



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE IHNV EN POST – LARVAS DE
Penaeus vannamei BAJO DOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN CON
ESTATUS IDENTIFICADO DE SUS PROGENITORAS”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de

INGENIERO EN ACUICULTURA

Presentado por:

RICARDO ALFONSO MARCILLO DEL CASTILLO

GUAYAQUIL – ECUADOR

2.010

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme dado la bendición de vivir y la fortaleza para retomar mis estudios.

A mis padres, que desde donde quieran que estén siempre me estuvieron cuidando, guiando e iluminando.

A mis hermanas, Geoconda e Ismenia; mi hermano Roberto, a mis tíos Piedad y Eduardo sobre todo a mi tía Ali, quien fue un apoyo moral, económico y espiritual, Dios le pague tía por todo.

A mis primos, Richard, Gaby, David, Liz, Chris, Vane y Pat, que son como mis hermanos y a los cuales quiero mucho.

A mis profesores y amigos, Jerry Landivar, MSc., Ecuador Marcillo, Ing., Marcos Álvarez, Blgo., Javier Robalino., PhD., y Marcelo Muñoz., PhD. por la dirección de la presente investigación.

A Walter Intriago, Ac., quien como Gerente General de BIOGEMAR S. A. fue quien financio la presente investigación en su totalidad.

A mis amigos de antaño y a los actuales, en especial a Jonathan Castro y Mariuxi Miraba quienes sin ningún interés me ofrecieron su amistad y apoyo.

A todos aquellos trabajadores anónimos quienes con su ayuda fue posible la realización de esta investigación.

Finalmente a todos aquellos que no creyeron en mi y lograron llenarme de amor propio para poder finalizar mi carrera.

DEDICATORIA

A mi papi Luis Gerardo †1.986

A mi mami María Elsa †1.992

A mi Gabby y mi Ale

TRIBUNAL DE GRADUACION

M.Sc. Jerry Landivar

PRESIDENTE

Ph.D. Marcelo Muñoz

DIRECTOR DE TESIS

Ing. Ecuador Marcillo

VOCAL PRINCIPAL

M.Sc. Fabricio Marcillo

VOCAL PRINCIPAL

DECLARACION EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral".

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Ricardo Alfonso Marcillo Del Castillo

RESUMEN

El Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) es un virus cuya infección causa altas mortalidades en *Litopenaeus stylirostris* y el síndrome de la deformidad del rostro (RDS) en *Penaeus vannamei*. Causando pérdidas económicas significativas al sector acuícola.

El objetivo de este trabajo fue identificar una relación directa entre la prevalencia de IHHNV en reproductores hembras cultivados en Chongon y su progenie a nivel de post - larvas 14. Las cuales fueron cultivadas en dos sistemas de producción ubicados en las costas de Mar Bravo y San Pablo, Ecuador.

Se analizaron dos lotes con una diferencia de producción de 60 días en promedio, totalizando: 72 reproductoras y 200 post - larvas. La prevalencia de IHHNV fue evaluada, mediante el sistema simple de detección PCR.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con un coeficiente de correlación $r = 0.99592$, entre la prevalencia de su progenitora con respecto a su progenie, lo que sugeriría una probable transmisión vertical. Sin embargo, mas estudios se requieren para determinar cuál es el aporte de sus progenitores hacia su progenie.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	VII
ÍNDICE GENERAL.....	VIII
ABREVIATURAS.....	XII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XIV
ÍNDICE DE FOTOS.....	XV
ÍNDICE DE TABLAS.....	XVII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1.....	5
1. ANTECEDENTES.....	5
1.1 ESTADO ACTUAL DE LA CAMARICULTURA EN EL ECUADOR.....	5
1.2 PRINCIPALES PATÓGENOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE CAMARÓN EN EL ECUADOR.....	14
1.3 IHNV (VIRUS DE LA NECROSIS HIPODÉRMICA Y HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA).....	16

1.3.1 Etiología.....	16
1.3.2 Epidemiología.....	17
1.3.3 Signos clínicos, tejidos y estadios afectados.....	19
1.4 MÉTODOS DE DIAGNOSTICO.....	21
CAPÍTULO 2.....	23
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	23
2.1.1 Obtención de reproductores.....	23
2.1.1.1 Trazabilidad Lote B-21.....	23
2.1.1.2 Trazabilidad Lote LGP-6.....	25
2.1.1.3 Pesca de hembras grávidas.....	26
2.1.2 Obtención de post-larvas.....	28
2.2 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS MUESTRAS.....	29
2.3 PROTOCÓLO DE EXTRACCIÓN DE ADN.....	31
2.4 SISTEMA DE DETECCIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	32
2.4.1 Iniciadores.....	33

