

Baculovirus penaei* como factor de riesgo para infecciones bacterianas en hepatopáncreas de *Penaeus vannamei

Baculovirus penaei* as a risk factor for bacterial infections in the hepatopancreas of *Penaeus vannamei

Alexander Varela-Mejías^{1,3}, José Valverde-Moya^{2,4}

RESUMEN

La incidencia de infecciones bacterianas en hepatopáncreas de camarones cultivados en el Golfo de Nicoya, Costa Rica, presentó un alto impacto en los cultivos en 2016-2017, afectando la sobrevivencia de los animales y las producciones de las granjas camaroneras. Además, se presentaron incidencias importantes de *Baculovirus penaei*, detectado en poslarvas utilizadas en parte de los estanques. Se realizó un análisis *Odds Ratio* en un estudio observacional de tipo Caso-Control para determinar la posible participación de este virus como factor de riesgo hacia bacteriosis ulteriores. El estudio demuestra la activa participación de *Baculovirus penaei* como un importante factor de riesgo. Se presentan datos de sobrevivencias por estanques infectados por el virus vs estanques libres.

Palabras clave: Baculovirus; poslarvas; bacteriosis; factor de riesgo; *Odds ratio*

ABSTRACT

The incidence of bacterial infections in shrimp hepatopancreas cultivated in the Gulf of Nicoya, Costa Rica, presented a high impact on yields in 2016-2017, affecting the survival of the animals and shrimp farm production. In addition, important incidences of *Baculovirus penaei*, detected in post-larvae used in part of the shrimp ponds, were reported. An Odds Ratio analysis was performed in an observational case-control study

¹ Laboratorio SRY, Departamento de Diagnóstico y Sanidad Acuícola, Sonora, México

² Instituto Nacional de Aprendizaje, Núcleo Náutico Pesquero, Puntarenas, Costa Rica

³ E-mail: alexander.varela@gmail.com

⁴ E-mail: jvalverdemoya@ina.ac.cr

Recibido: 27 de julio de 2018

Aceptado para publicación: 6 de enero de 2019

to determine the possible participation of this virus as a risk factor for subsequent bacterioses. The study demonstrates the active participation of *Baculovirus penaei* as an important risk factor. Survival data are presented by ponds infected by the virus vs free ponds.

Key words: Baculovirus; post larvae; bacterioses; risk factor; Odds ratio

INTRODUCCIÓN

Los cultivos de camarón en Latinoamérica han presentado frecuentes brotes de enfermedades, muchas veces asociados a daños en el hepatopáncreas. Estos brotes pueden presentarse con la participación de etiologías individuales o como coinfecciones por varios agentes causales (Cuéllar-Anjel *et al.*, 2012; Nunan *et al.*, 2014; Peña y Varela, 2016; Aranguren *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017), como puede ocurrir ante la combinación del *Baculovirus penaei* (BP) y diversas cepas de *Vibrio* spp (Varela-Mejías, 2018a).

BP ha sido reportado en los estadios larvales, poslarvales, juveniles y adultos de camarones peneidos cultivados en países de Norte, Centro y Sur América (Morales-Covarrubias y Chávez, 1999; Cuéllar-Anjel, 2015; OIE, 2016; Varela-Mejías, 2018a). Este virus fue renombrado como «*Virus de la poliedrosis nuclear con envoltura única del Penaeus vannamei*» (PvSNPV, por sus siglas en inglés) (Cuéllar-Anjel, 2015); no obstante, dada la gran difusión del nombre previo, se le suele seguir denominando como *Baculovirus penaei* o BP, y se le considera un agente de baja o moderada virulencia (Lightner, 1996; Lightner y Pantoja, 2002).

Prácticamente todas las especies de camarones peneidos en el continente americano han sido reportadas como susceptibles al BP (Lightner, 1996; Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Morales-Covarrubias, 2004). El mecanismo de transmisión utilizado por este agente es horizontal, mediante el contacto con

heces, cuerpos de oclusión, agua o detritos contaminados con el virus (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Morales-Covarrubias, 2004; OIE, 2016). Sus signos clínicos no son específicos, carecen de valor diagnóstico e incluyen reducciones en la tasa de crecimiento y alimentación, así como incrementos de infestaciones secundarias por epibiontes (Morales-Covarrubias y Chávez, 1999). Los animales severamente afectados pueden presentar una coloración pálida en el tracto digestivo (Lightner, 1996; Cuéllar-Anjel, 2015).

