



A.F. 138331



**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL**

**Facultad de ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas,  
Oceánicas y Recursos Naturales**

**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE IHHNV EN LOS SISTEMAS  
ECUATORIANOS DE PRODUCCIÓN DE CAMARÓN  
PENAEUS (LITOPENAEUS) VANNAMEI.”**

**PROYECTO DE INVESTIGACION**

Previo a la obtención del Título de:

**INGENIERA EN ACUICULTURA**

Presentada por:

**Denisse Estefanía Nuñez Santillán**

**Guayaquil –Ecuador**

**2016**

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL  
Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales  
Centro de Información Bibliotecaria

No. DE INVENTARIO: D-76573  
VALOR: 4,00  
CLASIFICACION: 575.12 / NOÑ  
FECHA DE INGRESO: 7/11/12  
PROCEDENCIA: .....  
SOLICITADO POR: .....

D-76573



## Diversidad Genética de IHHNV en los sistemas Ecuatorianos de producción de camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*.

Denisse Nuñez <sup>(1)</sup>, Bonny Bayot <sup>(2)</sup>, Irma Betancourt <sup>(3)</sup>, Leda Restrepo <sup>(4)</sup>, Leandro Bajaña <sup>(5)</sup>  
Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales <sup>(1)</sup>  
Escuela Superior Politécnica del Litoral <sup>(1)</sup>  
Campus Gustavo Galindo, Km 30,5 vía Perimetral, Código Postal, Guayaquil, Ecuador <sup>(1)</sup>  
[denunez@espol.edu.ec](mailto:denunez@espol.edu.ec), [bbayot@espol.edu.ec](mailto:bbayot@espol.edu.ec). <sup>(1)</sup>

\* Recordar que además del estudiante, el Director de Tesis es el coautor del Artículo y también debe registrarse en este apartado. <sup>(4)</sup> Nombre de la Universidad, <sup>(4)</sup> Título (s) Email(s) <sup>(4)</sup>

### Resumen

*El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) está asociado con crecimiento retardado y deformidades en camarones Penaeus (Litopenaeus) vannamei. El presente trabajo tuvo como objetivo obtener información de línea base sobre prevalencia y diversidad genética de las cepas de IHHNV circulando en Ecuador, y compararla con las secuencias de aislados virales de otras localidades geográficas. Las relaciones evolutivas de los aislados virales obtenidos en este estudio y 24 secuencias originarias de otros países productores de camarón fueron inferidas con el método discreto de máxima verosimilitud, usando el modelo de sustitución de nucleótidos de 2 parámetros de Kimura, como mejor ajuste de evolución molecular. El árbol filogenético mostró diferentes grupos de secuencias, diferenciando tanto el tipo de cepas (infecciosas versus no infecciosas) y el origen geográfico. Las muestras del Ecuador se ubicaron en un gran grupo de cepas infecciosas, pero presentando una diferenciación entre las cepas originarias del Guayas y las de El Oro, sugiriendo la presencia de genotipos en los aislados virales circulantes en el país. Los resultados encontrados pueden generar información útil para manejo a nivel de camaronerías (desarrollo de técnicas de diagnóstico más sensibles, estudios de correlación entre diversidad genética y virulencia, entre otros).*

**Palabras Claves:** IHHNV, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, PCR, Diversidad Genética.

### Abstract

*The infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) is associated with growth retardation and deformities in Penaeus (Litopenaeus) vannamei. This work aims to obtain baseline information regarding the prevalence and genetic diversity of IHHNV strains circulating in Ecuador and to compare them with the sequences of virus isolates from other geographic locations. The evolutionary relationships between the samples collected in this study and 24 sequences originating from other shrimp-producing countries were inferred with the discrete maximum likelihood method, using the Kimura model of nucleotide substitution of 2 parameters, as the best fit for molecular evolution. The phylogenetic tree showed different sequence groups; differentiating both, type strains (infectious vs. noninfectious) and geographical origin. Ecuador samples were located in a large group of infectious strains, but presenting a differentiation between strains of Guayas and El Oro, which suggests the presence of genotypes in viral isolates circulating in the country. The results found in this study can generate useful information for management at the shrimp farming level (development of more sensitive diagnostic techniques, correlation studies between genetic diversity and virulence, etc.).*

## 1. Introducción

El virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis virus - IHNV, por sus siglas en inglés) fue inicialmente reportado en camarones juveniles *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris* cultivados en Hawái [1]. En esta especie se ha reportado mortalidades de hasta 90% [2] [3]. IHNV se presenta en forma crónica en *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* y *Penaeus monodon*, sin provocar altas mortalidades (entre 30 y 50%), pero ocasionando la enfermedad conocida como síndrome de deformidad y enanismo (Runt Deformity Syndrome - RDS, por sus siglas en inglés) [4]. Las principales anomalías están caracterizadas por deformidades cuticulares, resultando en ejemplares con antenas rugosas o quebradizas, rostrum desviado y segmentos abdominales deformes [5] [6]. En tanto que, el enanismo provoca una gran dispersión de tallas generando una tasa de conversión alimenticia elevada. Las lesiones provocadas por la enfermedad están caracterizadas por necrosis multifocal en tejidos ectodérmicos (branquias, epidermis cuticular, cordón nervioso) y mesodérmicos (tejido hematopoyético, glándula antenal, gónadas, órgano linfoide, tejido conectivo y músculo), presentando cuerpos de inclusión Cowdry de tipo A [7].

IHNV ha sido últimamente renombrado como densovirus de decápodos *Penaeus stylirostris* 1 (Decapod penstyldensovirus 1 - PstDV1, por sus siglas en inglés) [8]. El virus pertenece a la familia *Parvoviridae*, sub-familia *Densovirinae* y al nuevo género *Penstyldensovirus* [8]. En este artículo se continuará utilizando la nomenclatura tradicional IHNV, considerando que es más reconocida en la literatura científica.

El virus IHNV es un parvovirus de forma icosaédrica sin envoltura y con un diámetro aproximado de 20-22 nm, que contiene ADN de cadena sencilla de aproximadamente 4.1 kb, lo que lo convierte en el más pequeño de los virus de los penaeidos [9]. El genoma del virus ha sido secuenciado de aislados obtenidos *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. monodon* y *P. semisulcatus*, provenientes de China, Vietnam, Taiwán, Egipto, India y Madagascar [10] [11] [12] [13]. El virus es uno de los principales patógenos de importancia comercial en los países productores de camarón y se encuentra ampliamente distribuido en América, Oceanía, Asia y África [14] [15].