	X
2.4.2 Mezcla de Reacción.....	33
2.4.3 Programa del termociclador.....	34
2.5 ELECTROFORESIS.....	35
CAPÍTULO 3.....	36
3. RESULTADOS.....	36
3.1 PREVALENCIA EN PROGENITORAS.....	37
3.1.1 Bioensayo 1.....	37
3.1.2 Bioensayo 2.....	40
3.2 PREVALENCIA EN POST-LARVAS 14.....	42
3.2.1 Bioensayo 1.....	42
3.2.2 Bioensayo 2.....	45
3.3 ANALISIS ESTADISTICO.....	48
CAPÍTULO 4.....	51
4. DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	54
RECOMENDACIONES.....	55

ANEXOS..... 56

BIBLIOGRAFÍA..... 62

ABREVIATURAS

WSSV	Síndrome Viral de la Mancha Blanca	nm	Nanómetro
		CsCl	Cloruro de Cesio
IHHNV	Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa	KD	Kilo Dalton
		MPM	Marcador de Peso Molecular
RDS	Síndrome del Enanismo y Rostrum Deforme	C+	Control Positivo
		C-	Control Negativo
		PI	Post - larva
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa	LGP6	Línea Genética Peninsular 6
CAN	Cámara Nacional de Acuicultura	B21	Biogemar 21
TSV	Síndrome de Taura	bp	Pares de bases
AND	Acido Desoxirribonucleico		
Kb	Kilo pares de bases		

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Viriones de IHHNV purificados a partir de tejidos de <i>P. vannamei</i> (Bonami <i>et al.</i> , 1.990 [18]).....	16
Figura 2. Branquia de juvenil <i>P. vannamei</i> mostrando inclusión intracelular Cowdry type A. (H&E 1800X) Fuente: D. V. Lightner, 1996 (Handbook of Shrimp Pathology).....	20

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Exportaciones ecuatorianas de camarón en millones de dólares, periodo 1.994 – 2.009.....	11
Gráfico 2. Exportaciones ecuatorianas de camarón en millones de libras, periodo 1.994 – 2.009.....	12
Gráfico 3. Prevalencia de IHHNV en porcentaje por lote; Bioensayo 1.	48
Gráfico 4. Prevalencia de IHHNV en porcentaje por lote; Bioensayo 2.	49
Gráfico 5. Prueba T, Muestras Pareadas de Variables Dependientes...	50
Gráfico 6. Correlación Prevalencia Progenitora vs. Prevalencia Progenie para IHHNV.....	50

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1. Reproductor macho <i>P. vannamei</i> , que muestra deformidad en el rostrum y resulta ser positivo para IHNV al cabo del análisis.....	18
Foto 2. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHNV Lote B-21, Reproductores B1.....	38
Foto 3. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHNV Lote LGP-6, Reproductores B1.....	39
Foto 4. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHNV Lote B-21, Reproductores B2.....	40
Foto 5. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHNV Lote LGP-6, Reproductores B2.....	41
Foto 6. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHNV Lote B-21, Post - larva 14 B1.....	43
Foto 7. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHNV Lote LGP-6, Post - larva 14 B1.....	44
Foto 8. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHNV Lote B-21, Post - larva 14, B2.....	46
Foto 9. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHNV lote LGP-6, Post - larva 14, B2.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Impacto específico de la Mancha Blanca en las Exportaciones de Camarón del Ecuador, periodo 1.998 - 2.000 (en miles de libras).....	8
Tabla II. Impacto específico de la Mancha Blanca en las Exportaciones de Camarón del Ecuador, periodo 1.998 2.000 (en miles de dólares).....	8
Tabla III. Distribución de los laboratorios de larvas por provincias en el Ecuador.....	13
Tabla IV. Distribución de los laboratorios de larvas operativos por provincias en el Ecuador.....	13
Tabla V. Trazabilidad lote B-21.....	25
Tabla VI. Trazabilidad lote LGP-6.....	26
Tabla VII. Bioensayo 1: tanque y días de producción, número de hembras y número de tanque de desove por lote.....	27
Tabla VIII. Bioensayo 2: tanque y días de producción, número de hembras y número de tanque de desove por lote.....	28
Tabla IX. Bioensayo 1: Datos de desove y eclosión por lote.....	28
Tabla X. Bioensayo 2: Datos de desove y eclosión por lote.....	29
Tabla XI. Mezcla de Reacción.....	33
Tabla XII. Programa Termociclador.....	34

INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón blanco *Penaeus vannamei* tuvo sus inicios en la década de los años 1.970. Este sector productivo ha tenido que soportar la aparición de diversos agentes patógenos y los virus han sido los causantes de las más devastadoras pandemias a nivel mundial [1].