Entre los métodos utilizados para el diagnóstico de BP están el análisis en fresco, la histopatología, el uso de sondas moleculares, la microscopía electrónica, los bioensayos y el PCR (Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2004; Cuéllar-Anjel, 2015; OIE, 2016; Varela-Mejías, 2018a). De estos, la observación microscópica de tejidos en fresco o de cortes histopatológicos en tejidos procesados han sido los más utilizados por su sensibilidad, costo y accesibilidad. El diagnóstico se fundamenta en la detección de los cuerpos de oclusión piramidales dentro de los núcleos de las células epiteliales del hepatopáncreas o libres en el lumen tubular e intestinal (Lightner, 1996; Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Morales-Covarrubias, 2004; Cuéllar-Anjel, 2015; OIE, 2016; Varela-Mejías, 2018a).

Por su parte, los brotes bacteriales son causados principalmente por especies y cepas de *Vibrio* spp (Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2004; Varela y Peña, 2015; Peña y Varela, 2016; Valverde-Moya y Varela-Mejías, 2018a). Las bacteriosis en hepatopáncreas se han reportado en numerosas

ocasiones y regiones. Al igual que en el BP, los animales afectados presentan signos clínicos inespecíficos como anorexia, nado errático y debilidad (Lightner, 1988; Prieto y Rodríguez, 1993; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2004; Morales-Covarrubias y Gómez-Gil, 2014; Gómez-Gil *et al.*, 2015; Peña y Varela, 2016). Histopatológicamente, en los casos de necrosis séptica del hepatopáncreas se observa atrofia tubular y focos de acumulación de hemocitos rodeando tejidos lesionados, siendo común la presencia de encapsulaciones y necrosis tubular focal o multifocal (Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2004; Varela-Mejías, 2018a).

Un caso especial de bacteriosis es la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés), siendo esta una infección causada por cepas de *Vibrio*, entre ellas *V. parahaemolyticus*. Se reportó por primera vez en China en 2009, propagándose en varias regiones de Asia. Genera desprendimientos celulares masivos en los túbulos del hepatopáncreas causando alta mortalidad (NACA, 2012; FAO, 2013; Lightner *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2013; de la Peña *et al.*, 2015). En el continente americano, AHPND se diagnosticó por primera vez en 2013 en México (Lightner *et al.*, 2013; Nunan *et al.*, 2014), y posteriormente fue identificado en Centroamérica (Han *et al.*, 2015) y más recientemente en América del Sur (Restrepo *et al.*, 2016; Ahn *et al.*, 2017; Saavedra-Olivos *et al.*, 2018).

En los últimos años, Costa Rica ha presentado un incremento en casos de infecciones en sus cultivos, incluyendo a estos patógenos. La incidencia y prevalencia del BP ha sido particularmente alta (Varela-Mejías, 2018b), unido a la participación de brotes por diferentes especies de *Vibrio*, incluyendo *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *Vibrio* spp (Varela-Mejías y Elizondo-Ovares, 2018). Son pocas las granjas camaronícolas que realizan monitoreos regulares sobre el estado sanitario de sus cultivos y estos se realizan principalmente mediante análisis en fresco y bacteriología diferencial, y con me-

nor frecuencia, especialmente en casos sospechosos o de difícil diagnóstico, se recurre a la histopatología o PCR (Varela y Peña, 2015; Peña y Varela, 2016). Los casos detectados son comunicados al Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) mediante reportes oficiales.