El genoma del virus ha sido completamente secuenciado y contiene tres marcos abiertos de lectura (ORF) bien definidos [9]. Tomando como referencia el aislado viral de Hawái (Número de acceso GenBank

AF218266), el ORF1 (2001 pb) está localizado a la izquierda del genoma del virus, entre los nucleótidos 650 y 2650, cubre el 56% del genoma viral y codifica para una proteína no estructural (NS1) de 666 aminoácidos, asociada a la transcripción y replicación viral [13]. El ORF2 u ORF intermedio (1092 pb), empieza 56 nucleótidos antes del inicio del ORF1, localizándose entre los nucleótidos 594 y 1685, y por tanto superponiéndose con el ORF1, codifica para una segunda proteína no estructural (NS2) compuesta de 363 aminoácidos, presumiblemente asociada a la replicación viral. El ORF3 (990 pb) es el más pequeño de los ORF, está localizado a la derecha del genoma y codifica para la proteína estructural de la cápside del virus, que está compuesta de 329 aminoácidos [9] [13].

En Ecuador, IHNV no produce mortalidades; sin embargo, tanto las deformidades como el enanismo generan pérdidas económicas, por lo tanto después de la enfermedad de la mancha blanca, IHNV es el segundo patógeno de importancia comercial en el país. Adicionalmente, dado que los reproductores pueden permanecer como portadores asintomáticos, su control es limitado, por lo que se incrementan las probabilidades de transmisión vertical a los descendientes; eventualmente, la prevalencia en las piscinas podría incrementarse por transmisión horizontal [16].

Se ha encontrado una baja diversidad genética de IHNV en los aislados americanos, pero una alta diversidad en los aislados asiáticos [17] [10]. En general, se conoce que hay 4 genotipos de IHNV: América y del este de Asia, sureste de Asia, Madagascar/India/Isla Mauricio/Australia y, África del Este/Mozambique/Tanzania [18]. Los dos primeros genotipos son infecciosos para *P. vannamei* y *P. monodon*. En tanto que, los dos últimos genotipos (tipos 3A y 3B, respectivamente) son no infecciosos para las especies mencionadas. Además, las secuencias amplificadas de IHNV de los genotipos 3A y 3B se han encontrado insertadas en el genoma de *P. monodon* [19] [20]. A excepción de un aislado de IHNV de origen ecuatoriano (Número de acceso GenBank AY362548) [21], no existe información de otras secuencias de aislados ecuatorianos con los que se pueda inferir aspectos de diversidad genética del virus en Ecuador. Tampoco existe en la literatura información sobre la distribución y prevalencia de IHNV en el país. Un monitoreo al detalle de distribución, prevalencia y diversidad genética podría detectar cambios moleculares del patógeno en ciertas áreas geográficas y con esa información se podría implementar medidas de control tales como, cerco sanitario y estudios más detallados de correlación entre diversidad genética y virulencia.

El presente trabajo tiene como objetivo obtener información de línea base sobre la prevalencia y diversidad genética de las cepas de IHNV que están circulando en el país y compararla con las secuencias de aislados del virus de otras localidades geográficas. La información de diversidad genética y evolución molecular de este virus contribuirá al diseño posterior de monitoreos y de medidas de control efectivas de la enfermedad.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Colección de muestras

Entre julio 2015 y enero 2016 se colectó muestras de camarones juveniles *P. vannamei* de 35 estanques, localizados en 16 localidades de las 5 provincias productoras de camarón de cultivo de Ecuador (Tabla 1). Las muestras fueron preservadas en etanol al 95% y almacenadas hasta su análisis por biología molecular. Adicionalmente, se colectó y preservó camarones con solución Davidson AFA para análisis posterior de histología. El muestreo fue de tipo dirigido, tanto a nivel de estanques (piscinas con problemas de disparidad de tallas), como de individuos (camarones con signos clásicos de infección por IHNV, caracterizados por deformidades y enanismo).

**Tabla 1.** Provincias, sitios de colección y número de estanques muestreados por sitio.

Provincia	Sitios	No. De estanques positivos
Esmeraldas	San José de Chamanga	2
Manabí	Jama	2
	San Vicente	2
	San Agustín	2
Guayas	Naranjal	1
	Isla Josefina	2
	Isla Puna	1
	Puerto Roma	1
	Balao	2
	Sabana Grande	2
	Engunga	2
Tenguel	4	
Santa Elena	Estación Experimental de Cenaim "Palmar"	5
El Oro	Isla Pungalillo	1
	La Primavera	4
	El Coco	2

### 2.2. Extracción de ADN

El ADN fue extraído de cordón nervioso y cerebro usando 500  $\mu$ l de buffer de (NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8.0; 1mM EDTA). La suspensión se incubó con 75 $\mu$ l de SDS y 20  $\mu$ l de proteinasa K (Invitrogen) toda la noche a 65 °C. Posteriormente, se realizaron 2 extracciones seguidas de proteínas con fenol (600  $\mu$ l) y cloroformo isoamil (500  $\mu$ l), respectivamente, centrifugando en cada caso a 13000 RPM por 10 min y recuperando el sobrenadante. El ADN recuperado se precipitó por 4 horas a -20 °C con 1000  $\mu$ l de etanol (100%) y 200  $\mu$ l de acetato de amonio 5 M; luego, el ADN genómico se precipitó con una centrifugación a 13000 RPM por 10 min. El pellet se lavó dos veces con 300  $\mu$ l de etanol al 70 % y se centrifugó a 13000 RPM por 10 min. Finalmente, el pellet se secó a 45 °C durante 2 horas y se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua Milli-Q. En la mayoría de los casos la extracción de ADN se realizó por individuos; en pocos casos, la extracción de ADN se realizó a partir de un pool de individuos. En total se analizó 147 muestras de ADN.

### 2.3. Detección de IHNV por PCR

La detección de IHNV se realizó con un PCR anidado, utilizando iniciadores previamente descritos para IHNV, que amplifican una región conservada en el ORF1 y ORF2 del virus, y que son recomendados por la OIE por su capacidad para detectar los 4 genotipos conocidos de IHNV, incluyendo los genotipos no infecciosos 3A y 3B, insertados en el genoma de camarones peneidos [22].

El primer paso de la amplificación del PCR anidado se realizó con los iniciadores IHNV392F/IHNV392R, diseñados en base a la secuencia del aislado de Hawái (Número de acceso GenBank AF218266) y que genera un amplicón de 392 pb [23] (Tabla 2). El segundo paso de la amplificación de PCR anidado se realizó con los iniciadores NNJ208F/NNJ208R, que genera un amplicón de 208 pb [24] (Tabla 2). Previamente, se comprobó in silico la capacidad de amplificación de estos iniciadores del único aislado de IHNV de Ecuador reportado en la base de datos GenBank (Número de acceso AY362548).

La mezcla de reacción contuvo 1.5  $\mu$ l de buffer PCR (1x), 0.6  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 0.75  $\mu$ l de dNTPs (0.5 mM), 0.45  $\mu$ l de cada uno de los iniciadores (0.3  $\mu$ M), 0.15  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa® (Invitrogen), 9.1  $\mu$ l de agua Milli-Q y 2  $\mu$ l de ADN extraído.

La primera amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C por 1.49 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 30 s y una extensión final a 72°C por 7 min. La segunda amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 52 °C por 30 s y 68 °C por 1 min, y una extensión final de 72 °C por 7

min. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Applied Biosystems).