El sector camaronero se inclinó por programas de “mejoramiento genético” debido a los bajos rendimientos en producción que se dieron desde la aparición del Síndrome Viral de la Mancha Blanca, WSSV (por sus siglas en inglés). La crisis que vivió el sector durante este período los obligo a realizar cambios en los sistemas de producción; menor recambio, bajas densidades de siembra al momento de las transferencias y la domesticación de la especie para evitar el uso de larva silvestre y mejorar la especie genéticamente [2]. Actualmente las maduraciones están trabajando con

líneas de especies domesticadas llevando programas de selección masal de animales de piscinas de engorde Fase A y transferidos a piscinas de levantamiento de reproductores Fase B donde las densidades en las que se los mantienen son menores.

Con una selección masal y entremezclando diferentes familias, se logra obtener progenies con mayor rendimiento en crecimiento y cierta resistencia a enfermedades [3]. Existe la posibilidad cuando se utilizan sistemas de selección masal (utilizando animales de mayor crecimiento en piscinas comerciales) en *P. vannamei* es la pérdida de información genética. Este hecho se encuentra relacionado con el probable cruce que podría existir entre individuos emparentados, denominado como consanguinidad o endogamia. Esto podría producir que aparezcan caracteres letales los cuales se verán reflejados en niveles bajos de producción [4 y 5].

Sin embargo, la utilización de selección masal, como protocolo de producción de reproductores no debe prolongarse por mucho tiempo ya que la presión del sistema se vuelve insostenible y podríamos encontrar los problemas anteriormente expuestos [4].

Una vez superados los problemas ocasionados por las pandemias virales los esfuerzos de la industria camaronera para evitar otro embate viral están encaminados en la generación de líneas o familias de cierto valor agregado sanitario. Esta problemática los ha llevado a la generación de líneas libres de

patógenos potencialmente peligrosos, para evitar que pongan en riesgo sus producciones. De esta manera, podemos indicar que las piscinas dedicadas a la cría y engorde de este crustáceo han presentando problemas en lo referente a crecimiento y rendimiento, los mismos que han sido relacionados con el Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa, IHNV (por sus siglas en inglés).

Las infecciones por IHNV son más graves en *Litopenaeus stylirostris* donde el virus puede ocasionar mortalidades superiores al 90% [6]. En el cultivo de *P. vannamei*, la infección se encuentra marcada por animales que presentan el Síndrome del Enanismo y Rostrum Deforme, RDS (por sus siglas en inglés); cuyas características son:

1. Deformidades cuticulares (principalmente antenas rugosas o rotas, rostrum, y segmentos abdominales).
2. Bajo crecimiento, incrementando la tasa de conversión alimenticia, generando disparidad de tallas al momento de la cosecha; y finalmente esto se verá reflejado en una reducción de los márgenes de utilidad esperados por piscina [7].

El presente estudio tiene por objetivo determinar el efecto de la prevalencia del virus IHNV de las progenitoras sobre la prevalencia en su progenie (post - larva 14) bajo dos sistemas de producción comercial. Para este efecto se utilizó como técnica de diagnóstico; el sistema simple de

detección por Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR (por sus siglas en inglés).

CAPÍTULO 1.

1.ANTECEDENTES

1.1 ESTADO ACTUAL DE LA CAMARIOCULTURA EN EL ECUADOR

El cultivo de camarón en el Ecuador se inició hace aproximadamente 4 décadas con el cultivo en estanque de la especie *Penaeus vannamei*, la que es tolerante a los cambios de salinidad. En el Ecuador los estanques ocupan alrededor de 180.000Ha. distribuidos en los estuarios del Archipiélago de Jambelí, río Guayas, Estero Salado, Bahía de Caráquez, Cojimíes, Muisne y San Lorenzo.

