tamaño 306 pb (WSSV) y 500 pb (EHP) se consideraron positivos y todos menos los de actina se enviaron a secuenciar a Macrogen (Seúl, Corea). La secuencia

parcial se alineó con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® y se comparó mediante el algoritmo BLASTn (Joshi et al. 2014; Han et al., 2015a) con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el GenBank.

## 2.6. *Análisis estadístico*

En una base de datos se digitaron los resultados de las encuestas y de los PCR de WSSV y EHP. Se creó un mapa con el programa QGIS 2.14.0. para mostrar la distribución de las camaronas analizadas y casos positivos identificados.

Se realizó un análisis descriptivo, donde se obtuvieron los porcentajes de las frecuencias observadas para cada una de las variables analizadas en la encuesta. Se definieron los factores de riesgo por importancia (área de cultivo, área del estanque, lugar de extracción del agua, densidades de siembra, origen de la postlarva, volumen de agua en el estanque, tasa de recambio del estanque, conversión alimenticia, aplicación de periodos de secado, parámetros físico-químicos del agua) y se compararon estadísticamente con los resultados obtenidos de WSSV y EHP.

Las respuestas obtenidas de las encuestas se procesaron en el programa estadístico SAS® versión 24, donde se realizaron tablas dinámicas. Además, se utilizaron tablas de contingencia con las frecuencias observadas, con un nivel de confianza de  $\alpha = 0,05$ , se aplicó el estadístico Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher (Morales et al., 2011).

Cuadro 1. Protocolo de los PCR utilizados para amplificar el gen  $\beta$ -actina, WSSV y EHP

Gen	Cebadores	Secuencias	Tamaño del producto (pb)	Protocolo de amplificación	Referencia
$\beta$ -actina	Actin-F Actin-R3	CCCAGAGCAAGAGAGGTA GCGTATCCTTCGTAGATGGG	339	10 min de desnaturalización inicial a 95°C, 35 ciclos repetidos de desnaturalización (95°C por 45 s), alineación (55 °C por 1 min) y extensión (72°C por 2 min) y una temperatura final de extensión de 72°C por 7 min.	Dhar et al. (2001)
WSSV	F002 R002	GATGAGACAGCCCAAGTTGTAAAC CGAAATTCCATCACTGTAATTGCTTG	306	10 min de desnaturalización inicial a 95°C, 35 ciclos repetidos de desnaturalización (95°C por 45 s), alineación (55°C por 1 min) y extensión (72°C por 2 min) y una temperatura final de extensión de 72°C por 7 min.	Dhar et al. (2001)
EHP	EHP-510F EHP-510R	GCCTGAGAGATGGCTCCCACGT GCGTACTATCCCCAGAGCCCGA	500	3 min de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos repetidos de desnaturalización (94°C por 30 s), alineación (60°C por 30 s) y una temperatura final de extensión de 72°C por 5 min.	Tang et al. (2015)

### 3. Resultados

#### 3.1. Implementación de protocolo de extracción de ADN y de técnicas moleculares

En la Figura 1 se muestran los protocolos de PCR implementados para amplificar segmentos de los genes WSSV y EHP. Las amplificaciones presentaban mejores resultados cuando las extracciones se utilizaban sin diluir o en dilución 1/10.

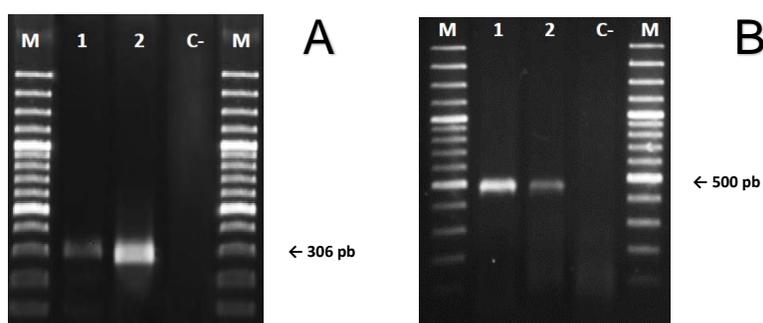


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR, mostrando la amplificación de (A) WSSV y (B) EHP. M: marcador de peso molecular de 100 kb. Líneas 1: ADN extraído de muestras de hepatopáncreas puro; 2: ADN extraído de muestras de hepatopáncreas dilución 1/10; C-: control negativo

#### 3.2. Detección de WSSV y EHP por PCR

Todas las postlarvas, los estómagos y los hepatopáncreas de camarón juvenil de las 15 fincas amplificaron el control interno actina mediante PCR. Las muestras de agua (sobrenadante y sedimento) que se obtuvieron del primer bombeo en las 15 fincas, resultaron negativas para WSSV y EHP, al igual que las postlarvas y los estómagos de camarón juvenil. Solamente los hepatopáncreas de los camarones recolectados en la mitad del estanque de la finca 9 resultaron positivas para WSSV, mientras que las demás fincas resultaron negativas a WSSV y EHP (Figura 2).

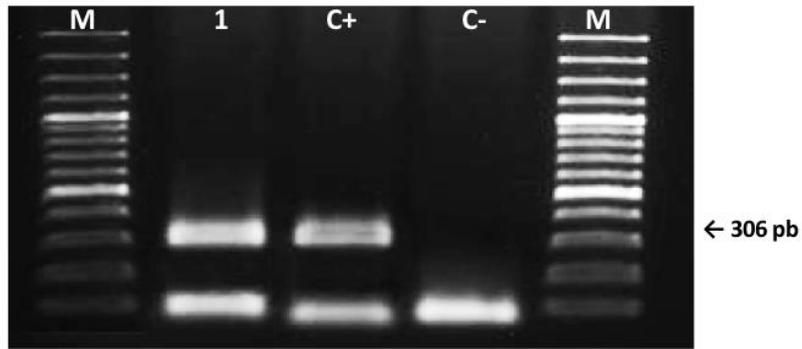


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de muestras de hepatopáncreas de camarón mostrando la presencia de WSSV por medio de PCR. M: marcador de peso molecular de 100 kb. Línea 1: Muestras de hepatopáncreas de camarones positivos; C+: control positivo C-: control negativo

### 3.3. Secuenciación

La secuencia obtenida para el gen VP41B de WSSV fue idéntica (100%, 306pb/306pb) a secuencias aisladas de camarones en Taiwán (AF440570.1) y México (KU216744.2) (Figura 3). La secuencia de Costa Rica se encuentra disponible en la base de datos de GenBank con el número de acceso MH553567.

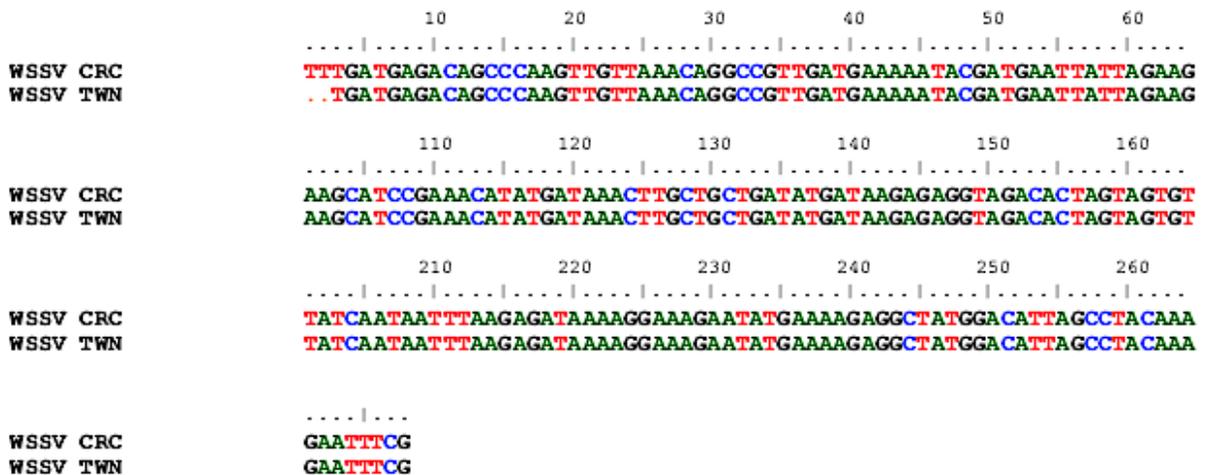


Figura 3. Alineamiento de la secuencia de una muestra de WSSV obtenida de Costa Rica (WSSV CRC) y la secuencia de WSSV obtenido de Taiwán, depositada en el GenBank (WSSV TWN) utilizando el programa ClustalW2

### 3.4. Caracterización descriptiva de la finca positiva a WSSV

La finca WSSV positiva (finca 9) se encontró ubicada en el cantón de Abangares (Figura 4) con un estanque de tamaño menor a las 2 ha.