Las alícuotas de los productos de PCR fueron verificados con electroforesis, en un gel de agarosa del 1.5 % (98V por 40 min) marcado con (10 mM) Syber safe® (Invitrogen). La visualización de los productos de amplificación se realizó en un trans-iluminador con luz ultravioleta.

Uso	Nombre del iniciador	Secuencia	Referencia	Tamaño del amplicón
Diagnóstico: primer paso de PCR anidado	IHHNV392F	5'-GGGCGAACCAGAATCACTTA-3'	[23]	392 pb
	IHHNV392R	5'-ATCCGGAGGAATCTGATGTG-3'		
Diagnóstico: segundo paso de PCR anidado	NNJ208F	5'-AGGGAGCTTTCTGAT TCACT-3'	[24]	208 pb
	NNJ208R	5'- ATCAAGACCCTAAACCCACT -3'		
Secuenciación	PF5	5'-ATCACCAGCGACGACTTCCTAGG-3'	[25]	941 pb
	PR6	5'-GGAAGAAGTCGGCTTGACTCT-3'		

**Tabla 2.** Iniciadores usados para la detección de IHHNV por PCR y secuenciación.

#### 2.4. Determinación de la prevalencia de IHHNV

La prevalencia de IHHNV por provincia fue calculada como el total de estanques que resultaron positivos por PCR con los iniciadores para la detección de IHHNV (IHHNV392F/IHHNV392R y NNJ208F/ NNJ208R) del total de estanques muestreados por provincia. Con este valor se determinó la prevalencia de IHHNV a nivel de país, calculada como el promedio ponderado provincial, donde el peso y valores del promedio ponderado fueron el número de estanques positivos por provincia y la prevalencia a nivel de provincia, respectivamente.

#### 2.5. Análisis de histología

Los tejidos de los camarones positivos a IHHNV con los iniciadores NNJ208F/NJ208R fueron procesados de acuerdo a los procedimientos delineados por Bell & Lightner (1988). Las secciones fueron cortadas a 4 µm y teñidas con hematoxilina y eosina (H & E). Los tejidos fueron examinados para cambios histopatológicos (Figura 2).

#### 2.6. Secuenciación

Solamente las muestras positivas a IHHNV en el paso de detección fueron escogidas para amplificar un fragmento de 941 pb usando los iniciadores PF5/PR6 [25] (Tabla 2). La región amplificada por los iniciadores PF5/PR6 contiene el 95% de la región variable del ORF3 (proteína de la cápside viral) del

genoma de IHHNV. Dado que, los iniciadores PF5/PR6 fueron diseñados en base a la secuencia del aislado de Hawái, se comprobó in silico que estos iniciadores amplificaran la región mencionada en el aislado de IHHNV de Ecuador (Número de acceso GenBank AY362548).

La mezcla de reacción de PCR (15 µl); contuvo 1.5 µl de buffer PCR (1x), 0.6 µl de MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 0.3 µl de dNTPs (0.2 mM), 0.75 µl de cada uno de los iniciadores (0.5 µM), 0.6 µl de Taq DNA polimerasa® (Invitrogen), 6.5 µl de agua Milli-Q y 4 µl de ADN extraído. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Applied Biosystems) y los parámetros de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 10 min. Las alícuotas de los productos de PCR fueron verificados con electroforesis, en un gel de agarosa del 1.5 % (98V por 30 min) suplementados con (10 mM) Syber safe® (Invitrogen). La visualización de los productos amplificados se realizó en un trans-iluminador con luz ultravioleta.

Los productos de PCR fueron purificados con el QIAquick® PCR Purification Kit, siguiendo los pasos indicados por el distribuidor. Para cada producto amplificado se preparó una reacción con el iniciador forward y otra con el reverse. Los productos amplificados con PCR fueron bi-direccionalmente secuenciados por la compañía Macrogen (Corea) usando un ABI 377 Sequencer.

**2.7. Análisis de las secuencias de ADN**

Los cromatogramas forward y reverse de cada muestra fueron ensamblados con el programa CodonCode Aligner (versión 6.0.2), considerando los valores de calidad de las bases, y validados mediante inspección visual. Solamente las secuencias de mejor calidad obtenidas en este estudio fueron usadas para el análisis filogenético. Adicionalmente se descargó, de la base de datos de GenBank (Centro Nacional de Información Biotecnológica - NCBI), 24 secuencias de aislados de IHHNV originarios de otros países productores de camarón, las mismas que incluyen al aislado de referencia de Hawái (AF218266) y el único aislado de Ecuador (AY362548) depositado en GenBank (Tabla 3). Los criterios de selección de las secuencias externas estuvieron basados en tres criterios: (a) amplia cobertura espacial, tratando de incluir secuencias de todas las regiones productoras de camarón de América, Australia, África y Asia, (b) inclusión de secuencias de los cuatro genotipos conocidos de IHHNV, incluyendo secuencias de aislados infecciosos y no infecciosos (genotipos 3A y 3B) y (c) no redundancia de información de diversidad genética, tratando de no incluir muchas secuencias de un mismo linaje o de un mismo genotipo de IHHNV (Tabla 3). Solo la región amplificada para secuenciación fue usada para el análisis filogenético, eliminando el resto del genoma de IHHNV en las 24 secuencias externas. Las secuencias de los aislados ecuatorianos y externos fueron alineadas con el algoritmo de alineamiento de secuencias múltiples Clustal Omega, usando el software en línea de

Instituto Bioinformático Europeo  
 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) [26].

Las relaciones evolutivas para la reconstrucción del árbol filogenético fueron inferidas con el método discreto de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood - ML) [27] usando el modelo de sustitución de nucleótidos de 2 parámetros de Kimura (K2) [28] como mejor ajuste de evolución molecular para las secuencias analizadas (BIC = 2279.94). El soporte para los grupos de secuencias en un mismo nodo del árbol fue determinado con un análisis de remuestreo de bootstrap [29], utilizando 1000 réplicas de árboles estimados con el método de Neighbor-joining, bajo el modelo de máxima verosimilitud (porcentaje de árboles con nodos repetidos de un grupo de 1000 árboles). Las posiciones de codones consideradas en el análisis fueron +1, +2, +3, así como los sitios no codificantes; además se incluyó un filtro fuerte de intercambio de rama. Las posiciones conteniendo vacíos y datos perdidos no fueron usadas para el análisis. Los datos finales tuvieron un tamaño de 208 posiciones. Las longitudes de las ramas horizontales del árbol fueron proporcionales a las tasas de sustitución de nucleótidos. El aislado viral de IHHNV de Madagascar (Número de acceso GenBank DQ228358) fue usado para enraizar el árbol, dada la mayor disimilaridad presentado con las otras cepas infecciosas de IHHNV [30]. Ambas pruebas de mejor modelo de sustitución de nucleótidos y de reconstrucción del árbol filogenético fueron inferidas con el software Evolutionary Genetics Analysis MEGA 7.0.14 [31].