En poco menos de 20 años de actividad el sector generó divisas por \$874.4 y \$853.8 millones en los años 1.997 y 1.998 respectivamente, pero debido a la presencia del Síndrome Viral de la Mancha Blanca (WSSV), estas disminuyeron drásticamente. No obstante, a esta crisis sobrevivió el sector empresarial que aplicaba tecnología de punta. A la industria acuícola lo apoyan 189 distribuidos en maduraciones y laboratorios de larvas y por lo menos 78 plantas de procesamiento [8].

Ante la demanda sostenida en el ámbito mundial, la camaricultura se ha convertido en la respuesta al mercado creciente y globalizado. De esta manera, en el 2.003 el sector contribuyó con el 30% de la producción mundial de camarón evaluada en 5.2 millones de toneladas [9].

En 1.998, la provincia del Guayas contaba con el 49% del total del área destinada al cultivo del camarón, repartida en 976 granjas camaroneras [10].

Sin embargo, durante los últimos años, la producción de camarón ha afrontado diversos problemas, lo que ha provocado fluctuaciones del crecimiento de la producción con consecuencias negativas en lo económico y social. Los principales problemas han sido:

Disminución de la productividad, especialmente durante la última década, por actividades antropogénicas, tales como: contaminación por efluentes industriales/urbanos y agricultura [11].

Cambios climáticos de variabilidad interanual, especialmente relacionado al evento El Niño Oscilación del Sur (ENOS), cuyos efectos sobre la actividad camaronera no han sido lo suficientemente estudiados ni documentados.

Epidemiológicos, provocados fundamentalmente por la aparición de enfermedades virales y cuyos aspectos serán tratados en el siguiente sub capítulo con más detalle.

Las enfermedades se han convertido en uno de los mayores problemas para la Acuicultura del camarón en América Latina, lo que significó caídas significativas de los niveles de producción con la propagación WSSV [12], en el periodo 1.999 al 2.005.

Según la Cámara Nacional de Acuicultura [13], las exportaciones camaroneras en 1.998 generaron: \$900 millones de dólares al país, en 1.999 la mancha blanca las redujo a \$500 millones (Ver tablas I y II). En el 2.000, bajaron a \$300 millones de dólares, y al finalizar el año 2.009, una década después de la mancha blanca generaron \$607 millones de dólares.

Tabla I. Impacto específico de la Mancha Blanca en las Exportaciones de Camarón del Ecuador, periodo 1.998 - 2.000 (en miles de libras)

	1.998	1.999	2.000	Variación 1.998-2.000
TOTAL	252,985	209,040	83,513	-66.99%
USA	140,852	106,281	42,305	-69.96%
Europa	76,717	62,184	24,520	-68.04%
Asia	29,808	35,821	13,385	-55.10%
Canadá	2,552	3,077	820	-67.87%

Fuente: Dr. Francisco Yoo, CNA, 2.002.

Tabla II. Impacto específico de la Mancha Blanca en las Exportaciones de Camarón del Ecuador, periodo 1.998 2.000 (en miles de dólares)

	1.998	1.999	2.000	Variación 1.998 - 2.000
TOTAL	875,050	616,942	301,000	-65.60%
USA	520,897	317,152	146,141	-71.94%
Europa	241,131	171,762	87,219	-63.83%
Asia	99,730	112,660	57,219	-42.63%
Canadá	9,021	9,285	2,886	-68.01%
Pérdidas de la industria	US\$600 millones			
Pérdidas en la exportación	US\$900 millones			

Fuente: Dr. Francisco Yoo, CNA, 2.002.

El WSSV no solo provocó la reducción de la producción en un 70%, sino que industrias como las de Brasil, China, Centroamérica y

ciertos países africanos ganaron el espacio dejado por los exportadores ecuatorianos ofertando camarón más barato.

Las drásticas caídas en las exportaciones del camarón blanco no solo afectaron al sector industrial, sino que se vio reflejado en el masivo despido de la mano de obra calificada. De esta manera, se generó la reducción de plazas de trabajo, fenómeno social de graves consecuencias para el país.

Para finales del año 2.000 la situación de la industria no había cambiado de manera significativa y según estimaciones de la Cámara Nacional de Acuicultura (CNA), las pérdidas económicas provocadas por esta enfermedad ascendían a 1.200 millones de dólares, 130.000 plazas de trabajos reducidas y sólo 80,000 hectáreas de producción en actividad de las 175.000 existentes en el país [12].