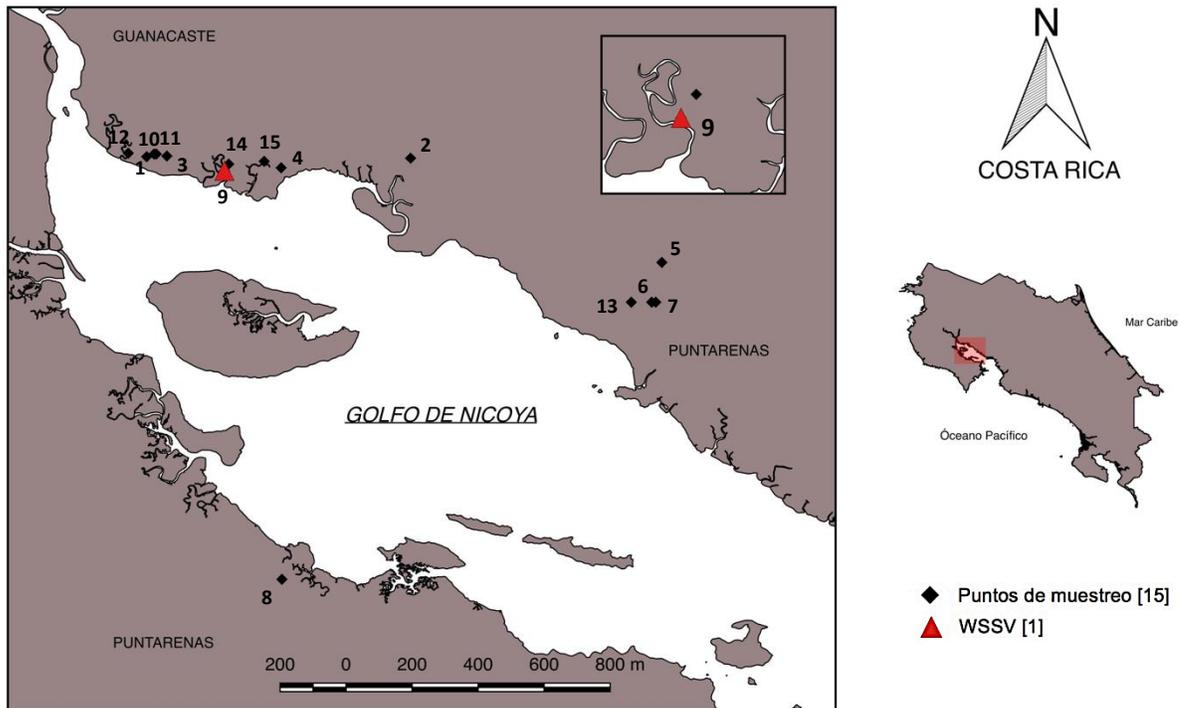


Figura 4. Distribución geográfica de las fincas productivas de camarón analizadas y ubicación de la finca positiva a WSSV en Costa Rica, 2017-2018. (Recuadro indica zona ampliada de finca positiva).

En el momento en que se realizó el muestreo, la finca positiva a WSSV presentó los siguientes parámetros de la calidad del agua: 3 mg/L de oxígeno, una temperatura de 34,5°C, un pH de 8,24 y una salinidad de 22,39 ppm. En esta finca se sembró una densidad de 10 postlarvas por m<sup>2</sup>, y se utilizaron ciclos de producción menores a los cuatro meses, no se realizaba monitoreo de calidad de aguas, ni mantenía registros de la producción. En ciclos anteriores había presentado problemas asociados a WSSV (información suministrada por el dueño de la finca).

### 3.5. *Relación entre los factores de riesgo, la presencia de WSSV y EHP*

Debido a que solo se encontró una finca positiva a WSSV y no se presentaron casos diagnosticados de EHP, estadísticamente no se logró realizar el análisis propuesto en la metodología.

## 4. Discusión

### 4.1. Diagnóstico molecular y detección de genes

Se determinó la presencia del virus del síndrome de la mancha blanca en una (6,7%) de 15 fincas analizadas. Este hallazgo concuerda con registros de casos de WSSV reportados desde el año 2006 en nuestro país (SENASA, 2017), lo que implica que el agente se ha mantenido presente en el país a través del tiempo. Sin embargo, se determinó una baja presencia, contrario a lo reportado por Morales et al. (2011), quienes encontraron prevalencias de WSSV entre el 15 y 100% entre el 2008 y 2009 en Costa Rica, y tampoco concuerda con lo presentado por Varela y Peña (2013), quienes diagnosticaron oficialmente, durante el 2012 y 2013, un total de 45 casos de WSSV mediante PCR, sin indicar los lugares de origen de las muestras. En contraste, en otro estudio realizado en tres fincas productoras de camarón en la misma región durante el periodo 2013-2014, no se obtuvieron resultados positivos a WSSV (Peña y Varela, 2016).

Es posible que la presencia del virus en el país se vea influenciada por cambios en las condiciones ambientales como la temperatura, la susceptibilidad de los organismos, el estado fisiológico o la carga viral, aunado a que las investigaciones realizadas hasta la fecha en el país, no han sido continuas y sistemáticas a través del tiempo. A temperaturas cercanas a los 25°C WSSV se desarrolla rápidamente, y a condiciones de hipertermia la replicación del virus se detiene, explicando porque los brotes ocurren con mayor frecuencia en las épocas de menor temperatura del agua (Vidal et al., 2001; Granja et al., 2003; Lightner, 2011). En el presente estudio la finca positiva mostró condiciones ambientales variables como la temperatura que pudieron incidir en el desarrollo de la enfermedad, lo que incrementaría la expresión del virus (Vázquez et al., 2016).

En algunos estudios, el uso del PCR anidado ha arrojado que resultados falsos negativos den fincas con una baja carga viral, por lo que se recomienda utilizar técnicas más sensibles como PCR tiempo real (Dhar et al. (2001), sin

embargo, esta es una técnica de mayor costo económico y que no siempre se puede implementar por este motivo.

#### 4.2. *Secuenciación*

La secuencia del gen VP41B de WSSV amplificada en el presente trabajo fue similar a la secuencia detectada en camarones de *Penaeus monodon* en Taiwán (Tsai et al. 2000) y *Penaeus vannamei* en México (Rodríguez et al. 2016). El genoma completo de WSSV se ha obtenido en diferentes países del mundo, y se ha notado eliminación de proteínas de la envoltura y la cápside del virus de WSSV, afectando el reconocimiento de la célula huésped y la respuesta inmune ante WSSV, además de reducir la capacidad del virus para causar mortalidad (Restrepo et al. 2018). En este sentido, la secuencia obtenida en este estudio es muy pequeña (306 pb) y se requerirá la secuencia completa del genoma para saber si la cepa viral que afecta a Costa Rica es idéntica a los demás países.

Como WSSV es una enfermedad de declaración obligatoria en Costa Rica, el estanque debe ser aislado y en casos de alta mortalidad de los animales, se debe eliminar la producción y seguir medidas sanitarias, como el impedimento de entrada a personas (SENASA, 2005). Cuéllar-Anjel et al. (2014) recomendaron además interrumpir la producción, realizar un secado total del estanque en la estación seca para impedir el ciclo de infección y eliminar posibles fuentes de contagio (moluscos, copépodos y otros crustáceos). Sin embargo, si las tallas de los camarones son adecuadas para la comercialización, se deben cosechar con la finalidad de reducir las pérdidas económicas y minimizar la proliferación del virus (Cuéllar-Anjel, 2013).

#### 4.3. *Relación de factores de riesgo y WSSV*

El único caso positivo a WSSV, presentó la particularidad de que fue una finca del Golfo de Nicoya que apenas alcanza la hectárea y media de espejo de agua, y los parámetros productivos no son los óptimos para la producción de

camarón (Cuéllar-Anjel et al., 2014). Esto podría favorecer un aumento en la proliferación de enfermedades dentro del estanque, principalmente por factores asociados a la calidad del agua como pueden ser las variaciones de la temperatura, ya que podrían estar generando estrés en los camarones y hacerlos más susceptibles a los patógenos, coincidiendo con Lazur (2007) que hace referencia a la asociación entre la calidad del agua y la presencia de enfermedades.

Al no existir tratamientos que controlen a WSSV ni sus mortalidades (Esparza et al., 2009), la implementación de medidas de bioseguridad como el tratamiento del agua por medio de la desinfección del estanque con hipoclorito de sodio, cal, detergentes o compuestos orgánicos parecen ser la única alternativa para reducir el riesgo de entrada de WSSV a las fincas camaroneras (Lightner, 2005). A la vez, se sugiere, como método de prevención, realizar evaluaciones de la salud de los camarones de forma semanal, ya que se podría tener una diseminación de la enfermedad entre los estanques de la misma finca o entre estanques ubicados en la misma región sin que los productores lo perciban (Cuéllar-Anjel et al., 2014).

#### *4.4. Conclusiones y recomendaciones*

Se recomienda la realización de estudios sobre la prevalencia de WSSV en Costa Rica, con la finalidad de conocer la situación actual de la enfermedad en el país y si la información que se obtenga coincide con los casos que se han venido diagnosticando de forma oficial. En este estudio no se analizaron los resultados de los parámetros productivos de las fincas analizadas ni la cantidad de producto obtenido en la cosecha, por lo que no se logró determinar el efecto del patógeno sobre la mortalidad, las conversiones alimenticias y su asociación con otros agentes causales de enfermedades. Es necesario determinar si es posible que la baja presencia de WSSV en las fincas de camarón este asociado al desarrollo de nuevas tecnologías para el mejoramiento animal y la resistencia a patógenos o incluso a la aparición de nuevos agentes infecciosos más virulentos que generan mortalidades más rápidas en los camarones y no permiten el desarrollo de WSSV a través del ciclo productivo.