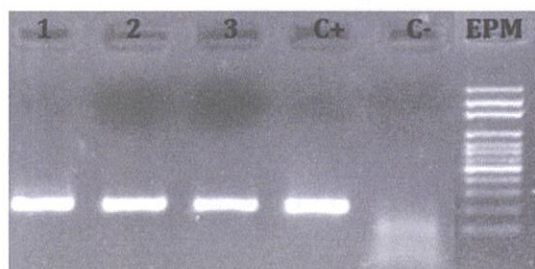
**Tabla 3.** Número de acceso GenBank, especie de camarón hospedera, origen y año de colección de aislados del virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV) usado para el análisis in silico en este estudio.

Numero de Acceso GenBank	Especie	Origen	Año de recolección
KP733862	<i>Penaeus vannamei</i>	China-Wenzhou	2014
JX258653	<i>Penaeus monodon</i>	China-Ganyu	2009
EF633688	----	China-Fujian	----
KP733858	<i>Penaeus monodon</i>	China-Ningbo	2014
KJ862253	<i>Penaeus vannamei</i>	Brazil	2013
JX840067	<i>Penaeus monodon</i>	Viet Nam	2012
KC513422	<i>Penaeus monodon</i>	Viet Nam	2011
JN616415	<i>Penaeus monodon</i>	Viet Nam	2009
JN377975	<i>Penaeus vannamei</i>	Corea del Sur	2010
GU138660	<i>Penaeus monodon</i>	Filipinas	2009
KT316253	<i>Penaeus semisulcatus</i>	Egipto	2014
KT316260	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Egipto-Bardawi	2014
GQ411199	<i>Penaeus monodon</i>	India	2007

AF273215	<i>Penaeus stylirostris</i>	México-Golf de California	1998
AY355306	<i>Penaeus monodon</i>	Taiwán	2004
AY355307	<i>Penaeus monodon</i>	Taiwán	----
AY102034	<i>Penaeus monodon</i>	Tailandia	2000
AF218266	<i>Penaeus stylirostris</i>	Hawái	1987
GQ475529	<i>Penaeus stylirostris</i>	Australia	2009
EU675312	<i>Penaeus monodon</i>	Australia	1993-1997
KM272866	<i>Penaeus monodon</i>	Australia	2008
AY124937	<i>Penaeus monodon</i>	Tanzania	2000
DQ228358	<i>Penaeus monodon</i>	Madagascar	2000
AY362548	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador	2003
IH15014	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador- El Oro	Este estudio
IH15014-1E	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador- El Oro	Este estudio
IH15014-2E	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador- El Oro	Este estudio
IH15069-4	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador- Guayas	Este estudio
IH15069-5	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador- Guayas	Este estudio
IH15070-1	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador -Guayas	Este estudio

### 3. Resultados

De 147 muestras, 102 resultaron positivas a IHHNV utilizando el método de detección por PCR anidado (Figura 1), siendo estas muestras utilizadas para el segundo paso de secuenciación.



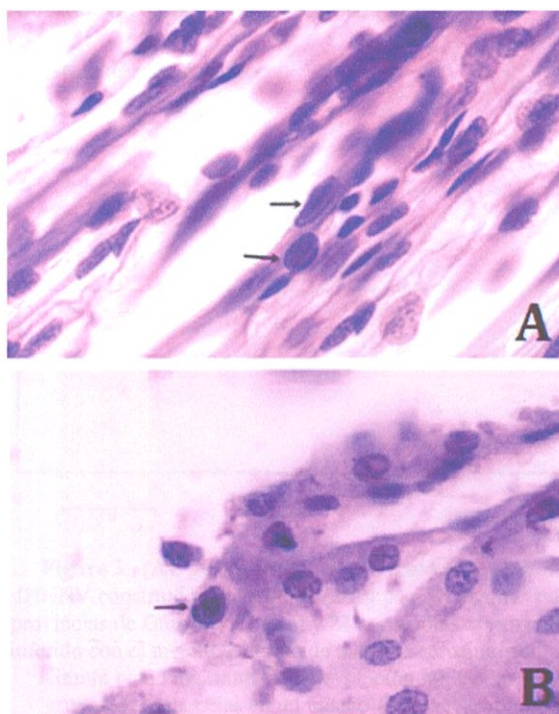
**Figura 1.** Amplificación por PCR del fragmento de 208 pb obtenido con los iniciadores NNJ208F/NNJ208R para la detección de IHHNV. Se observa tres muestras de camarón *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* de este estudio que resultaron positivas a IHHNV (Carriles 1, 2 y 3), C+: control positivo (Donado por el Laboratorio de Patología Acuicola de la Universidad de Arizona), C-: control negativo y EPM: marcador de peso molecular.

Treinta y tres estanques de los 35 muestreados resultaron positivos a IHHNV (Tabla 4). La prevalencia del virus en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Guayas, Santa Elena y El Oro fue del 100, 67, 100, 100 y 86 %, respectivamente (Tabla 4). La prevalencia de IHHNV a nivel de país fue del 92% (Tabla 4).

**Tabla 4.** Número de estanques positivos a IHHNV por localidad muestreada, usando un PCR anidado (primer paso: IHHNV392F/IHHNV392R [23] y segundo paso: NNJ208F/NNJ208R (Macías-Rodríguez et al., 2014).

Provincia	Localidad muestreada	No. De estanques positivos
Esmeraldas	San José de Chamanga	2/2
Manabí	Jama	0/2
	San Vicente	2/2
	San Agustín	2/2
Guayas	Naranjal	1/1
	Isla Josefina	2/2
	Isla Puna	1/1
	Puerto Roma	1/1
	Balao	2/2
	Sabana Grande	2/2
Santa Elena	Engunga	2/2
	Tenguel	4/4
Santa Elena	Estación Experimental de Cenaim "Palmar"	5/5
El Oro	Isla Pungalillo	1/1
	La Primavera	4/4
	El Coco	1/2
<b>Total</b>		<b>33/35</b>

La examinación histológica de los camarones positivos a IHNNV por PCR mostró lesiones características de la enfermedad, con necrosis en grado medio en tejidos ectodérmicos y mesodérmicos y cuerpos de inclusión Cowdry de tipo A. Además se encontró otras afecciones como infiltraciones hemocíticas. La mayoría de las muestras analizadas por histología presentaron lesiones compatibles con IHNNV en grado leve.