Con estos antecedentes y con la intención de encontrar posibles correlaciones entre la incidencia del BP y el impacto de las bacteriosis, se presentan datos de sobrevivencia de 137 estanques de camarones cultivados en el Golfo de Nicoya, Costa Rica, afectados por BP y bacteriosis en 2016 y 2017. Se correlacionó el estado sanitario de las poslarvas y el impacto generado en infecciones bacteriales presentes durante el cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio abarcó desde el inicio del primer ciclo de cultivo de 2016 hasta el cierre del último ciclo de cultivo de 2017. Se analizaron 14 granjas, totalizando 137 estanques, ubicadas en las zonas de Colorado de Abangares y Jicaral de Puntarenas, a ambos márgenes del Golfo de Nicoya, Costa Rica (Figura 1). El estado sanitario de los lotes de poslarvas y poblaciones de estanques de engorda fue determinado en el Laboratorio de Patologías y Parasitología de Crustáceos, Costa Rica. Los animales analizados durante el estudio fueron capturados en forma aleatoria y se transportaron con vida hacia el laboratorio para su análisis.

Las muestras utilizadas para la detección de BP se procesaron por análisis en fresco y análisis histopatológico, según las técnicas descritas por Bell y Lightner (1988) y Lightner (1996). Se realizaron capturas de muestras durante la recepción de las poslarvas. Los análisis se basaron en la detección de los cuerpos de oclusión virales, mediante microscopía, con o sin tinción de contraste, usando verde malaquita. El proce-

samiento de los tejidos para el análisis histopatológico se realizó en el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE), donde los cortes de los tejidos se hicieron con 5 μ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las láminas procesadas se enviaron y analizaron en el Laboratorio de Patologías y Parasitología de Crustáceos. La cantidad de poslarvas procesadas por muestra fue de al menos 100 individuos, capturados en forma aleatoria de los lotes recibidos.

Se consideró como muestra positiva a BP a aquellas en las cuales se detectó al menos un animal infectado. Las muestras en las cuales no se detectaron lesiones u oclusiones o durante su seguimiento en la etapa de engorda se consideraron como «No detectado».

Los análisis bacteriológicos se realizaron durante muestreos de seguimiento y monitoreo general en los estanques de engorda. Se realizaron análisis semanales de por lo menos 10 animales por estanque utilizando muestras de hepatopáncreas y cultivándolas en agar selectivo-diferencial TCBS, específico para *Vibrio* sp, según lo descrito por Prieto y Rodríguez (1993) y Gómez-Gil *et al.* (2015).

Los datos de sobrevivencia fueron obtenidos a partir de los registros zootécnicos facilitados por los biólogos y productores de las granjas sometidas al estudio. Se estableció la sobrevivencia promedio general de los estanques del estudio a la cosecha como el punto de corte para el análisis de datos y se determinó su desviación estándar.

Adicionalmente, a partir de los datos obtenidos, se generaron dos subgrupos: a) estanques afectados por BP y por bacteriosis y b) estanques no afectados por BP, pero afectados por bacteriosis. Para ambos subgrupos se calculó la cantidad relativa de estanques con sobrevivencia inferior, igual o superior al promedio de sobrevivencia general, así como su respectiva desviación estándar.



Figura 1. Ubicación de las granjas camaroneras en Colorado de Abangares (a) y Jicaral de Puntarenas (b) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica

Se realizó un análisis transversal observacional de tipo caso:control, mediante una evaluación *Odds ratio*. La interpretación de este tipo de análisis se basa en el cálculo de la razón existente entre los casos y controles expuestos y los casos y controles no expuestos. Según el valor obtenido, un resultado menor a 1 es considerado como factor de protección y un resultado superior a 1 es considerado como factor de riesgo. Un *Odds ratio* igual a 1 indica que no existe relación entre el factor en estudio y el resultado obtenido, según la metodología descrita por de Blas *et al.* (2007).