Se debe mantener la vigilancia por parte de las autoridades sanitarias, controlar la importación de postlarvas de países no libres de la enfermedad y evaluar si WSSV está generando el mismo impacto negativo que en los últimos años.

## 5. Conclusiones

- En Costa Rica todavía se detecta la presencia de WSSV mediante la implementación de técnicas moleculares y aunque no se encontró la presencia de EHP, no se descarta su presencia en el país.
- La secuencia obtenida de WSSV fue igual a un patógeno aislado de *Penaeus monodon* en Taiwán y de *Penaeus vannamei* en México, por lo que estudios de secuenciación surgen como una alternativa para identificar la ruta de ingreso de los patógenos en los sistemas de producción de camarón.

## 6. Recomendaciones

- Comunicar a SENASA del caso positivo a WSSV ya que es una enfermedad de declaración obligatoria, con la finalidad de que tomen las medidas de control epidemiológico que sean necesarias.
- Realizar monitoreo de todas las fincas mediante PCR tiempo real para determinar la prevalencia de WSSV en Costa Rica.
- Capacitar a productores sobre buenas prácticas de manejo de la finca, monitoreo de los parámetros físico-químicos del agua, y medidas para prevenir WSSV.

## 7. Referencias Bibliográficas

- Aranguren, L.F., Han, J.E., & Tang, K.F.J. (2017). *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 471: 37-42
- Haq, M.A.B, Vignesh, R., & Srinivasan, M. (2012). Deep insight into white spot syndrome virus vaccines: A review. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2: 73-77.
- Bustillo, M., Escobedo, C., & Sotelo, R. (2009). Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 44(1): 1-11.
- Chávez-Sánchez, M.C. & Montoya-Rodríguez, L. (2004). Medidas de bioseguridad para evitar la introducción y dispersión de enfermedades virales en granjas camaronícolas. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Nieto-López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. & González, M. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Crockford, M. (2008). White Spot Disease. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures. Recuperado de: [http://www.scahls.org.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0009/1516518/White\\_Spot\\_Syndrome\\_Virus.pdf](http://www.scahls.org.au/__data/assets/pdf_file/0009/1516518/White_Spot_Syndrome_Virus.pdf). [Consultado el 13 de noviembre del 2017].
- Cuéllar-Anjel, J. (2013). Enfermedad de las manchas blancas. Recuperado de: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/white-spot-disease-es.pdf>. [Consultado el 11 de marzo del 2017].
- Cuéllar-Anjel, J; Morales, V; Lara, C; & García, O. (2014). Buenas prácticas y bioseguridad para el cultivo del camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931). En: Morales, V. & J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2014. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Peneidos. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.
- Dhar, A.K., Roux, M.M. & Klimpel, K.R. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and white spot

virus (WSV) of shrimp by real-time quantitative PCR and SYBR chemistry. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2835-2845

Esparza-Leal, H.M., Escobedo-Bonilla, C.M., Casillas-Hernández, R., Álvarez-Ruiz, P., Portillo-Clarck, G., Valerio-García, R.C., ..., & Magallón-Barajas, J. (2009). Detection of white spot syndrome virus in filtered shrimp-farm water fractions and experimental evaluation of its infectivity in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 292: 16-22.

Granja, C.B., Aranguren, L.F., Vidal, O.M., Aragon, L., Salazar, M. (2003). Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.* 54: 73-78.

Jaroenlak, P., Sanguanrut, P., Williams, B.A.P., Stentiford, G.D., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K., et al. (2016) A Nested PCR Assay to Avoid False Positive Detection of the Microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in Environmental Samples in Shrimp Farms. *PLoS ONE* 11(11): e0166320.

Laisutisan, K., Prasertsri, S., Chuchird, N., & Limsuwan, C. (2009). Ultrastructure of the microsporidian *Thelohania (Agmasoma) penaei* in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Kasetsart Univ. Fish. Res. Bull.* 33: 41-48.

Lazur, A. (2007). Growout Pond and Water Quality Management, JIFSAN Good Aquacultural Practices Program (Joint Institute for Food Safety & Applied Nutrition), University of Maryland, Symons Hall, College Park.

Lightner, D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: Pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquacult. Soc.* 36(3), 229-248.

Lightner, D.V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *J. Invertebr. Pathol.* 106: 110-130.

Lo C.F., Aoki, T., Bonami, J.R., Flegel, T.W., Leu, J.H., Lightner, D.V., Stentiford, G., Söderhäll, K., Walker, P.W., Wang, H.C., Xun, X., Yang, F., & Vlak, J.M. (2012). *Nimaviridae*. Pp. 229-234. En: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., M.J. Adams, E.B. Carstens, & E.J. Lefkowitz (eds.). Elsevier Academic Press, San Diego, CA. USA.

OIE. (2018). *White Spot Disease*. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals.

Chapter 2.2.5. Recuperado de: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/2009/2.2.05\\_WSD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2009/2.2.05_WSD.pdf) [Consultado el 29 de Octubre del 2017]

Pantoja, C. & D.V. Lightner. (2014). *EMS/AHPND Descripción de la enfermedad en Asia y América*. p.172-177. En: Morales, V. & J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2014. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones *Penaeus*. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.

Peña, N. & Varela, A. (2016). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas en el camarón blanco *Penaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 51(3): 553-564.

Rajendran, K.V., Shivam, S., Praveena, P.E., Sahaya J.J., Kumar, T.S., Avunje, S., ..., & Vijayan, K.K. (2016). Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture* 454: 272-280.

Reddy, A.D., Jeyasekaran, G. & Shakila, R.J. (2013). Morphogenesis, pathogenesis, detection and transmission risks of white spot syndrome virus in shrimps. *Fish Aquacult. J.* 3: 1-13.

Rodríguez-Anaya, L.Z., González-Galaviz, J.R., Casillas-Hernández, R., Lares-Villa, F., Estrada, K., Ibarra-Gómez, J.C., & Sánchez-Flores, A. (2016). Draft genome sequence of white spot syndrome virus isolated from cultured *Litopenaeus vannamei* in México. *Genome Announc.* 4 (2): 1-2.

Sánchez, A. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern: Review article. *Vet. Res.* 41: 43.

Santhoshkumar, S., Sivakumar, S., Vimal, S., Abdul, S., Taju, G., Haribabu, P., ..., & Sahul, S. (2016). Biochemical changes and tissue distribution of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in naturally and experimentally EHP-infected whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), in India. *J. Fish Dis.* 40(4): 529-539.

SENASA. (2005). Manual de buenas prácticas pecuarias en acuicultura. Recuperado de: <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/121211080451.pdf>. [Consultado el 29 de octubre del 2018].

SENASA. (2010). Protocolo de vigilancia epidemiológica para la enfermedad de las Manchas Blancas. Programa nacional sanidad acuícola. Recuperado de:

www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/141211080925.doc [Consultado el 15 de enero del 2017].

SENASA. (2017). Informe OIE WAHID. Recuperado de: [www.senasa.go.cr/senasa/informacion/centro-de-informacion/informacion/estado-sanitario/oie/informes-organización-mundial-de-sanidad-animal-oie](http://www.senasa.go.cr/senasa/informacion/centro-de-informacion/informacion/estado-sanitario/oie/informes-organización-mundial-de-sanidad-animal-oie) [Consultado el 13 de enero del 2019].

Shen, H., Jiang, G., Wan, X., Fan, X., Qiao, Y., Shi, W., Li, H., & Wang L. (2017). Multiple pathogens prevalent in shrimp *Penaeus vannamei* cultured from greenhouse ponds in Jiangsu Province of China. *J. Aquac. Res. Development*. 8(10): 1- 5.

Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Redman, R.M., Han, J.E., Tran, L.H., & Lightner, D.V. (2015). Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. *J. Invert. Pathol.* 130: 37-41.

Tang, K.F.J., Han, J.E., Aranguren, L.F., et al. (2017). Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp. *J. Invert. Pathol.* 140: 1–7.

Tang, K., Aranguren, F., Han, J. E., Maskaykina, I., Schmidt M., & Lightner, D. (2017). Histopathology and in situ detection of the microsporidian *enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in *Penaeus vannamei* cultured in a Latin America country. Recuperado de: <https://www.was.org/meetings/ShowAbstract.aspx?Id=46059> [Consultado el 15 de Marzo del 2017].

Tangprasittipap, A., Srisala, J., Chouwdee, S., Somboon, M., Chuchird, N., Limsuwan, C., ..., & Sritunyalucksana, K. (2013). The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *BMC Vet. Res.* 9: 139.

Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Sriurairatana, S., Chavadej, J., ..., & Withyachumnarnkul, B. (2009). *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic

relationships. *J. Invert. Pathol.* 102: 21-29.