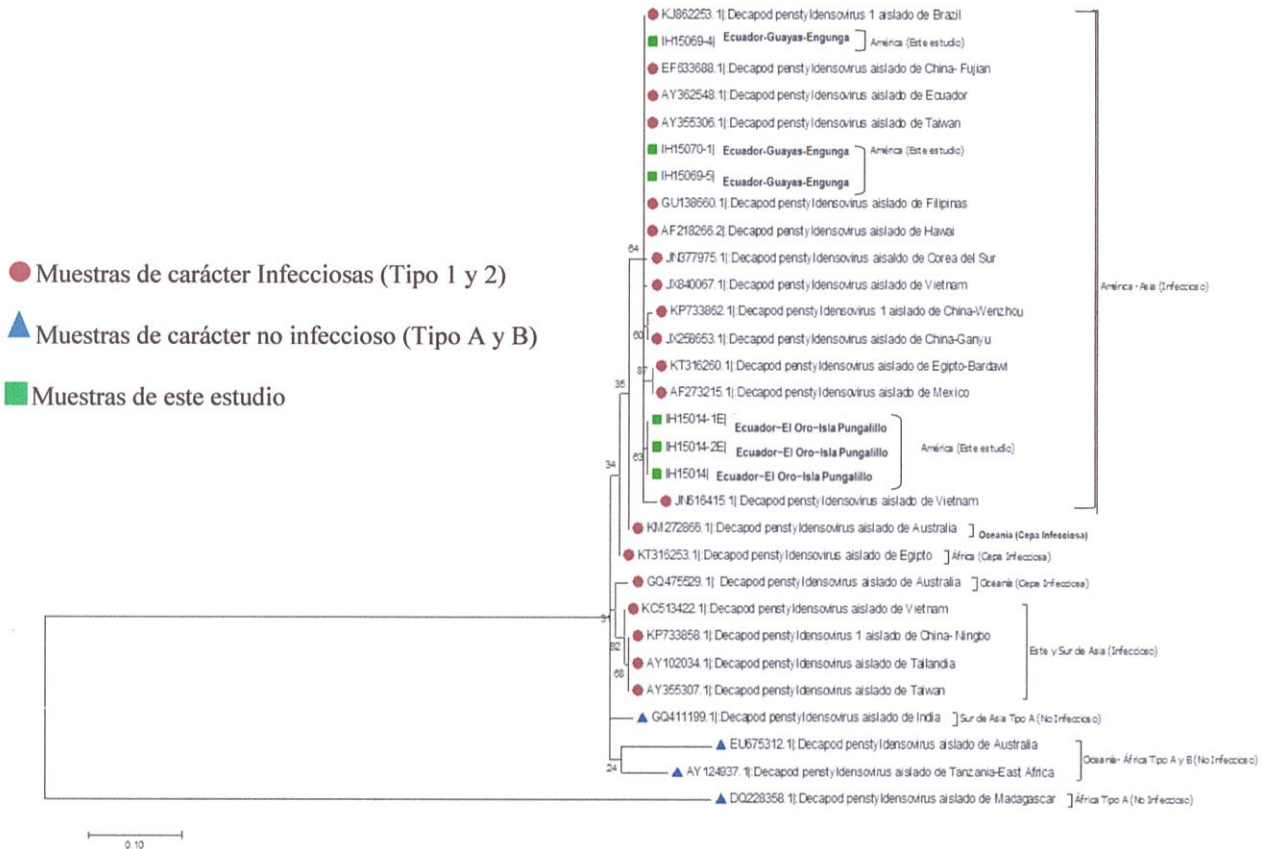
**Figura 2.** Histopatología de camarones juveniles ecuatorianos [*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*] infectados con IHNNV. (A) Tinción de cordón nervioso y (B) glándula antenal. Las flechas indican cuerpos de inclusión Cowdry de tipo A. (H & E. 40x).

La amplificación de ADN usando los iniciadores PF5/PR6 presentó dificultades, principalmente amplificaciones de banda leves. En la etapa de secuenciación se obtuvo una gran cantidad de secuencias de baja calidad (secuencias con valores bajos de calidad de bases). Las secuencias de mejor calidad obtenidas en este estudio y usadas para el análisis filogenético fueron las secuencias originarias de la provincia de Machala, sector Isla Pungalillo: IH15014 (tamaño final de 881 pb), IH15014-1E (tamaño final de 775 pb) y IH15014-2E (tamaño final de 892 pb) y las secuencias originarias de la provincia Guayas sector Engunga: IH15069-4 (tamaño final de

369 pb), IH15069-5 (tamaño final de 626 pb) e IH15070-1 (tamaño final de 709 pb).

Las figuras 3 y 4 muestran el árbol filogenético obtenido en el estudio, presentando una evidente separación de las cepas infecciosas y no infecciosas. En particular, la cepa no infecciosa de Madagascar (DQ228358), usada para enraizar el árbol, se muestra apartada del resto de las cepas de IHNNV. Los aislados no infecciosos de Tanzania (AY124937) y Australia (EU675312) se ubicaron en un solo grupo, permaneciendo cerca del aislado no infeccioso de la India (GQ41199). Estos tres aislados no infecciosos (Tanzania, Australia e India) se presentaron separados de todas las cepas infecciosas de IHNNV. Un primer gran grupo de cepas infecciosas correspondió a muestras de América y Asia (especialmente este de Asia), lo que incluyó muestras infecciosas de Australia (KM272866) y de Egipto (KT316253 y KT316260). En este grupo se encontró inscritas las muestras de este estudio. Mientras que, un segundo gran grupo de muestras infecciosas de IHNNV estuvo conformado por muestras del este y del sur de Asia. Las muestras del Ecuador se ubicaron en el primer gran grupo de cepas infecciosas de IHNNV, pero presentando una diferenciación entre las cepas del Guayas y las de El Oro, señalando la posibilidad de diferencias geográficas en los aislados colectados en este estudio, y por tanto sugiriendo la presencia de genotipos en los aislados virales circulantes en el país. Además, las cepas aisladas en este estudio se ubicaron cerca del único aislado de IHNNV reportado para Ecuador en la base de datos GenBank (AY362548), indicando que los resultados en este estudio son consistentes. Todas las muestras de América (Brasil, Ecuador, México y las secuencias de este estudio) se ubicaron en el primer gran grupo de muestras infecciosas, que además contuvo al aislado viral de Filipinas (GU138660).





**Figure 3.** (A). Árbol filogenético basado en la región variable del ORF3 (proteína de la cápside viral) del genoma de IHNV construido con MEGA 7.0.14 para estimar las relaciones evolutivas de las muestras de este estudio (aislados de las provincias de Guayas y El Oro) y 24 secuencias originarias de otros países productores de camarón. El árbol filogenético fue inferido con el método discreto de máxima verosimilitud, usando el modelo de sustitución de nucleótidos de 2 parámetros de Kimura como mejor ajuste de evolución molecular para las secuencias analizadas (BIC = 2279.94). El soporte para los grupos de secuencias en un mismo nodo del árbol fue determinado con un análisis de re-muestreo de bootstrap (1000 réplicas). El aislado viral de IHNV de Madagascar (Número de acceso GenBank DQ228358) fue usado para enraizar el árbol. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama horizontales proporcionales a las tasas de sustitución de nucleótidos. Se muestran los valores de soporte de bootstrap para los nodos del árbol.