Para los fines de este análisis, se consideraron como «expuestos» los animales diagnosticados con BP y como «no expuestos» a los animales no diagnosticados con BP. Así mismo, se consideró como «casos» los estanques cuya sobrevivencia fue menor al promedio general, y como «controles» aquellos cuya sobrevivencia fue igual o superior al promedio general. Este procedimiento englobó 137 estanques a cuyos registros de cosecha se tuvo acceso. Para el cálculo del *Odds ratio*, se estableció un nivel de con-

Cuadro 1. Sobrevivencias en granjas camaroneras con estanques “*expuestos*”, afectados por *Baculovirus penaei* (BP) y bacteriosis en el Golfo de Nicoya, Costa Rica

Laguna	Total	Sobr.	Animales	Laguna	Total	Sobr.	Animales
1	520,000	15.0	78,000	67	253,000	44.5	112,585
2	216,000	15.0	32,400	60	392,000	47.4	185,808
3	234,000	15.0	35,100	50	580,000	48.0	278,400
4	650,000	16.0	104,000	66	240,000	48.3	115,920
5	198,000	19.0	37,620	63	713,000	51.5	367,195
6	250,000	22.0	55,000	65	552,000	53.6	295,872
62	233,000	23.5	54,755	89	219,415	58.0	127,261
64	320,000	25.3	80,960	117	401,000	69.0	276,690
9	187,995	26.0	48,879	127	150,000	73.0	109,500
61	196,000	32.1	62,916	133	385,500	76.0	292,980
23	428,130	39.0	166,971	135	550,000	78.0	429,000
33	500,000	43.0	215,000	137	150,000	79.0	118,500
				Sobrevivencia %			
				42.4 ± 2.17			

fianza de 99% y se utilizó el software libre «WinEpi» (<http://www.winepi.net/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sobrevivencia general fue de 52%, con una desviación estándar de 15.2%. Los datos de los dos grupos del estudio se presentan en los Cuadros 1 y 2.

La sobrevivencia disminuyó a 42.0% en el subgrupo de 24 estanques expuestos al BP (Cuadro 1), lo que significó una reducción del 10% con respecto a la sobrevivencia general; además de presentar una gran variabilidad (desviación estándar de 21.7%).

En el caso de los 113 estanques del subgrupo no expuestos al BP (Cuadro 2) se presentó una sobrevivencia de $53.9 \pm 12.3\%$, ligeramente superior al promedio general.

Estos datos se resumen en el Cuadro 3, los cuales fueron utilizados para alimentar la matriz para el cálculo del *Odds ratio*. Los resultados obtenidos, así como los respectivos valores de significancia, se presentan en el Cuadro 4.

El valor calculado de *Odds ratio* fue de 3.5373, indicando que la exposición al BP representó un factor de riesgo a los lotes expuestos y una menor posibilidad de sobrevivencias por infecciones secundarias, específicamente para este caso, de bacteriosis en hepatopáncreas. Adicionalmente, mediante el uso de WinEpi, se determinó, con un nivel de confianza de 99%, que los estanques expuestos al BP (n=24) presentan entre 1.01 y 12.44 más probabilidades de concluir con sobrevivencias por debajo del promedio general debido a bacteriosis ulteriores que los estanques no expuestos al virus (n=113), usando los límites de aproximación logarítmica.

Cuadro 2. Sobrevivencias en granjas camaroneras con estanques que no presentaron infecciones por *Baculovirus penaei* (BP), pero que fueron afectadas por bacteriosis en el Golfo de Nicoya, Costa Rica