Tsai, M.F., Lo, C.F., van Hulten, M.C.W., Tzeng, H.F., Chou, C.M., Huang, C.J., Wang, C.H., Lin, J.Y., Vlak, J.M., & Kou, G.H. (2000). Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 277: 92-99.

Varela, A. & Peña, N. (2013). El virus del Síndrome de las Manchas Blancas (WSSV): una revisión y su impacto en la camaronicultura costarricense. *Rev. Cienc. Vet.* 28(2): 51-69.

Vásquez-Sauceda M.L., Sánchez-Martínez, J.G., Pérez-Castañeda, R., Rábago-Castro, J.L., Aguirre-Guzmán, G., & Vargas-Cruz, D.Y. (2016). White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP) detection in wild shrimp of the San Andrés Lagoon, Mexico. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 51: 455-459.

Vidal, O.M., Granja, C.B., Aranguren, F., Brock, J.A. & Salazar, M. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White spot syndrome virus. *J. World Aquacult. Soc.* 32: 364-372.

Wu, J.L., Namikoshi, A., Nishizawa, T., Mushiake, K., Teruya, K., & Muroga, K. (2001). Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Dis. Aquat. Org.* 47:129-135.

Youtong, W., Deachmag, P., Phongdara, A., & Chotige, W. (2011). WSSV: VP26 binding protein and its biological activity. *Fish Shell. Immunol.* 30: 77-83.

## DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en la primera investigación indicaron que las fincas camaroneras estudiadas poseen áreas de cultivo extensivas, conversiones alimenticias y densidades de siembra superiores a 100 000 postlarvas/ha, en comparación con la tecnificación de las fincas, lo que podría estar ocasionando resultados productivos bajos y la aparición de enfermedades, ya que según Valverde y Alfaro (2013), áreas de cultivo entre 1,3 ha hasta 5,8 ha, y densidades de siembra entre los 100-150 000 postlarvas/ha, ocasionan sobrevivencias inferiores al 60%. Las áreas de cultivo analizadas presentaron diferencias de manejo, así las fincas de Guanacaste mostraron mejores indicadores productivos comparativamente con las ubicadas en Puntarenas, principalmente en el volumen del agua del estanque (35-50 000 m<sup>3</sup>; Guanacaste: 50%; Puntarenas: 0%), las conversiones alimenticias (1-1,2; Guanacaste: 50%; Puntarenas: 20%) y tasas de recambio del agua (20-40%; Guanacaste: 40%; Puntarenas: 20%), posiblemente debido a que los productores están mejor capacitados y cuentan con sistemas productivos menos extensivos.

Se determinaron parámetros de la calidad del agua por debajo o encima de los óptimos, lo que puede generar alteraciones en el desarrollo normal de los camarones, ya que parámetros de agua no óptimos pueden ocasionar problemas físicos y metabólicos a los camarones, que los hacen más susceptibles a contraer enfermedades (Lavilla-Pitogo et al., 2000; Lazur, 2007). La mala calidad del agua detectada en las fincas analizadas se puede deber al desconocimiento de la importancia de la medición o a la falta de equipo especializado para realizarla, que permita monitorear diariamente los parámetros y controlar los cambios en la calidad del agua. Comprobar constantemente la calidad del agua es determinante para prevenir la aparición de bacterias oportunistas como las del género *Vibrio* spp., y las fluctuaciones de los parámetros de agua son considerados factores de riesgo asociados a la presencia de AHPND (Putth y Polchana, 2016). Es así como Putth y Polchana (2016) lograron determinar tendencias a la presencia de AHPND cuando el oxígeno estuvo por debajo de 3 mg/L.

Solamente una (negativa a AHPND) de las quince fincas analizadas no aplicaba antibióticos en la campaña de producción; de las catorce que sí utilizaban, cinco resultaron positivas a AHPND y seis a *Vibrio* spp. En dos de las tres fincas en las que los productores sospechaban que los camarones estaban infectados con cepas de AHPND debido a que se presentaban signos compatibles como mortalidades, presencia de aves, baja producción, entre otros, se confirmó su presencia. El uso rutinario de antibióticos puede ocasionar resistencia bacteriana (Hien et al., 2016). Es por eso que se recomienda realizar diagnóstico molecular cuando se observan mortalidades en los estanques (Han et al., 2015d), para determinar si la causa es una bacteria, y así recomendar el uso de un antibiótico específico si fuese necesario y luego de confirmar la presencia de AHPND.

El uso de antibióticos, como se constató en el presente trabajo, puede destruir los sistemas microbianos beneficiosos y reducir la efectividad de los tratamientos antibacteriales (De Schryver et al., 2014), como ya se ha reportado en otros continentes (Hien et al., 2016). Estudios recientes han demostrado la existencia de cepas de AHPND que presentan genes de resistencia a la tetraciclina (Han et al., 2015d). Es por eso, que se debe informar a las autoridades y a los productores sobre las desventajas del uso rutinario de antibióticos en la producción de camarones, e incentivar y capacitar a estos, para que mejoren los parámetros del agua y consideren el uso de probióticos como una alternativa para reducir las bacterias patógenas y, así reducir el uso de medicamentos (Hong et al., 2016; Cornejo-Granados et al., 2017, Pinoargote y Ravishankar 2018).

Las técnicas moleculares implementadas en el presente trabajo apoyaron el diagnóstico de la enfermedad (Varela et al., 2017). Los cuatro PCRs implementados demostraron alta especificidad para el diagnóstico de AHPND y *Vibrio* spp., lo que concuerda con los estudios de Han et al. (2015a) y Nunan et al. (2014), mientras que, la OIE (2018) recomienda el uso de los PCRs que detectan los genes *pir A* y *pir B* (Han et al., 2015a).

Se reporta por primera vez la presencia de AHPND en fincas camaroneras de *Penaeus vannamei* del Golfo de Nicoya de Costa Rica, determinada mediante técnicas moleculares, lo cual complementa los reportes sobre la presencia de

AHPND en México (Gómez et al., 2014; Nunan et al., 2014) y países no especificados de Centroamérica (Han et al., 2015b). Se recomienda informar a las autoridades de SENASA para que implementen los protocolos de control epidemiológico y puedan prevenir la diseminación del agente entre los sistemas productivos (Morales et al., 2016; OIE, 2018).

En el presente trabajo no se encontró AHPND en postlarvas, las cuales fueron importadas desde Guatemala y Nicaragua. Solamente postlarvas de una finca resultaron positivas para *Vibrio* spp. por PCR, lo cual pudo deberse a contaminación en el proceso de aclimatización antes de la siembra, en el laboratorio de maduración o que las postlarvas vinieran contaminadas desde el país de importación. Según Aguirre et al. (2001), la fase crítica de las postlarvas para contraer la bacteria, es en la metamorfosis en la última etapa, la cual se desarrolla en el laboratorio de maduración.

La presencia de AHPND se detectó únicamente en hepatopáncreas de camarones juveniles, información que concuerda con lo reportado por la OIE (2018). No se obtuvieron resultados positivos para los estómagos, posiblemente debido a la fase de desarrollo de la enfermedad, dado que las bacterias en la fase terminal de AHPND migran al hepatopáncreas por el incremento de la infección y por ser un órgano con una mayor cantidad de nutrientes (Pantoja y Lightner, 2014). También es posible que el uso de un medio de enriquecimiento (NaCl, CaCl<sub>2</sub>) hubiera logrado una mejor preservación de la muestra (Sirikharin et al., 2015), pero en el presente estudio no se aplicó esta técnica ya que no se contempló entre los objetivos de la investigación. Estudios realizados por Lai et al. (2015) indicaron la posibilidad de detectar solo el gen *pir B* en el hepatopáncreas de camarones que presentan signos de AHPND. Sin embargo, en el presente estudio se diagnosticó en todos los casos positivos la presencia de los genes *pir A* y *pir B*, concordando con lo expuesto por las investigaciones más recientes sobre AHPND, que indican la necesidad de encontrar las dos toxinas para confirmar la presencia de la enfermedad (Phiwsaiya et al., 2017; Theethakaew et al., 2017; Han et al., 2015a; Han et al., 2015b).

Tres de las fincas positivas (1, 11 y 12) se encontraban muy cercanas entre sí, siendo posible que AHPND se estuviese propagando por medio del agua. En el

presente trabajo no se detectó la presencia de AHPND en el agua, probablemente debido a que no se realizó un análisis bacteriológico en agar selectivo de las muestras (Chonsin et al., 2016) o un enriquecimiento de la muestra (Sirikharin et al., 2015), situación que debe ser investigada en futuros trabajos, incluyendo el análisis del agua que ingresa a los estanques y la que se encuentra dentro del estanque y puede estar siendo contaminada por la presencia de las bacterias en los sedimentos u otros medios. Sin embargo, se han confirmado la presencia los genes *pir A* y *pir B* en bacterias aisladas del agua de los estanques en estudios realizados en Tailandia (Chonsin et al., 2016), por lo que, no se descarta su presencia en este recurso. Ante esto, se recomienda a los productores implementar técnicas de cero recambio de agua del estanque durante el periodo de producción, la desinfección del agua con carbonato de calcio, óxido de calcio, cloro, entre otros (Gräslund y Bengtsson, 2001), monitoreo de cargas bacteriales en los estanques por medio de análisis bacteriológico y tratamiento de sedimentos que eliminen el exceso de materia orgánica por medio de la aplicación de probióticos que poseen bacterias nitrificantes como *Bacillus* spp. (Dalmin et al., 2001).