La alternativa de poder manipular la flora bacteriana y la ecología de los sistemas de larvicultura, a través, de la inoculación de bacterias beneficiosas es muy viable para que la fuente de post-larvas de laboratorio pueda continuar con estabilidad en el futuro. Además, los β -glucanos, combinaciones de vitaminas C y E, y el choque térmico han probado inducir una condición del sistema inmune del camarón que permite controlar la replicación del virus. Los protocolos de

aplicación de estos inmunoestimulantes están siendo probados en la actualidad en el campo [14].

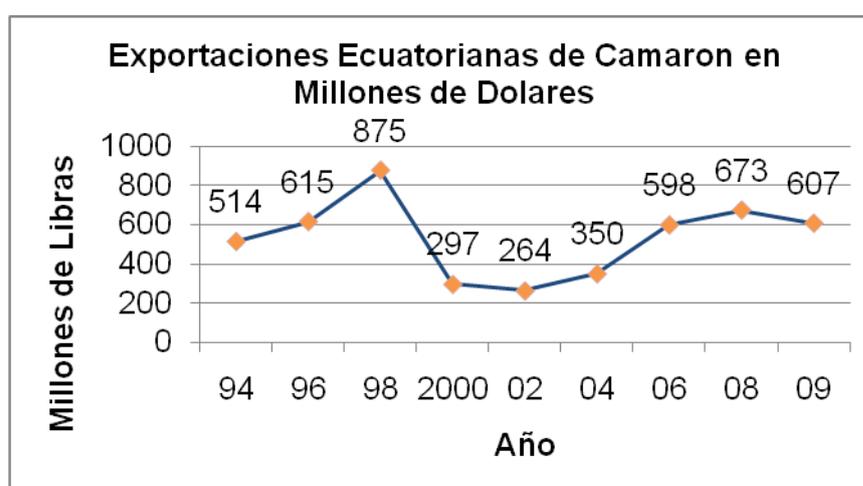
La Cámara Nacional de Acuicultura, gremio que agrupa a la mayoría de productores y exportadores de camarón, también ha tomado acciones, entre ellas el de mantener un convenio con la Global Aquaculture Alliance, que incluyen un diagnóstico ambiental, difusión de buenas prácticas de cultivo y una evaluación anual del grado de implementación.

Además, Ecuador mantiene un sistema de control de calidad altamente reconocido. Ha pasado las exigencias de la FDA, del Departamento de Veterinaria de la UE, de organizaciones de protección al consumidor del Japón y de organizaciones de inspección de Canadá. El 100% de las plantas procesadoras de camarón cumplen con todas las normas nacionales e internacionales de calidad, con el sistema Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control, HACCP (por sus siglas en inglés) y con todos los requerimientos de los compradores.

De igual manera el Ministerio del Ambiente en uso de sus facultades, concedidas en la Constitución, Leyes y Normativas, ha emprendido un proceso hacia la implantación de Sistemas de Gestión Ambiental en el ámbito de industrias y comercios.

Actualmente, el camarón constituye el tercer producto de exportación, después del petróleo y el banano; las exportaciones de camarón se están recuperando, el total de la venta, reportadas por la Cámara Nacional de Acuicultura para el año 2.009, sumó \$607'254.114,25 millones de dólares frente a los \$673'469.146,78 registrados en el 2.008 representando un decremento del 9,83% a un precio promedio de \$2,03 por libra exportada (Gráfico 1).

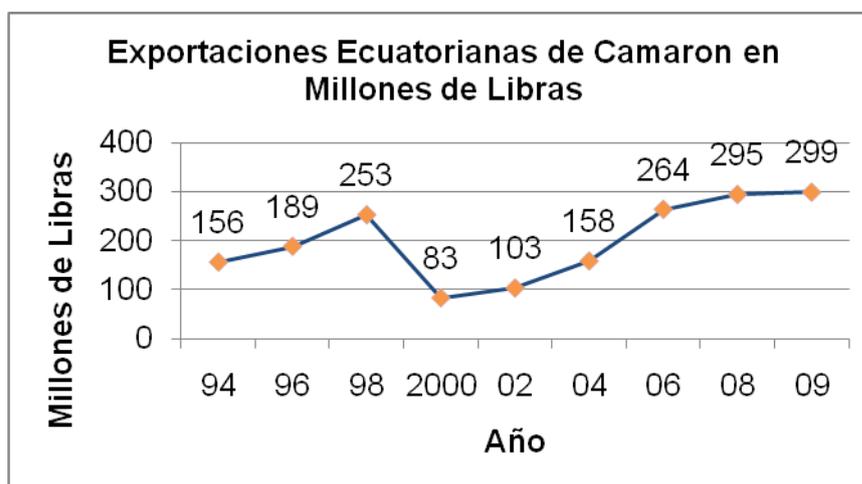
Gráfico 1. Exportaciones ecuatorianas de camarón en millones de dólares, período 1.994 - 2.009.