Laguna	Total	Sobr.	Animales	Laguna	Total	Sobr.	Animales
7	300,000	25.7	77,100	77	720,000	56.0	403,200
8	550,000	26.0	143,000	78	1,372,000	56.0	768,320
10	532,000	28.2	150,024	79	900,000	56.2	505,800
11	375,000	29.0	108,750	80	1,045,000	56.3	588,335
12	320,000	32.0	102,400	81	400,000	56.7	226,800
13	428,000	33.0	141,240	82	448,000	57.0	255,360
14	801,000	33.0	264,330	83	462,000	57.0	263,340
15	400,000	34.0	136,000	84	714,000	57.0	406,980
16	672,000	34.0	228,480	85	240,000	58.0	139,200
17	300,000	36.0	108,000	86	540,000	58.0	313,200
18	400,000	36.0	144,000	87	480,000	58.0	278,400
19	220,000	36.0	79,200	88	206,000	58.0	119,480
20	600,000	37.0	222,000	90	660,000	58.2	384,120
21	760,000	37.0	281,200	91	895,000	59.0	528,050
22	375,000	38.0	142,500	92	382,000	59.2	226,144
24	320,000	39.0	124,800	93	352,000	59.5	209,440
25	420,000	40.0	168,000	94	513,000	59.7	306,261
26	280,000	40.0	112,000	95	567,692	60.0	340,615
27	380,000	40.0	152,000	96	380,000	60.0	228,000
28	420,000	41.0	172,200	97	120,000	60.0	72,000
29	100,000	41.0	41,000	98	817,000	60.0	490,200
30	420,000	41.2	173,040	99	540,000	60.1	324,540
31	700,000	42.0	294,000	100	300,000	60.8	182,400
32	180,000	42.0	75,600	101	700,000	61.0	427,000
34	180,000	43.0	77,400	102	352,000	61.6	216,832
35	1,080,000	44.0	475,200	103	320,000	63.0	201,600
36	693,000	44.4	307,692	104	363,000	63.9	231,957
37	900,000	44.8	403,200	105	400,000	64.0	256,000
38	82,666	45.0	37,200	106	750,000	64.0	480,000
39	373,000	45.0	167,850	107	800,000	64.0	512,000
40	1,020,000	45.1	460,020	108	384,000	65.0	249,600
41	300,000	46.0	138,000	109	910,000	66.0	600,600
42	961,000	46.0	442,060	110	420,000	66.0	277,200
43	750,000	46.2	346,500	111	720,000	66.2	476,640
44	1,171,000	47.0	550,370	112	400,000	67.0	268,000
45	1,040,000	47.7	496,080	113	240,000	67.0	160,800
46	250,000	48.0	120,000	114	175,000	68.0	119,000
47	240,000	48.0	115,200	115	434,000	68.0	295,120
48	1,330,000	48.0	638,400	116	636,000	68.0	432,480
49	1,140,000	48.0	547,200	118	560,000	69.0	386,400
51	720,000	49.0	352,800	119	300,000	69.2	207,600
52	240,000	49.4	118,560	120	513,000	69.4	356,022
53	525,000	49.9	261,975	121	721,000	70.0	504,700
54	1,101,000	50.0	550,500	122	339,000	70.2	237,978
55	180,000	50.6	91,080	123	570,000	71.0	404,700
56	207,000	51.0	105,570	124	350,000	71.0	248,500
57	673,000	52.0	349,960	125	240,000	72.1	173,040
58	1,652,000	52.0	859,040	126	712,000	73.0	519,760
59	1,200,000	53.1	637,200	128	427,000	73.2	312,564
68	600,000	53.3	319,800	129	300,000	74.0	222,000
69	300,000	54.0	162,000	130	400,000	74.0	296,000
70	576,000	54.0	311,040	131	330,666	74.0	244,693
71	900,000	54.8	493,200	132	350,000	74.1	259,350
72	900,000	54.9	494,100	134	180,000	77.8	140,040
73	481,000	55.0	264,550	136	240,000	78.0	187,200
74	1,239,000	55.0	681,450				
75	963,000	56.0	539,280				
76	160,000	56.0	89,600				
					Sobrevivencia %		
					53.9 ± 12.6		

Cuadro 3. Resultados generales de los estanques del estudio entre los estanques “expuestos” y los estanques que no presentaron infecciones por BP durante los años 2016 y 2017 en el Golfo de Nicoya, Costa Rica

	Total	Expuestos	No expuestos
Estanques (n)	137	24	113
Sobrevivencia ± DE (%)	52 ± 15.2	42.0 ± 21.7	53.9 ± 12.6
Casos		17	46
Controles		7	67

Cuadro 4. Resultados de significancia del *Odds ratio*, presentando las diferencias entre los grupos “expuestos” y no expuestos a BP durante el periodo de estudio

Límites	Límites válidos
Significación	Resultado significativo
Aproximación logarítmica (IC 99%)	(1.0059; 12.4395)
Aproximación X ²	(1.0501; 11.9150)
Odds ratio	3.5373
Prevalencia entre expuestos (24)	70.83%
Prevalencia entre no expuestos (113)	40.71%

La prevalencia de estanques con mortalidad por encima del promedio general, causada por diversas bacterias en los estanques con animales expuestos previamente al BP fue de 70.83% contra 40.71% de prevalencia en estanques no expuestos a este virus, indicando un incremento significativo de mortalidad.