Las muestras positivas se encontraron principalmente en la entrada de agua y al medio del estanque, lo que no concuerda con lo que reporta la literatura (Morales y Cuéllar, 2014), donde los camarones más fuertes y saludables se localizan en la entrada del agua fresca y oxigenada, mientras que, los más débiles y enfermos se encontrarán en la salida del estanque. Es relevante realizar más estudios donde los muestreos sean de forma sistemática, representativa y homogénea dentro de los estanques (Morales y Cuéllar, 2014), con la finalidad de analizar una posible estratificación de los organismos dentro del estanque en función de si están enfermos o sanos.

Las secuencias del plásmido y de los genes de *pir A* y *pir B* detectadas en Costa Rica no fueron similares a las reportadas en México y los dos países no especificados de Centroamérica (Han et al., 2015b), sino similares al genotipo asiático (Phiwsaiya et al., 2017). Recientemente, en Texas, Estados Unidos, se identificaron muestras positivas a AHPND, siendo éstas similares al genotipo mexicano y no al asiático (Dhar, 2018), no concordando con los resultados

obtenidos en Costa Rica, lo que podría indicar la inclusión de diversas cepas patógenas en la región.

*Vibrio parahaemolyticus* ha sido identificado como el principal agente causal de AHPND (Krishna et al., 2014; Han et al., 2015a, b; Phiwsaiya et al., 2017; Theethakaew et al., 2017), lo cual concuerda con los hallazgos de la presente investigación. La finca con las postlarvas positivas a *Vibrio* spp. y negativas a AHPND, posiblemente presentaban solo contaminación bacteriana, o necrosis séptica del hepatopáncreas o necrosis del hepatopáncreas, lo cual no fue analizado en el presente estudio (Morales y Gómez, 2014).

No se logró determinar la asociación entre la presencia de AHPND y los factores de riesgo analizados, debido a que el estudio se realizó con únicamente 15 fincas y por la cantidad de finca activas en el país, se podría hacer necesario el muestreo del 50% de las camaroneras o incluso más. Pero sí se observaron tendencias entre algunos factores de riesgo y la ausencia de *Vibrio* spp., principalmente cuando el volumen de agua fue alto (>40 000 m<sup>3</sup>), la tasa de recambio de agua baja (<30%) y un historial sobre enfermedades poco numeroso. Se hacen necesarias más investigaciones que abarquen una mayor cantidad de fincas camaroneras para ofrecer robustez a los estudios sobre factores de riesgo asociados a la enfermedad bacteriana. Investigaciones como las realizadas en este estudio son importantes de realizar y divulgar, ya que pueden ayudar a los productores a mejorar variables en sus fincas con el fin de optimizar la producción y prevenir o disminuir enfermedades infecciosas.

En la segunda investigación, se determinó la presencia del virus del síndrome de la mancha blanca en una (6,7%) de 15 fincas analizadas. Este hallazgo concuerda con registros de casos de WSSV reportados desde el año 2006 en nuestro país (SENASA, 2017), lo que implica que el agente se ha mantenido presente en el país a través del tiempo. Sin embargo, se determinó una baja presencia, contrario a lo reportado por Morales et al. (2011), quienes encontraron prevalencias de WSSV entre el 15 y 100% entre el 2008 y 2009 en Costa Rica, y tampoco concuerda con lo presentado por Varela y Peña (2013), quienes diagnosticaron oficialmente, durante el 2012 y 2013, un total de 45 casos de WSSV

mediante PCR, sin indicar los lugares de origen de las muestras. En contraste, en otro estudio realizado en tres fincas productoras de camarón en la misma región durante el periodo 2013-2014, no se obtuvieron resultados positivos a WSSV (Peña y Varela, 2016).

Es posible que la presencia del virus en el país se vea influenciada por cambios en las condiciones ambientales como la temperatura, la susceptibilidad de los organismos, el estado fisiológico o la carga viral, aunado a que las investigaciones realizadas hasta la fecha en el país, no han sido continuas y sistemáticas a través del tiempo. A temperaturas cercanas a los 25°C WSSV se desarrolla rápidamente, y a condiciones de hipertermia la replicación del virus se detiene, explicando porque los brotes ocurren con mayor frecuencia en las épocas de menor temperatura del agua (Vidal et al., 2001; Granja et al., 2003; Lightner, 2011). En el presente estudio la finca positiva mostró condiciones ambientales variables como la temperatura que pudieron incidir en el desarrollo de la enfermedad, lo que incrementaría la expresión del virus (Vázquez et al., 2016).

En algunos estudios, el uso del PCR anidado ha arrojado que resultados falsos negativos den fincas con una baja carga viral, por lo que se recomienda utilizar técnicas más sensibles como PCR tiempo (Dhar et al. (2001), sin embargo, esta es una técnica de mayor costo económico y que no siempre se puede implementar por este motivo.

La secuencia del gen VP41B de WSSV amplificada en el presente trabajo fue similar a la secuencia detectada en camarones de *Penaeus monodon* en Taiwan (Tsai et al. 2000) y *Penaeus vannamei* en México (Rodríguez et al. 2016). El genoma completo de WSSV se ha obtenido en diferentes países del mundo, y se ha notado eliminación de proteínas de la envoltura y la cápside del virus de WSSV, afectando el reconocimiento de la célula huésped y la respuesta inmune ante WSSV, además de reducir la capacidad del virus para causar mortalidad (Restrepo et al. 2018). En este sentido, la secuencia obtenida en este estudio es muy pequeña (306 pb) y se requerirá la secuencia completa del genoma para saber si la cepa viral que afecta a Costa Rica es idéntica a los demás países.

Como WSSV es una enfermedad de declaración obligatoria en Costa Rica, el estanque debe ser aislado y en casos de alta mortalidad de los animales, se debe eliminar la producción y seguir medidas sanitarias, como el impedimento de entrada a personas (SENASA, 2005). Cuéllar-Anjel et al. (2014) recomendaron además interrumpir la producción, realizar un secado total del estanque en la estación seca para impedir el ciclo de infección y eliminar posibles fuentes de contagio (moluscos, copépodos y otros crustáceos). Sin embargo, si las tallas de los camarones son adecuadas para la comercialización, se deben cosechar con la finalidad de reducir las pérdidas económicas y minimizar la proliferación del virus (Cuéllar-Anjel, 2013).

El único caso positivo a WSSV, presentó la particularidad de que fue una finca del Golfo de Nicoya que apenas alcanza la hectárea y media de espejo de agua, y los parámetros productivos no son los óptimos para la producción de camarón (Cuéllar-Anjel et al., 2014). Esto podría favorecer un aumento en la proliferación de enfermedades dentro del estanque, principalmente por factores asociados a la calidad del agua como pueden ser las variaciones de la temperatura, ya que podrían estar generando estrés en los camarones y hacerlos más susceptibles a los patógenos, coincidiendo con Lazur (2007) que hace referencia a la asociación entre la calidad del agua y la presencia de enfermedades.

Al no existir tratamientos que controlen a WSSV ni sus mortalidades (Esparza et al., 2009), la implementación de medidas de bioseguridad como el tratamiento del agua por medio de la desinfección del estanque con hipoclorito de sodio, cal, detergentes o compuestos orgánicos parecen ser la única alternativa para reducir el riesgo de entrada de WSSV a las fincas camaroneras (Lightner, 2005). A la vez, se sugiere, como método de prevención, realizar evaluaciones de la salud de los camarones de forma semanal, ya que se podría tener una diseminación de la enfermedad entre los estanques de la misma finca o entre estanques ubicados en la misma región sin que los productores lo perciban (Cuéllar-Anjel et al., 2014).

Se recomienda en un futuro estudio, determinar las mortalidades y pérdidas económicas que ocasiona AHPND en las fincas camaroneras de Costa Rica. Además, de continuar con investigaciones sobre variables de manejo y capacitar a

los productores sobre el manejo de la calidad del agua, con la finalidad de mantener un ambiente sano para los animales, que limite la proliferación de bacterias y maximice el crecimiento de los camarones.

Se deben realizar estudios sobre la presencia de genes de resistencia a la tetraciclina en cepas de AHPND, y desarrollar investigaciones que prueben el valor de los probióticos en el cultivo de camarones. Además, se deberían realizar estudios sobre la situación actual de la enfermedad en el país y si la información que se obtenga coincide con los casos que se han venido diagnosticando de forma oficial. En este estudio no se analizaron los resultados de los parámetros productivos de las fincas analizadas ni la cantidad de producto obtenido en la cosecha, por lo que no se logró determinar el efecto del patógeno sobre la mortalidad, las conversiones alimenticias y su asociación con otros agentes causales de enfermedades.