Fuente: Estadísticas Cía Ltda. Cámara Nacional de Acuicultura.

En lo referente a libras exportadas a partir del año 2.006 se superó la cifra récord de 1.998 que fueron de 252'985.907; alcanzando para el 2.009 la cantidad de 299'333.908 libras de camarón exportadas, con un incremento del 1,56% con respecto al 2.008 (Gráfico 2).

Gráfico 2. Exportaciones ecuatorianas de camarón en millones de libras, período 1.994 - 2.009.



Fuente: Estadísticas Cía Ltda. Cámara Nacional de Acuicultura.

En el Ecuador existe un total de 313 laboratorios de larvas de camarón ubicados a lo largo de la costa ecuatoriana (Tabla III), de los cuales 189 (Tabla IV) se encuentran operativos, los mismos que desarrollan su actividad en las provincias del El Oro, Esmeraldas, Guayas, Manabí, y Santa Elena (Subsecretaría Acuicultura, 2.009).

El subsector de laboratorios de larvas de camarón se redujo en un 60%. En la Península de Santa Elena existen actualmente aproximadamente 108 laboratorios en funcionamiento.

Tabla III. Distribución de los laboratorios de larvas por provincias en el Ecuador.

Provincia	Laboratorios de larvas	Porcentaje
Guayas	19	6,07
Manabí	91	29,07
Santa Elena	174	55,59
Esmeraldas	8	2,56
El Oro	21	6,71

Fuente: Subsecretaría de Acuicultura, 2.009.

Tabla IV. Distribución de los laboratorios de larvas operativos por provincias en el Ecuador.

Provincia	Laboratorios de larvas	Porcentaje
Guayas	3	1,59
Manabí	56	29,63
Santa Elena	108	57,14
Esmeraldas	6	3,17
El Oro	16	8,47

Fuente: Subsecretaría de Acuicultura, 2.009.

1.2 PRINCIPALES PATOGENOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE CAMARON EN EL ECUADOR

Los principales patógenos que han afectado el cultivo de camarón en el país, han sido de origen viral, se puede decir que a lo largo de la historia de la camaricultura ecuatoriana podemos encontrar tres pandemias asociadas a las siguientes enfermedades:

Síndrome de La Gaviota, en el período de 1.989 y 1.990 denominado de esta manera porque el productor se enteraba de la muerte de su cultivo cuando gran cantidad de gaviotas aparecían a aprovechar como alimento el camarón moribundo que emergía a las superficies de las piscinas en cultivo. Así, las pérdidas causadas por esta enfermedad ascendieron a los \$200 millones de dólares.

Síndrome de Taura, TSV (por sus siglas en inglés), cuya aparición fue en 1.992. Este virus tiende a infectar camarones juveniles de entre dos y cuatro semanas de tanques o estanques sembrados (0,1–1,5 g de peso corporal) y tiene gran ocurrencia dentro del período de un solo ciclo de muda. En la fase aguda de la enfermedad, durante la premuda, los camarones están débiles y con exoesqueletos blandos, tienen los tractos digestivos vacíos y una expansión difusa de los cromatóforos rojos, particularmente en la cola, por lo que su nombre

común es síndrome de la cola roja [15]. Estos animales usualmente morirán durante la muda (5-95 por ciento). Se sabe que los camarones adultos son más resistentes que los juveniles. Los camarones que sobreviven mostrarán signos de recuperación y entran en una fase crónica de la enfermedad [16]. En el Ecuador, produjo una drástica disminución en la producción en lo que corresponde a cultivos en piscinas en el período 1.992-1.993 y las pérdidas se estimaron en \$300 millones de dólares.

Finalmente, el Síndrome Viral de la Mancha Blanca, WSSV (por sus siglas en ingles) en 1.999, ocasionó mortalidad masiva del camarón cultivado en las piscinas y un decrecimiento en la producción nacional. El Centro Nacional de Investigaciones Marinas para la Acuicultura (CENAIM) ante la emergencia causada por la detección del virus, puso en marcha un plan de monitoreo de toda la costa ecuatoriana, para conocer la distribución geográfica del mismo y su prevalencia (Proporción de animales infectados). Si bien, este plan se llevó a cabo a través de la toma de muestras en piscinas y laboratorios y el análisis biológico por medio de una técnica nombrada como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en ingles). Los resultados de este estudio aunque interesantes, no fueron concluyentes [14]. Las pérdidas causadas por esta enfermedad se estimaron en 1.200 millones de dólares.