El hecho de que las infecciones previas por BP sean un factor de riesgo para ataques bacteriales posteriores era de esperarse,

considerando que este virus reduce la funcionalidad del hepatopáncreas, uno de los principales órganos del camarón (Bell y Lightner, 1988), lo cual afecta la digestión, retardando su crecimiento e incrementando la vulnerabilidad a los ataques por patógenos oportunistas (Aranguren *et al.*, 2017). Los resultados indican que es altamente recomendable utilizar únicamente lotes de poslarvas negativas al BP, con el propósito de reducir el riesgo o impacto de las enfermedades bacterianas que reduzcan o comprometan la sobrevivencia y el rendimiento productivo. Esto es especialmente importante para granjas que cuentan con historial de problemas bacteriales.

Agradecimiento

Los autores agradecen a los productores de camarón del Golfo de Nicoya, Costa Rica, por permitir el acceso a sus datos.

LITERATURA CITADA

1. Ahn YS, Piamsomboon P, Tang KFJ, Han JE, Kim JH. 2017. Complete genome sequence of acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio campbellii* LA16-V1, isolated from *Penaeus vannamei* cultured in a Latin American Country. Genome Announc 5: e01011-17. doi: 10.1128/genomeA.01011-1

2. **Aranguren LF, Han JE, Tang K. 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. doi: 10.1016/j.aquaculture.-2016.12.038
3. **Bell TA, Lightner DV. 1988.** A handbook of normal Penaeid shrimp histology. Baton Rouge, LA, USA: World Aquaculture Society. 114 p.
4. **Bondad-Reantaso MG, McGladdery SE, East I, Subasinghe R. 2001.** Asia diagnostic guide to aquatic animal diseases. FAO Fisheries Technical Paper No. 402/2. Rome: FAO. [Internet]. Available in: <http://www.fao.org/3/a-y1679e.pdf>
5. **Cuellar-Ánjel J. 2015.** *Baculovirus tetraedrica*. The Center for Food Security and Public Health, Iowa State University. [Internet]. Available in: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tetrahedral-baculovirus-es.pdf>
6. **Cuellar-Anjel J, Lightner DV, Pantoja C. 2012.** Síndrome de mortalidad temprana o síndrome de necrosis hepatopancreática aguda. The Center for Food Security and Public Health, Iowa State University. [Internet]. Available in: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/acute-hepatopancreatic-necrosis-disease-es.pdf>
7. **de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Bayot B, Ferreira C. 2007.** Manual de epidemiología veterinaria. Unidad de Patología Infecciosa y Epidemiológica. Zaragoza, España: Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. 180 p.
8. **de la Peña LD, Cabillon NA, Catedral DD, Amar EM, Usero RC, Monotilla WD, Calpe AT, et al. 2015.** Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis Aquat Organ* 116: 251-254. doi: 10.3354/dao02919
9. **[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013.** Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam: FAO. 53 p.
10. **Gomez-Gil B, Roque A, Soto-Rodríguez S. 2015.** Vibriosis en camarones y su diagnóstico. En: Ruiz-Luna A, Berlanga-Robles C, Betancourt-Lozano M (eds). *Avances en acuicultura y manejo ambiental*. México: Ed Trillas. p 137-150.
11. **Han JE, Tang KF, Lightner DV. 2015.** Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Dis Aquat Organ* 115: 245-251. doi: 10.3354/dao02906
12. **Lightner DV. 1988.** Vibrio disease of penaeid shrimp. In: Sindermann CJ, Lightner DV (eds). *Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture*. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Amsterdam: Elsevier. p 42-47.
13. **Lightner DV. 1996.** A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Louisiana, USA: World Aquaculture Society. 304 p.
14. **Lightner DV, Redman RM, Pantoja C, Noble BL, Nunan LM, Loc Tran. 2013.** Documentation of an emerging disease (early mortality syndrome) in SE Asia & Mexico. 6th Meeting of the Inter-American Committee on Aquatic Animal Health. World Organization for Animal Health. [Internet]. Available in: http://www.cesaibc.org/sitio/archivos/Donald%20Lightner_131014133831.pdf
15. **Lightner DV, Pantoja C. 2002.** Bioseguridad en el cultivo de camarones. Organismo di cooperazione e documentazione internazionale. CIDEA. Nicaragua: Univ. Centroamericana.