Las autoridades sanitarias deberán iniciar campañas de capacitación en el uso de medicamentos, manejo de sedimentos, buenas prácticas de manejo, y determinar, si eventualmente el uso de probióticos ayuda a mejorar la producción, así como incentivar a los productores a controlar los parámetros físico-químicos del agua. Se debe mantener la vigilancia por parte de las autoridades sanitarias, controlar la importación de postlarvas de países no libres de enfermedades para reducir la transmisión transfronteriza y evaluar si WSSV está generando el mismo impacto negativo que en los últimos años.

## CONCLUSIONES GENERALES

- De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó por primera vez para Costa Rica mediante diagnóstico molecular la presencia de AHPND en fincas camaroneras de Costa Rica, donde una tercera parte de las 15 fincas analizadas (33,3%) fue positiva a AHPND, siendo el hepatopancreas el principal órgano blanco.
- En Costa Rica todavía se detecta la presencia de WSSV mediante la implementación de técnicas moleculares y aunque no se encontró la presencia de EHP, no se descarta su presencia en el país.
- Se determinó una similitud de 100% entre los genes de AHPND de Costa Rica y Vietnam, no así con el genotipo mexicano, lo que podría indicar la presencia de nuevas cepas bacteriales presentes en la región y que posiblemente no han sido investigadas.
- La secuencia obtenida de WSSV fue igual a un patógeno aislado de *Penaeus monodon* en Taiwán y de *Penaeus vannamei* en México, por lo que estudios de secuenciación surgen como una alternativa para identificar la ruta de ingreso de los patógenos en los sistemas de producción de camarón.
- La mayoría de fincas mostró parámetros de calidad de agua por debajo de los recomendados, sobre todo del oxígeno disuelto, demostrando la necesidad que tienen los productores de mejorar las técnicas de manejo y el control de sus producciones.
- Se hace necesario el muestreo de más fincas que brinden más información sobre el manejo productivo y sanitario, esto podría mejorar el análisis estadístico entre la presencia de AHPND, *Vibrio* spp. y parámetros físico-químicas del agua.
- Se deben profundizar los estudios sobre los factores de riesgo, ya que varían de acuerdo a factores ambientales y humanos, además de evaluar las variables que podrían estar generando la aparición de enfermedades como las analizadas en esta investigación.

- El uso de antibióticos sigue siendo un factor a discutir entre los productores y especialistas del sector, ya que todas las fincas positivas a AHPND usaron antibióticos.

## RECOMENDACIONES GENERALES

- Informar a las autoridades sanitarias y los productores sobre los hallazgos específicos obtenidos en este estudio y especialmente sobre el caso positivo a WSSV ya que es una enfermedad de declaración obligatoria, con la finalidad de que tomen las medidas de control epidemiológico que sean necesarias.
- Capacitar a productores sobre buenas prácticas de manejo de la finca, monitoreo de los parámetros físico-químicos del agua, y medidas para prevenir y controlar AHPND, sobre todo el correcto manejo del sedimento.
- Reducir el uso de antibióticos con la finalidad de evitar la resistencia bacterial en los estanques y buscar alternativas que puedan sustituir el uso de estos medicamentos.
- Realizar diagnóstico molecular cuando hay sospecha de la presencia de AHPND.
- Para trabajos futuros, analizar sedimentos y calcular pérdidas entre fincas positivas y negativas, ampliar el número de fincas para generar robustez del análisis estadístico y estudios sobre la utilidad de probióticos.
- Obtener las secuencias completas del genoma de interés, con la finalidad de generar información que permita un análisis robusto del origen filogenético y filogeográfico.
- Se recomienda, además, aislar las bacterias que ocasionan AHPND en Costa Rica por medio de técnicas bacteriológicas, para determinar su patogenicidad por medio de bioensayos con organismos libres de enfermedades.
- Realizar monitoreo de todas las fincas mediante PCR tiempo real para determinar la prevalencia de WSSV en Costa Rica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badhul, M.A., Vignesh, R., & Srinivasan, M. (2012). Deep insight into white spot syndrome virus vaccines: A review. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* (2012): 73-77.
- Bustillo, M., Escobedo, C., & Sotelo, R. (2009). Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 44(1): 1-11.
- Cali, A., & Takvorian, P. (1999). Developmental morphology and life cycles of the Microsporidia, p. 85-128. En: Wittner M, Weiss L (ed), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington, DC.
- Carroza, C., F. Hurtado y X. Gutierrez (2012). Nitrogenated compounds biofiltration under alternative bacterium fixation substrates. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 40:772-785.
- Castillo, H., Campos, G., Caballero, A., & Montaldo, H. (2015). Genetic improvement of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: perspectives for genomic selection. *Front. Genet.* 6: 93.
- Chen, L.L., Wang, H.C., Huang, C.J., Peng, S.E., Chen, Y.G., Lin, S.J., Chen, W.Y., Dai, C.F., Yu, H.T., Wang, C.H., Lo, C.F. & Kou, G.H. (2002). Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 301: 136-147.
- Chumpol, S., Kantachote, D., Rattanachuy, P., Vuddhakul, V., Nitoda T. & Kanzaki H. (2017). In vitro and in vivo selection of probiotic purple nonsulphur bacteria with an ability to inhibit shrimp pathogens: Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios. *Aquacult. Res.* 3(6): 22-34.
- Cuéllar-Anjel, J. (2013). Enfermedad de las manchas blancas. Recuperado de: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/white-spot-disease-es.pdf> [Consultado el 11 de Marzo del 2017].
- Cuéllar-Anjel, J., Chamorro, R., White-Noble, B., Schofield, P., & Lightner, D. V. (2011). Testing finds resistance to WSSV in shrimp from panamanian breeding program. *Glob. Aquac. Advocate.* 14(4): 65-66.

- Cuéllar-Anjel, J., Morales, V., Lara, C. & García, O. (2014). Buenas prácticas y bioseguridad para el cultivo del camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931). En: V. Morales, y J. Cuéllar-Anjel, editores, Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos, 2da ed. OIRSA, Rep. de Panamá, PAN. p. 330-360.
- Dong, X., Hailiang, V., Xie, G., Peizhuo, Z., Chengcheng, G., Yan, L., & Huang, J. (2017). An isolate of *Vibrio campbelli* carrying the pir<sup>VP</sup> gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease. *Emerg. Microb. Infect.* 6: 1-3.
- Durand, S.V., Tang, K.F.J., & Lightner, D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health.* 12: 128-135.
- Escobedo-Bonilla, C.M. (2016). Emerging Infectious diseases affecting farmed shrimp in Mexico. *Austin J. Biotechnol. Bioeng.* 3(2):1062.
- Escobedo-Bonilla, C.M., Vega-Peña, S., & Mejía-Ruiz, C.H. (2015). Efficacy of double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) non-structural (orf89, wsv191) and structural (vp28, vp26) genes in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. King Saud University Sci.* 27: 182-188.
- Escobedo-Bonilla, C.M., Alday, V., Wille, M., Sorgeloss, P., Pensaert, M.B., & Nauwynck, H.J. (2008). A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish Dis.* 31: 1-18.
- Esparza-Leal, H.M., Escobedo-Bonilla, C.M., Casillas-Hernández, R., Álvarez-Ruiz, P., Portillo-Clarck, G., Valerio-García, R.C., ..., & Magallón-Barajas, J. (2009). Detection of white spot syndrome virus in filtered shrimp-farm water fractions and experimental evaluation of its infectivity in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 292: 16-22.
- FAO. (2018). *The state of world Fisheries and aquaculture*. Roma, Italia. 234 pp.
- Gómez, B., Roque, A., & Guerra, A.L. (2001). Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto de uso de antimicrobianos. In Páez-Osuna, F. ed. *Camaronicultura y Medio Ambiente*. UNAM. Mazatlán, Sinaloa México. p. 315-346.

- Ha, N.T.H., Ha, D.T., Thuy, N.T., & Lien, V.T.K. (2010). *Enterocytozoon hepatopenaei* has been detected parasitizing tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultured in Vietnam and showing white feces syndrome (In Vietnamese with English abstract). *Agric. Rural Dev. Sci. Technol.* 12: 45-50.
- Han, J.E., Tang, K.F.J., Tran, L.H., & Lightner, D.V. (2015a). *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 113: 33-40.
- Han, J.E., Tang, K.F.J., & Lightner, D.V. (2015b). Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 115: 245-251.
- Hudson, D.A., Hudson, N.B., & Pyecroft, S.B. (2001). Mortalities of *Penaeus japonicus* prawns associated with microsporidean infection. *Aust. Vet. J.* 79: 504-505.
- Hung-Chiao, L., Tze, N., Masahiro, A., Chung-Te, L., I-Tung, C., Jie-Cheng, C., ..., & Han-Ching, W. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish Shell. Immunol.* 47: 1006-1014.
- Jun, J.W., Han, J.E., Tang, K.F.J., Lightner, D.V., & Kin, J. (2016). Potential application of bacteriophage pVp-1: Agent combating *Vibrio parahaemolyticus* strains associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Aquaculture* 457: 100-103.
- Kmmari, S., Rathlavath, S., Pillai, D. & Rajesh, G. (2018). Hepatopancreatic Microsporidiasis (HPM) in Shrimp Culture: A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7(01): 3208-3215.
- Kondo, H., Van, P.T., Dang, L.T. & Hirono, I. (2015). Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.* 3(5): 1-2.
- Krishna, B., Kumar, V., Mohan, J.R., Rai, P., Mallappa, B., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2014). Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp)