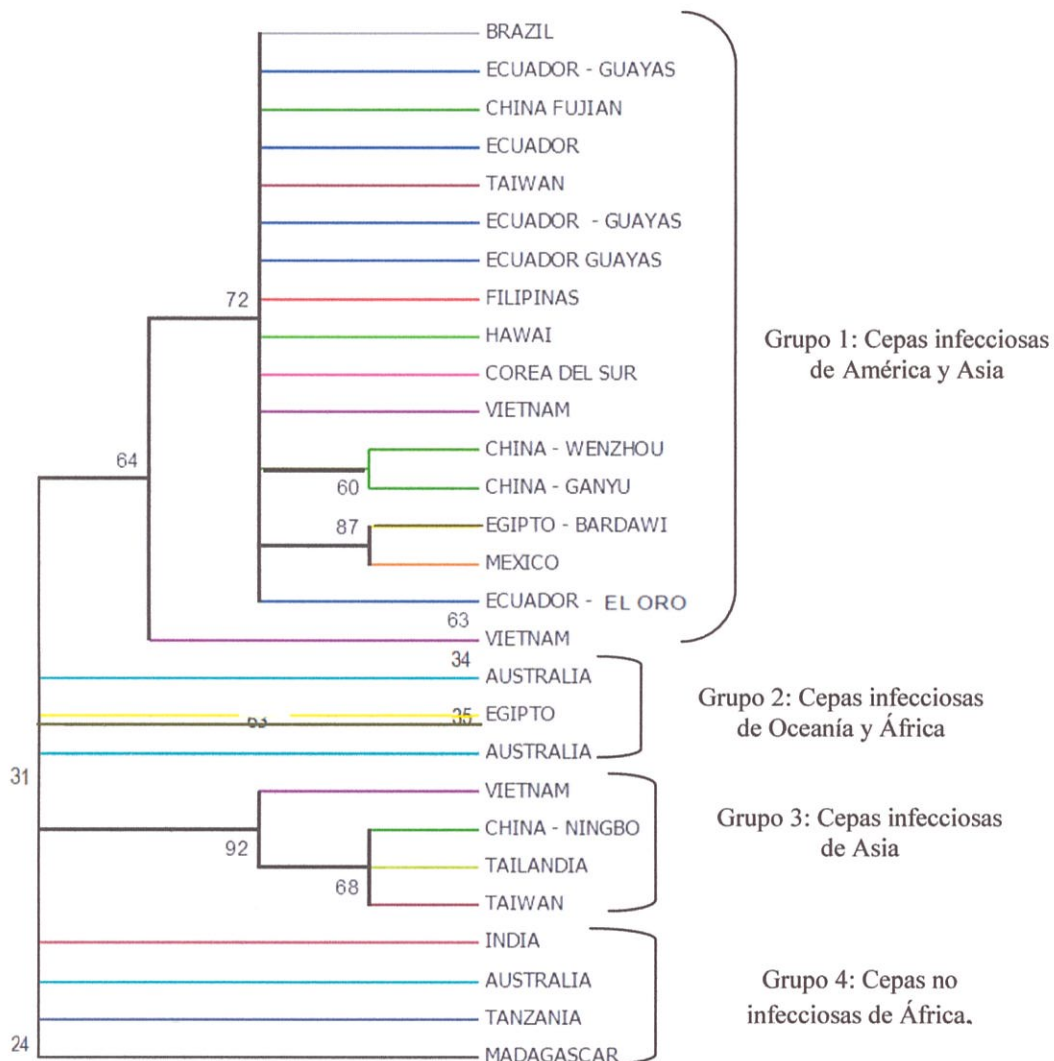


Figure 3. (B) Árbol topológico del árbol mostrado en la figura 3. Se muestran los países por colores.

## 4. Discusión

La alta prevalencia de IHNV encontrado a nivel del país (92%), llegando a ser igual al 100% en 3 de 5 provincias muestreadas, indica que el virus es endémico en Ecuador, y que está completamente extendido en el país. La gran dispersión geográfica del virus en el país podría ser explicada en gran parte porque el control de la enfermedad es limitado, ya que los reproductores pueden portar el virus sin presentar los síntomas y transmitir verticalmente a su descendencia [16]. De hecho, la prevalencia viral en reproductores del Ecuador es del 53%; mientras que, en camarones adultos del medio silvestre colectados a lo largo de la costa ecuatoriana es del 58% [16]. A través del análisis histológico, en este estudio confirmamos además que el grado de afectación fue en general leve. Estos resultados explicarían que siendo *P. vannamei* una especie resistente, en la cual IHNV se presenta en forma crónica, sin desatar altas mortalidades, el control se limitaría porque el productor no observa muertes masivas en las piscinas. De hecho, durante el monitoreo realizado en este estudio, algunas de las muestras colectadas no provino de un muestreo direccionado, al dificultarse encontrar camarones con los signos clásicos de la enfermedad (deformidades y enanismo). En consecuencia, la prevalencia en etapa de engorde se incrementaría por efecto de la transmisión horizontal, hasta llegar a alcanzar niveles de alta prevalencia, tales como las observadas en el presente estudio. Según nuestro conocimiento, este es el primer reporte de prevalencia de IHNV en Ecuador realizado en larvas y juveniles de *P. vannamei*.

La evidencia genética sugiere que la epidemia en las Américas probablemente fue introducida desde Filipinas por una importación viva de la especie *P. monodon*, promoviendo la aparición de la enfermedad en una amplia gama de huéspedes, facilitando las oportunidades para la patogenidad y una distribución geográfica muy extendida [17] [10] [32] [19]. Después de su detección inicial en Hawái, IHNV se encontró ampliamente distribuido tanto en camarones *P. stylirostris* como en *P. vannamei* en todas las regiones de cultivo de las Américas y en la población de camarón silvestre del Golfo de California, donde algunos informes sugieren que puede haber contribuido al colapso de la pesquería de captura [33]. Estas observaciones se confirman en nuestro análisis de árbol filogenético, donde todas las muestras de América (Brasil, Ecuador, México y las secuencias de este estudio) se ubicaron en el primer gran grupo de muestras, que además contuvo al aislado viral de Filipinas y el de Hawái (AF218266), este último usado como referencia al ser uno de los primeros aislados en

ser secuenciados. Este primer gran grupo de muestras se caracteriza en primer lugar por contener aislados de tipo infeccioso, y donde además se encuentran los aislados de China, Taiwán, Corea del Sur, Vietnam y Egipto, tal como ha sido reportado por otros autores [34] [35] [25]. En segundo lugar, este primer grupo de aislados se caracteriza por presentar un patrón geográfico definido, reuniendo muestras provenientes de América y el este de Asia [18]. Todos los aislados de este estudio se ubicaron en este primer gran grupo de muestras infecciosas, lo que soporta los resultados encontrados en este estudio de alta prevalencia de IHNV en el país, cuyos altos valores llegan a ocurrir por efecto de alta transmisión vertical y horizontal originado del poco control que los productores pueden desplegar dado el comportamiento asintomático a nivel de maduración y engorde.

Tal como se encontró en otros estudios, la cepa no infecciosa de Madagascar se ubicó apartada del resto de las cepas de IHNV; además, los aislados no infecciosos de Tanzania y Australia se ubicaron en un solo grupo, permaneciendo cerca del aislado no infeccioso de la India. Estos tres aislados no infecciosos (Tanzania, Australia e India) también se presentaron separados de todas las cepas infecciosas de IHNV, tal como ha sido reportado en otros estudios [20] [10] [30] [36] [34] [37] [38] [25] [39].