1.3 IHHNV (VIRUS DE LA NECROSIS HIPODERMICA Y HEMATOPOYETICA INFECCIOSO)

1.3.1 Etiología

El IHHNV ha sido caracterizado como un virus simple cadena de ADN con un tamaño aproximado de 1.4Kb, presenta una simetría icosaédrica (Figura 1), carente de envoltura, mide aproximadamente 22nm, tiene una densidad de 1,4g/ml en CsCl, y posee una cápside con cuatro polipéptidos de pesos moleculares 74, 47, 39 y 37,5KD, respectivamente [17].

El IHHNV ha sido clasificado como miembro de la familia Parvoviridae debido a su estructura y morfología bioquímica [18].

En la actualidad, IHHNV ha sido clasificado en la subfamilia *Densovirinae*, el género *Brevidensovirus*. [19].

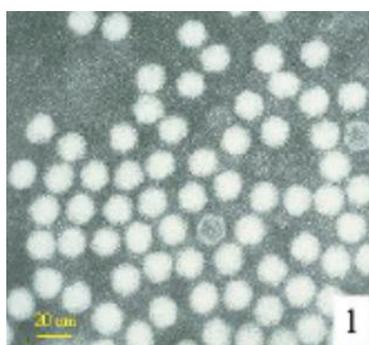


Figura 1. Viriones de IHHNV purificados a partir de tejidos de *P. vannamei* [18].

1.3.2 Epidemiología

Este virus fue descubierto en *Penaeus stylirostris* en Hawaii causando el 90% de mortalidad en camarones juveniles y sub-adultos [20]. Aunque es originario de Filipinas [21].

La presencia de IHHNV se ha detectado desde 1.989 en camarones silvestres y de cultivo, en México, Centro y Sudamérica. Esto indica que su distribución geográfica se encuentra ampliamente a lo largo de todo el Pacífico americano [22 y 23].

L. stylirostris, es sumamente susceptible a la infección por IHHNV y algunas epizootias ocurrieron en granjas con sistemas de cultivo semi-intensivo e intensivo [24]. Sin embargo, la mortalidad provocada por este virus en ensayos de desafío es menor en *P. semisulcatus*, *P. chinensis*, *P. californiensis* [24, 25, 26, 27 y 28].

En *P. vannamei* IHHNV causa una enfermedad crónica conocida como Síndrome de la Deformidad y del Enanismo - RDS por sus siglas en inglés- [7] (Foto 1).



Foto 1. Reproductor macho *P. vannamei*, que muestra deformidad en el rostrum y resulta ser positivo para IHHNV al cabo del análisis, MPM = Marcador de peso molecular; P = Pleópodo; C+ = Control positivo 345bp y C- = Control negativo (Fuente: R. Marcillo Del C. Ayangué 2.009).

IHHNV se caracteriza por provocar infecciones persistentes y latentes en *P. vannamei*. Así, los camarones pueden ser portadores asintomáticos y pueden transmitir verticalmente la infección a su progenie y horizontalmente a otras poblaciones [29 y 30].

La infección de IHHNV puede ocurrir por transmisión horizontal con ingestión del camarón infectado muerto o por el contacto con agua donde se encuentren animales infectados [31]. La transmisión vertical ha sido sugerida por la presencia

de IHHNV en los ovarios de las hembras infectadas en *P. vannamei* [32].

1.3.3 Signos clínicos, tejidos y estadios afectados

En *P. vannamei*, la enfermedad crónica del RDS, ocurre en esta especie resultado de la infección por el IHHNV. La gravedad y prevalencia podría estar relacionada con la infección durante el periodo larvario o principios de post-larva [33 y 34]. Juveniles con RDS pueden presentar una inclinación del rostrum (45° a 90°) o deformidades del mismo; anomalías principalmente en el quinto o sexto segmento abdominal; antenas arrugadas; aspereza y otras deformidades en el exoesqueleto [33, 34 y 35].

Los juveniles presentan una variabilidad de tallas muy grandes, con una proporción de camarones pequeños (“enanos”) mayor a lo esperado normalmente. El coeficiente de variación (CV= la desviación estándar dividida entre el promedio de los grupos de tallas diferentes dentro de una población) en las poblaciones con RDS es típicamente superior al 30% e incluso puede aproximarse al 90% [34 y 36]. En contraste, las poblaciones de camarones juveniles de *P. vannamei* y *P. stylirostris* libres de IHHNV (y por consiguiente

libre de RDS) presentan un CV entre 10 al 30% [33, 34, 35, 36 y 37].