- in India. *Aquaculture* 433: 247-251.
- Laisutisan, K., Prasertsri, S., Chuchird, N., & Limsuwan, C. (2009). Ultrastructure of the microsporidian *Thelohania (Agmasoma) penaei* in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Kasetsart Univ. Fish. Res. Bull.* 33: 41-48.
- Lightner, D.V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *J. Invertebr. Pathol.* 106: 110-130.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C., Noble, B.L., Nunan, L.M., Tran, L. & Gomez, S. (2013). Documentation of an Emerging Disease (Early Mortality Syndrome) in SE Asia & Mexico. Recuperado de: [http://www.enaca.org/publications/health/ahpnsterminalworkshop/Presentation%202002\\_LIGHTNER\\_Diagnostic%20studies.pdf](http://www.enaca.org/publications/health/ahpnsterminalworkshop/Presentation%202002_LIGHTNER_Diagnostic%20studies.pdf) [Consultado el 16 de Noviembre del 2016].
- Liu, L., Xiao, J., Xia, X., Pan, Y., Yan, S. & Wang, Y. 2015. Draft genome sequence of *Vibrio owensii* strain SH-14, which causes shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease. *Genome Announc.* 3(6): 1-2.
- Lo C.F., Aoki, T., Bonami, J.R., Flegel, T.W., Leu, J.H., Lightner, D.V., Stentiford, G., Söderhäll, K., Walker, P.W., Wang, H.C., Xun, X., Yang, F., & Vlaskovits, J.M. (2012). *Nimaviridae*. Pp. 229-234. En: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., M.J. Adams, E.B. Carstens, & E.J. Lefkowitz (eds.). Elsevier Academic Press, San Diego, CA. USA.
- López-León, P., Luna-González, A., Escamilla-Montes, R., Flores-Miranda, M.C., Fierro-Coronado, J.A., Álvarez-Ruiz, P., & Diarte-Plata. (2016). Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44(3): 470-479.
- Luan, X., Chen, J., Zhang, X., Jia, J., Sun, F. & Li, Y. (2007). Comparison of different primers for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 242-247.
- Melgar, C.E., Barba, E., Álvarez, C.A, Tovilla, C., & Sánchez, A.J. (2013). Microorganisms effect with probiotic potential in water quality and growth

- of the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) in intensive culture. *Rev. Biol. Trop.* 61 (3), 1215-1228.
- Morales, V. & Cuéllar-Anjel, J. (2014). Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos, 2da ed. OIRSA, Rep. de Panamá, PAN. p. 330-360.
- Morales-Covarrubias, M.S. & Gómez-Gil, B. (2014). Enfermedades bacterianas de camarones. En: V. Morales, y J. Cuéllar-Anjel, editores, Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos, 2da ed. OIRSA, Rep. de Panamá, PAN. p. 167-171.
- NACA. (2015). *Hepatopancreatic microsporidiosis caused by Enterocytozoon hepatopenaei*. Department of Agriculture. Australian Government. Recuperado de: <http://enaca.org/publications/health/disease-cards/ehp-disease-card-2015.pdf>. [Consultado el 16 de Noviembre del 2016].
- Nunan, L., Pantoja, C., Gomez-Jimenez, S. & Lightner, D. (2013). “*Candidatus hepatobacter penaei*,” an intracellular pathogenic enteric bacterium in the hepatopancreas of the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 1407-1409.
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Org.* 111: 81-86.
- OIE. (2009). *White Spot Disease*. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. Chapter 2.2.5. Recuperado de: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/2009/2.2.05\\_WSD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2009/2.2.05_WSD.pdf) [Consultado el 29 de Octubre del 2016]
- OIE. (2013). *Acute hepatopancreatic necrosis disease, aetiology epidemiology diagnosis prevention and control references*. Recuperado de: [www.oie.int/.../eng/.../AHPND\\_DEC\\_2013.pdf](http://www.oie.int/.../eng/.../AHPND_DEC_2013.pdf) [Consultado el 29 de Octubre del 2016]
- OIE. (2018). Infection with *Hepatobacter penaei* (Necrotising hepatopancreatitis). Recuperado de: [www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/chapitre\\_necrotising\\_hepatopancreatitis.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_necrotising_hepatopancreatitis.pdf) [Consultado el 04 de Enero del 2018]

- Pantoja, C. & D.V. Lightner. (2014a). EMS/AHPND Descripción de la enfermedad en Asia y América. p.172-177. En: Morales, V. & J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2014. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones *Penaei-* dos. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.
- Pantoja, C. & D.V. Lightner. (2014b). Enfermedades virales del camarón. p.99-103. En: Morales, V. & J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2014. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones *Penaeidos*. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.
- Peña, N. & Varela, A. (2016). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas en el camarón blanco *Penaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 51(3): 553-564.
- Prachumwat, A., Taengchaiyaphum, S., Mungkongwongsiri, N., Diva, J.A.C., Flegel, T.W. & Sritunyalucksana, K. (2018). Update on early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease by April 2018. *J. World Aquacult. Soc.* 2018: 1–13.
- Rajendran, K.V., Shivam, S., Praveena, P.E., Sahaya J.J., Kumar, T.S., Avunje, S., ..., & Vijayan, K.K. (2016). Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture* 454: 272-280.
- Sánchez, A. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern: Review article. *Vet. Res.* 41: 43.
- Santhoshkumar, S., Sivakumar, S., Vimal, S., Abdul, S., Taju, G., Haribabu, P., ..., & Sahul, S. (2016). Biochemical changes and tissue distribution of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in naturally and experimentally EHP-infected whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), in India. *J. Fish Dis.* 40(4): 529-539.
- SENASA (2010). Protocolo de Vigilancia Epidemiológica para la Enfermedad de las Manchas Blancas. Recuperado de: <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/141211080925.doc>. [Consultado el 04 de Enero del 2018]
- Stentiford, G.D., & Lightner, D.V. (2011). Cases of White Spot Disease (WSD) in European shrimp farms. *Aquaculture* 319: 302-306.

- Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Redman, R.M., Han, J.E., Tran, L.H., & Lightner, D.V. (2015). Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. *J. Invert. Pathol.* 130: 37-41.
- Tang, K., Aranguren, F., Han, J. E., Maskaykina, I., Schmidt M., & Lightner, D. (2017). Histopathology and in situ detection of the microsporidian *enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in *penaeus vannamei* cultured in a Latin America country. Recuperado de: <https://www.was.org/meetings/ShowAbstract.aspx?Id=46059> [Consultado el 15 de Marzo del 2017].
- Tangprasittipap, A., Srisala, J., Chouwdee, S., Somboon, M., Chuchird, N., Limsuwan, C., ..., & Sritunyalucksana, K. (2013). The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *BMC Vet. Res.* 9: 139.
- Tendencia, E.A., Bosma, R.H., Verreth, J.A.J. (2011). White spot syndrome virus (WSSV) risk factors associated with farming practices in polyculture and monoculture farms in the Philippines. *Aquaculture* 311(1):87–93
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P.V., Sritunyalucksana, K, Flegel, T.W., & Itsathphaisam, O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture* 462: 69-87.
- Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Sriurairatana, S., Chavadej, J., ..., & Withyachumnarnkul, B. (2009). *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *J. Invert. Pathol.* 102: 21-29.
- Tsai, M.F., Lo, C.F., van Hulten, M.C.W., Tzeng, H.F., Chou, C.M., Huang, C.J., Wang, C.H., Lin, J.Y., Vlak, J.M & Kou, G.H. 2000. Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 277: 92-99.

- Tran, L., Nunan, L., Redman, R., Mohny, L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K., & Lightner, D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 105: 45-55.
- Valverde, J.A., & Alfaro, J. (2013). La experiencia del cultivo comercial de camarones marinos en estanques de producción en Costa Rica. *Rev. Mar. Cost.* 5: 87-105.
- Valverde, J.A., & Alfaro, J. (2014). Productibilidad y rentabilidad del cultivo de camarones marinos en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Mar. Cost.* 6: 37-53.
- Vásquez-Sauceda M.L., Sánchez-Martínez, J.G., Pérez-Castañeda, R., Rábago-Castro, J.L., Aguirre-Guzmán, G., & Vargas-Cruz, D.Y. (2016). White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP) detection in wild shrimp of the San Andrés Lagoon, Mexico. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 51: 455-459.
- 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. *J. Virol.* 75: 11811-11820.

## ANEXO

### 1. Encuesta

Universidad Nacional

Programa Regional de Ciencias Veterinarias Tropicales

#### SITUACIÓN SANITARIA DEL CAMARÓN BLANCO (PENAEUS VANNAMEI) EN ZONAS PRODUCTIVAS DE COSTA RICA.

##### Encuesta diagnóstica

Estimado productor de camarón:

Como parte del proyecto realizado por Programa Regional de Ciencias Veterinarias Tropicales, de la Universidad Nacional, en la Maestría en enfermedades tropicales. Creemos en la necesidad de colaborar directamente con el sector acuícola y de forma conjunta mejorar la producción camaronera nacional. Por ello, con el fin de contribuir directamente al trabajo que realiza, interesa conocer sobre algunas características del proceso en general, agradeceremos nos colabore con la siguiente información, la cual será manejada con respeto, confidencialidad y profesionalismo.