16. **Morales-Covarrubias MS. 2004.** Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. México: Ed Trillas. 122 p.
17. **Morales-Covarrubias MS, Chávez MC. 1999.** Manual para la detección de enfermedades de camarones peneidos utilizando análisis en fresco. México: Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo. 68 p.
18. **Morales-Covarrubias MS, Gomez-Gil B. 2014.** Enfermedades bacterianas de camarones. En: Morales VQ, Cuéllar-Anjel J (eds)- 2° ed. Guía técnica – Patología e inmunología de camarones Penaeidos. Panamá: Organismo Regional Internacional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). p 167-194.
19. **[NACA] Network of Aquacultures Centres in Asia-Pacific. 2012.** NACA/DAFF Asia-Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: early mortality syndrome (EMS) / Acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS). Bangkok, Thailand. [Internet]. Available in: http://www.fhs-afs.net/pdf/EMS-RC_Summary-and-Links.pdf
20. **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. doi: 10.3354/dao02776
21. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2016.** Manual de diagnóstico en animales acuáticos. Cap 2.2.10. 6th ed. París, Francia: OIE.
22. **Peña-Navarro N, Varela-Mejías A. 2016.** Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas en *Litopenaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. Rev Cienc Marinas Oceanografía 51: 553-564. doi: 10.4067/S0718-19572016000300007
23. **Prieto A, Rodríguez MC. 1993.** Diagnóstico y control de enfermedades bacterianas en camarón de cultivo. México DF: FAO. 66 p.
24. **Restrepo L, Bayot B, Betancourt I, Pinzón A. 2016.** Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* strain Ba94C2, associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from South America. Genom Data 9: 143-144. doi: 10.1016/j.gdata.2016.08.008
25. **Saavedra-Olivos KY, Peralta-Ortiz T, Ordinola-Zapata A, Sandoval-Ramayoni JE, Vieyra-Peña EG, Zapata-Cruz MA, Hidalgo-Mogollón A, et al. 2018.** Detección de una proteína asociada a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en *Litopenaeus vannamei* bajo cultivo semi-intensivo en Ecuador. Rev Inv Vet Perú 29: 328-338. doi: 10.15381/rivep.v29i1.14194
26. **Tang KFJ, Aranguren LF, Piamsomboon P, Han JE, Maskaykina IY, Schmidt MM. 2017.** Detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and Taura syndrome virus in *Penaeus vannamei* cultured in Venezuela. Aquaculture 480: 17-21. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.043
27. **Tran L, Nunan L, Redman RM, Mohny LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K, Lightner DV. 2013.** Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis Aquat Organ 105: 45-55. doi: 10.3354/dao02621
28. **Valverde-Moya JA, Varela-Mejías A. 2018.** Cultivo comercial de camarones *Litopenaeus vannamei* en Costa Rica durante El Niño 2015: la incidencia de enfermedades. Rev Inv Vet Perú 29: 188-204. doi: 10.15381/rivep.v29i1.14187
29. **Varela A, Peña N. 2015.** Hepatopancreatitis necrotizante asociada al Fenómeno del Niño, en cultivos de camarones del Golfo de Nicoya. Repertorio Científico 18(1): 29-34.

30. **Varela-Mejías A. 2018a.** Patologías del hepatopáncreas en camarones marinos cultivados en América y su diagnóstico diferencial mediante histopatología. Revista AquiaTIC 50: 13-30
31. **Varela-Mejías A. 2018b.** Incidencia detectada del *Baculovirus penaei* en muestras de post larvas de camarón importadas en Costa Rica. Repertorio Científico 21(1). En prensa.
32. **Varela-Mejías A, Elizondo-Ovares C. 2018.** Mionecrosis bacterial en camarones de cultivo en Costa Rica. Reporte de caso. Panorama Acuícola 23(5): 48-52.