En forma interesante, las muestras del Ecuador se ubicaron en el primer gran grupo de cepas infecciosas de IHNV, pero presentando una evidente diferenciación entre las cepas del Guayas y las de El Oro. Esto indicaría la presencia de genotipos en los aislados virales circulantes en el país. Es por tanto necesario, que se realicen estudios más detallados de correlación entre diversidad genética y virulencia, los mismos que pueden ser abordados a través de pruebas de desafío viral, usando como papilla viral los tejidos congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , colectados en este estudio y almacenados en las instalaciones del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL).

Los resultados encontrados en el presente análisis filogenético, son consistentes con los cuatro genotipos documentados de IHNV: América/Este de Asia (principalmente Filipinas); Sureste de Asia; Madagascar/India/Isla Mauricio/Australia y, África del Este/Mozambique/Tanzania [40] [41] [18]. Los dos primeros genotipos siendo infecciosos para *P. vannamei* y *P. monodon*. En tanto que, los dos últimos genotipos (tipos 3A y 3B, respectivamente) siendo no infecciosos para las especies mencionadas [10] [32] [42]. Cabe destacar que, las secuencias amplificadas de IHNV de los genotipos 3A y 3B se han encontrado insertadas en el genoma de *P. monodon* [19] [20]. Las cepas aisladas en este estudio se

ubicaron cerca del único aislado de IHNV reportado para Ecuador en la base de datos GenBank (AY362548), confirmando los resultados encontrados en nuestro trabajo. Adicionalmente, es importante destacar que, se probaron otros métodos de construcción de árboles filogenéticos (datos no mostrados), obteniendo topologías similares al presentado en este artículo, mostrando la robustez de los resultados encontrados en el estudio.

La literatura reporta que existen múltiples variantes geográficas de IHNV, algunas de las cuales no son detectadas por todos los métodos disponibles para IHNV. Dos conjuntos de iniciadores, 392F/392R y 389F/389R, son los más adecuados para la detección de todas las variantes conocidas [17] [43] [10] [32], incluyendo tipos 3A y 4B, que se insertan en el genoma de ciertas poblaciones de *P. monodon* desde el oeste del Indo-Pacífico, África Oriental, Australia y la India [32] [19] [44]. Este último hecho dificulta la detección de IHNV. En nuestro estudio, realizamos PCR de diagnóstico a partir de los iniciadores IHNV392F/R y NNJ208F/R en donde obtuvimos 102 resultados positivos de IHNV; sin embargo, al realizar el proceso de secuenciación se presentaron inconvenientes con la especificidad de los iniciadores PF5/PR6, que estuvieron diseñados en base al aislado de Hawái (AF218266) y probados *in silico* con la secuencia de Ecuador (AY362548) anteriormente reportada en GenBank. Posiblemente, la causa de la dificultad encontrada en la amplificación de los iniciadores con las muestras ecuatorianas se deba a que los aislados de Ecuador tienen una mayor variabilidad genética que la esperada. Por lo tanto es necesario, realizar un segundo estudio donde a partir de las secuencias obtenidas con los aislados ecuatorianos se diseñen iniciadores más específicos y se corran las muestras colectadas en este estudio. Adicionalmente, se podría correr los iniciadores específicos para diferenciar las cepas infecciosas de las no infecciosas. Esto permitirá contar con secuencias más cercanas a la realidad, las mismas que posteriormente pueden ser usadas para técnicas de diagnóstico más sensibles para el control de la enfermedad en el país.

Tang y Lightner en el 2002 reportaron una baja variación genética del virus entre aislados de América y Hawái. Estudios moleculares posteriores mostraron una considerable variación del virus entre aislados de Asia y una pequeña variación entre los aislados de América [10], lo que ha sido atribuido al desarrollo de una relación huésped-patógeno más equilibrado. Un análisis con muestras de camarón *P. vannamei* colectadas en el Golfo de California, determinaron una tasa media de sustitución de nucleótidos para IHNV inesperadamente alta (1,39 x 10-4

sustituciones/sitio/año) [2]. Nuestros resultados confirman estas observaciones, ya que el árbol filogenético inferido muestra los aislados de América en un mismo grupo, mientras que los aislados de Asia se encuentran más dispersos. A pesar de esto también encontramos la presencia de dos genotipos en las muestras circulantes ecuatorianas, similar a lo encontrado por Robles en el 2010.

El árbol filogenético mostro 4 grupos diferenciados: Un grupo grande infeccioso de América y Asia, en donde se encontraron los aislados de Ecuador, un grupo pequeño de cepas infecciosas de Australia y Egipto, un grupo de cepas infecciosas de Asia y un grupo final de cepas no infecciosas de África (Tanzania, Madagascar), India y Australia. Los aislados de Ecuador presentados en este estudio, muestran indicios de una alta variabilidad genética entre ellos, aunque todas las muestras (Guayas y El Oro) están dentro del grupo infeccioso. Las muestras de El Oro–Isla Pungalillo se ubicaron en un mismo grupo, cercanas a las cepas de Vietnam y México. En tanto que, las muestras del Guayas se agruparon distantes a las de El Oro y muy cercanas a los aislados de Taiwán, Filipinas, China y Hawái y al aislado de Ecuador previamente reportado en GenBank. La posibilidad de ocurrencia de un brote epidémico provocado por aparición de genotipos virulentos no pueden ser excluidos, por lo tanto, los monitoreos, tales como los realizados en este estudio, son necesarios para conocer los genotipos circulantes y estudiar su asociación con virulencia diferencial. Un análisis más profundo de las muestras encontradas en este estudio permitirá dilucidar aspectos que pueden ser importantes para manejo a nivel de camaronerías (por ejemplo desarrollo de técnicas de diagnóstico más sensible). Esto será importante para prevenir futuros brotes en los cultivos de producción camaronesa del país.

### 5. Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador (SENESCYT), a través del proyecto Desarrollo e implementación de métodos de control y prevención de enfermedades en especies acuáticas de uso comercial y uso potencial en maricultura o repoblación PIC-14-CENAIM-003.

### 6. Referencias

- [1] Lightner, D. V., Redman, R. M., & Bell, T. A. (1983). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 42(1), 62-70.