Encuesta N°: \_\_\_\_\_

Nombre del encuestador: \_\_\_\_\_

Fecha de aplicación de encuesta: \_\_\_\_\_

Datos generales					
1. Nombre del propietario de la finca					
Ubicación geográfica	2. Provincia		3. Cantón		4. Distrito
		1. Guanacaste		1. Abangares	1. Colorado
				2. Nandayure	1. San Pablo

		2. Puntarenas		1. Puntarenas		1. Chomes
						2. Lepanto
<b>5. Coordenadas geográficas (grados, minutos y segundos)</b>	1. Latitud: _____					
	2. Longitud: _____					
<b>6. Código Sistema Informático de Registro de Establecimiento Agropecuario (SIREA)</b>						
<b>7. Área de cultivo</b>	1. Menor a dos hectáreas					
	2. De dos a tres hectáreas					
	3. De tres a cuatro hectáreas					
	4. Más de cuatro hectáreas					
<b>8. Área del estanque (m<sup>2</sup>)</b>						
<b>9. Sistema de producción</b>	1. Intensivo					
	2. Semi-intensivo					
	3. Extensivo					
<b>10. Estructura para la producción acuícola</b>	1. Familiar (Negocio familiar)					
	2. Asociados (Negocio con terceros)					
	3. Venta como carnada					
<b>11. Cantidad de empleados con que cuenta la finca</b>						
<b>12. ¿Para la producción de la finca, es necesario la contratación de empleados externos a su familia?</b>	1. Si					
	2. No					
	3. No aplica					
<b>13. Cuál es la distancia con respecto la finca camaronera más cercana?</b>	1. Menos de 1 kilómetro					
	2. De 1 a 2 kilómetros					
	3. De 2 a 3 kilómetros					
	4. Más de 3 kilómetros					
<b>14. El estanque de cultivo con respecto a las coordenadas geográficas con qué colinda?</b>	1. Norte: Montaña					
	2. Este: Manglar					
	3. Oeste: Fincas camaroneras					

		4. Sur: Fincas camaroneras
15. De donde proviene el agua que utiliza para llenar el estanque o realizar los recambios?		1. Directamente del mar
		2. Del estuario
		3. De otras fincas
		4. Otros, especifique: _____

Datos del sistema de producción		
16. Fecha de siembra		
17. Densidad de siembra (por hectárea)		1. Menos de 100 mil
		2. De 100 a 300 mil
		3. De 300 a 500 mil
		4. De 500 a 700 mil
		5. Más de 700 mil
18. Origen de las postlavas		1. Nicaragua
		2. Ecuador
		3. Panamá
		4. Otros, especifique: _____
19. Volumen aproximado de agua en el estanque de cultivo (m <sup>3</sup> )		
20. Tasa de recambio de agua en el estanque (% o m <sup>3</sup> / día)		
21. Método de alimentación		1. Al boleo
		2. Comederos
		3. Otros, especifique: _____
22. Utiliza usted tablas de alimentación?		1. Si
		2. No

<b>23. Cual es la conversión alimenticia final aproximada por ciclo?</b>		
<b>24. ¿Cuenta usted con bodega para el almacenamiento de alimentos concentrados?</b>		1. Si
		2. No
<b>25. El sitio de almacenamiento cuenta con:</b>		1. Sistema de ventilación
		2. Sistema de control de humedad e iluminación
		3. Espacio de almacenaje limpio, seco y ordenado
		4. Inventario u hoja de registro del ingreso y salida de producto
		5. tarimas, pilas, estibas o espacios específicos de almacenaje elevados del piso
		6. Control de plagas (insectos, roedores, etc.)
		7. Temperatura entre 20 y 30 grados
<b>26. Tipo de alimento</b>		1. Orgánico ( ) : marca_____
		2. Convencional ( ) : marca_Nicovita
<b>27. Frecuencia de alimentación</b>		1. Una vez al día
		2. Dos veces al día
		3. Tres veces al día o más
<b>28. Duración promedio del ciclo de producción</b>		1. Menos de 3 meses
		2. De 3 a 4 meses
		3. De 4 a 5 meses
		4. Más de 5 meses
<b>29. Número de raleos por cosecha</b>		1. No realiza
		2. Una vez
		2. Dos veces
		3. Tres o más veces
<b>30. Ciclos de cultivo por año</b>		1. Una vez al año
		2. Dos veces al año
		3. Tres o más veces al año
		Si ( ) Cúal:

<b>31. Utiliza antibióticos en su finca?</b>		No ( )	
<b>32. Cuántas veces utiliza antibióticos en su finca?</b>		1. Una vez por cosecha	
		2. Dos veces por cosecha	
		3. Tres o más veces por cosecha	
		4. No aplica	
<b>33. ¿Aplica usted periodo de secado?</b>		1. Si	<b>34. Por cuanto tiempo aplica el periodo de secado?: _____</b>
		2. No	
<b>35. Tipos de productos y técnicas que aplicas durante el secado?</b>			
<b>36. ¿De los siguientes problemas, cuáles identifica en su finca? Enumérelos del 1 al 9, siendo que 1 es el más importante y el 9 es el menos importante, en caso de que tenga algún otro problema por considerar y no se encuentre en la lista, indíquelo.</b>		1. Calidad de aguas	
		2. Calidad de la postlarva	
		3. Enfermedades	
		4. Depredadores	
		5. Falta de apoyo de autoridades institucionales	
		6. Manejo del manglar	
		7. Capacitaciones	
		8. Cálculo de raciones alimenticias	
		9. Mortalidad (%)	
		10. Otro, _____	
<b>37. Que parámetros sobre calidad de aguas mide en su estanque?</b>		1. Oxígeno	
		2. Temperatura	
		3. Salinidad	
		4. Otros, especifique:	
		5. Ninguno	
<b>38. Cuando siembra, cómo mide la calidad de las postlarvas?</b>			
		1. Mancha Blanca	

<b>39. Reconoce usted alguna de las siguientes enfermedades:</b>		2. Síndrome de la mortalidad temprana
		3. Necrosis del hepatopáncreas
		4. Mortalidad encubierta
		5. Parásitos
		6. Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa
		7. Ninguna
		8. No sabe
	<b>40. Cuáles de las siguientes enfermedades, se han presentado en su finca.</b>	
		2. Síndrome de la mortalidad temprana
		3. Necrosis del hepatopáncreas
		4. Mortalidad encubierta
		5. Parásitos
		6. Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa
		7. Ninguna
		8. No sabe
<b>41. Inquiere un valor estimado de pérdidas económicas cuando se presenta una enfermedad:</b>		1. Menos de 100 000 colones
		2. De 100 000 a 500 000 colones
		3. De 500 000 a 1 000 000 colones
		4. Más de 1 000 000 colones
<b>42. Cuántas veces se presenta la enfermedad en los camarones durante el ciclo productivo?</b>		1. Nunca
		2. Una vez
		3. Dos veces
		4. Tres veces
<b>43. Cuáles son las medidas correctivas que realiza cuando se presenta una enfermedad?</b>		
<b>44. Cuáles son los tipos de depredadores más comunes en su finca?</b>		1. Aves
		2. Reptiles
		3. Seres humanos

		4. Otros, especifique: _____
45. En su finca, se ocupan del manejo del manglar?		1. Si
		2. No
46. ¿De qué forma se maneja el manglar?		1. Reforestación
		2. Se conserva intacto
		3. Desconoce el tema
		4. Se utiliza el recurso ocasionalmente
		5. Otros, especifique: Se recorta con permisos
<b>Medidas para mejorar los procesos de producción</b>		
47. Conoce usted sobre programas que se fomenten desde las autoridades instituciones en pesca y acuicultura para mejorar o fomentar el cultivo de camarón?		1. Si
		2. No
48. Conoce usted si las autoridades del país fomentan el cultivo de camarones en el país?		1. Si
		2. No
49. Considera usted que las instituciones y autoridades institucionales fomentan el cultivo de camarones en el país.		1. Si
		2. No
50. Ha recibido usted capacitación para mejorar el proceso de producción de camarón?		1. Si
		2. No
51. En caso de responder afirmativamente la pregunta 51, responda la siguiente pregunta, y si no pase a la pregunta 55. La institución que brindó la capacitación fue:		1. Pública
		2. Privada
52. Qué institución o ente la brindó?		
53. ¿Cuántas capacitaciones recibe al año?		1. Una vez al año
		2. Dos veces al año
		3. Tres o más veces al año

		4. No recibe ninguna
<b>54. ¿En qué temas le gustaría o tendría interés en capacitarse?</b>		1. Nutrición
		2. Enfermedades
		3. Calidad de aguas
		4. Administración
		5. Sostenibilidad
		6. Otros, especifique: _____
<b>Observaciones generales:</b> _____ _____ _____		

**¡Muchas gracias por su tiempo!**