- [2] Robles-Sikisaka, R., Bohonak, A. J., McClenaghan Jr, L. R., & Dhar, A. K. (2010). Genetic signature of rapid IHHNV (Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus) expansion in wild *Penaeus* shrimp populations. *PLoS One*, 5(7), e11799.
- [3] Lightner, D. V., Redman, R. M., Bell, T. A., & Brock, J. A. (1983). Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *Journal of the World Mariculture Society*, 14(1- 4), 212-225.
- [4] Cuéllar, Pantoja, Lightner, Lemos Pereira, Mendes, Vasconcelos, Arns Da Silva, Poletto, Morales-Covarrubias, Gómez Gil R, Barracco Luciane, Perazzolo, Da Rosa, De Blas Giral, Del Campo, Morales Q, Lara, & García Suárez (2014). Guía técnica-Patología e inmunología de camarones peneidos. - 2da edición.
- [5] Kalagayan, H., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweeney, J., Wyban, J., & Brock, J. (1991). IHHN Virus as an Etiological Factor in Runt-Deformity Syndrome (RDS) of Juvenile *Penaeus vannamei* Cultured in Hawaii. *Journal of the World Aquaculture society*, 22(4), 235-243.
- [6] Primavera, J. H., & Qunitio, E. T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Crustacean Biology*, 20(4), 796-802.
- [7] Lightner, D. V., Redman, R. M., Moore, D. W., & Park, M. A. (1993). Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 116(1), 15-23.
- [8] Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J. A., Mukha, D. V., Pintel, D. J., Qiu, J., & Davison, A. J. (2014). The family parvoviridae. *Archives of virology*, 159(5), 1239-1247.
- [9] Bonami, J. R., Trumper, B., Mari, J., Brehelin, M., & Lightner, D. V. (1990). Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *Journal of general virology*, 71(11), 2657-2664.
- [10] Tang, K. F., Poulos, B. T., Wang, J., Redman, R. M., Shih, H. H., & Lightner, D. V. (2003). Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Diseases of aquatic organisms*, 53(2), 91-99.
- [11] Wu, H., Xu, L. M., & Yang, F. (2008). Genome cloning of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolated from Fujian, China. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 27(2), 147.
- [12] Hung, P.V., An, P.D.T. and Van, P, H. (2009). Sequencing the genomic of infectious hypodermatic and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolated from Viet Nam. *Journal Y Hoc Thanh Pho Ho Chi Minh (Supp. 2)*, 129-137.
- [13] Rai, P., Safeena, M. P., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2011). Complete nucleic acid sequence of *Penaeus stylirostris* densovirus (PstDENV) from India. *Virus research*, 158(1), 37-45.
- [14] Lightner, D. V. (1996). Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 15(2), 579-601.
- [15] Flegel, T. W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 433-442..
- [16] Motte, E., Yugcha, E., Luzardo, J., Castro, F., Leclercq, G., Rodríguez, J., ... & Montalvo, K. (2003). Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 219(1), 57-70.
- [17] Tang, K. F., & Lightner, D. V. (2002). Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Diseases of aquatic organisms*, 49(2), 93-97.
- [18] Rai, P., Safeena, M. P., Krabsetsve, K., La Fauce, K., Owens, L., & Karunasagar, I. (2012). Genomics, Molecular Epidemiology and Diagnostics of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Indian Journal of Virology*, 23(2), 203-214.
- [19] Tang, K. F., & Lightner, D. V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus research*, 118(1), 185-191.
- [20] Rai, P., Pradeep, B., Safeena, M. P., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2009). Simultaneous presence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and Type A virus-related sequence in *Penaeus monodon* from India. *Aquaculture*, 295(3), 168-174.
- [21] Hsia, H. L., Chen, L. L., Peng, S. E., Yu, H. T., Lo, C. F., & Kou, G. H. (2003). Comparison of genomic sequence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) between Taiwan and other geographical isolates. *Fish Pathology* 8(4), 177-179.
- [22] World organization for animal health OIE. (2008). *Aquatic Animal Health Code*. Eleventh Edition, 12-75017. WWW: <http://www.oie.int>.
- [23] Tang, K. F., Durand, S. V., White, B. L., Redman, R. M., Pantoja, C. R., & Lightner, D. V. (2000). Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious

hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, 190(3), 203-210.

[24] Macías-Rodríguez, N. A., Mañón-Ríos, N., Romero-Romero, J. L., Camacho-Beltrán, E., Magallanes-Tapia, M. A., Leyva-López, N. E., ... & Méndez-Lozano, J. (2014). Prevalence of viral pathogens WSSV and IHNV in wild organisms at the Pacific Coast of Mexico. *Journal of invertebrate pathology*, 116, 8-12.

[25] Silva, D. C., Nunes, A. R., Teixeira, D. I., Lima, J. P. M., & Lanza, D. C. (2014). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus from Brazil: Sequencing, comparative analysis and PCR detection. *Virus research*, 189, 136-146.

[26] Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. Multiple sequence alignment methods, 105-116.

[27] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.

[28] Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.

[29] Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.

[30] Zhang, C., Yuan, J. F., & Shi, Z. L. (2007). Molecular epidemiological investigation of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and taura syndrome virus in *Penaeus vannamei* cultured in China. *Virologica Sinica*, 22(5), 380-388.

[31] Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, msw054.

[32] Krabetsve, K., Cullen, B. R., & Owens, L. (2004). Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Diseases of aquatic organisms*, 61, 153-158.

[33] Pantoja, C. R., Lightner, D. V., & Holtschmit, K. H. (1999). Prevalence and geographic distribution of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in wild blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the Gulf of California, Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11(1), 23-34.

[34] Kim, J. H., Choresca, C. H., Shin, S. P., Han, J. E., Jun, J. W., Han, S. Y., & Park, S. C. (2011). Detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in *Litopenaeus vannamei*

shrimp cultured in South Korea. *Aquaculture*, 313(1), 161-164.

[35] Lightner, D. V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *Journal of invertebrate pathology*, 106(1), 110-130.

[36] Saksmerprome, V., Puiprom, O., Noonin, C., & Flegel, T. W. (2010). Detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHNV) in farmed Australian *Penaeus monodon* by PCR analysis and DNA sequencing. *Aquaculture*, 298(3), 190-193.

[37] Kim, J. H., Kim, H. K., Nguyen, V. G., Park, B. K., Choresca, C. H., Shin, S. P., ... & Park, S. C. (2012). Genomic sequence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) KLV-2010-01 originating from the first Korean outbreak in cultured *Litopenaeus vannamei*. *Archives of virology*, 157(2), 369-373.

[38] Nita, M. H., Kua, B. C., Bhasu, S., & Othman, R. Y. (2012). Detection and genetic profiling of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHNV) infections in wild berried freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* collected for hatchery production. *Molecular biology reports*, 39(4), 3785-3790.

[39] Fajardo, C., Rodulfo, H., Rodriguez, M., Puig, J., & De Donato, M. (2015). Molecular characterization of strains of decapod penstydensovirus 1 (PstDV1) isolated in farmed *Litopenaeus vannamei* from Venezuela. *Aquaculture*, 436, 34-39.

[40] World organization for animal health OIE. (2009). *Aquatic Animal Health Code*. Eleventh Edition, 12-75017. [www: http://www.oie.int](http://www.oie.int).

[41] Walker, P. J., & Winton, J. R. (2010). Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Veterinary research*, 41(6), 51.

[42] Saksmerprome, V., Jitrakorn, S., Chayaburakul, K., Laiphrom, S., Boonsua, K., & Flegel, T. W. (2011). Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus research*, 160(1), 180-190.

[43] World Organization for Animal Health OIE. (2003). *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Fourth Edition, 12-75017. <http://www.oie.int>.

[44] Tang, K. F., Navarro, S. A., & Lightner, D. V. (2007). PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Diseases of aquatic organisms*, 74(2), 165.