En *P. vannamei*, a nivel de tejidos se observa la presencia prominente de cuerpos de inclusión intracelular llamados Cowdry type A (Figura 2), los tejidos afectados de origen ectodérmico y mesodérmico pueden ser: branquias, epitelio cuticular, tejido conectivo, tejido hematopoyético, glándula antenal [34].

Todos los estadios son susceptibles de infección al virus y hasta el momento no se ha reportado ningún vector conocido en infecciones naturales o experimentales [7].

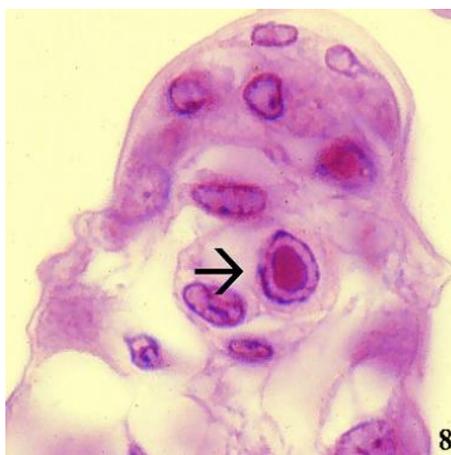


Figura 2. Branquia de juvenil *P. vannamei* mostrando inclusión intracelular Cowdry type A. (H&E 1800X) Fuente: D. V. Lightner, 1.996 (Handbook of Shrimp Pathology)

1.4 METODOS DE DIAGNOSTICO

Los métodos de diagnóstico, deben proveer al productor, información acerca del estado de salud de los animales cultivados, de manera rápida y eficaz, para tomar las medidas correctivas del caso.

En tal virtud, para la detección de IHHNV, se han desarrollado una variada gama de métodos de diagnóstico que van desde la observación en fresco al microscopio de branquias y órganos afectados; Microscopia electrónica de transmisión (MET), según protocolo de [18].

Histopatología, basada en la demostración histológica de cuerpos de inclusión intracelulares tipo Cowdry A (CAIs), en cortes histológicos (3-6 micras) de tejidos teñidos con Hematoxilina y Eosina/Floxina [38].

Métodos moleculares, utilizando sondas genéticas marcadas con DIG, específicas para la detección de IHHNV, las cuales son utilizadas en tres formas: *Southern Blot*, formato punto-mancha ("*Dot blot*"), e *Hibridación in situ*.

Una de las técnicas más utilizadas debido a su especificidad y sensibilidad [39, 40 y 41], para la detección de la presencia de IHHNV, en probables huéspedes utilizando muestras de tejido, tales como pleópodos, sin la necesidad de sacrificar a los animales es la

Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR (por sus siglas en inglés) [40 y 42]. *PCR en tiempo real* [43 y 44]. *PCR multiplex B.* [45], y una nueva técnica basada en amplificación isotérmica del bucle mediado, *LAMP* por sus siglas en inglés, [46].

CAPÍTULO 2.

2.MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1 Obtención Reproductores

Ambos lotes provienen de especies domesticadas, el árbol genealógico es presentado en los anexos A-1 y A-2, el levantamiento de los mismos se lo realizó en una camaronera ubicada en la zona de Chongón - Guayas - Ecuador.

2.1.1.1 Trazabilidad Lote B21

Las post - larvas fueron recibidas en enero 20, 2.008; 1'700.000 pl11 fueron sembradas en tanques de

cuarentena a una densidad de 850.000pl/tq y con un peso aproximado de 311pl/gr.

Al cabo de 3 días de aclimatación, con 92.89% de supervivencia y peso promedio de 250pl/gr. Las larvas fueron transferidas a precriadero a una densidad de 262.000pl/Ha.

En precriadero se mantuvieron 17 días, obteniendo un 73.87% de supervivencia y peso de 0.16g, fueron sembradas en piscinas de Fase A, la densidad fue de 76.764camarones/Ha.

Los camarones fueron mantenidos durante 117días, siguiendo los protocolos, tratamientos y manejos propios de la camaronera (datos no publicados); al final de esta fase la supervivencia fue de 20.16% y 22.5g de peso promedio al momento de transferir a fase B.

La densidad de siembra en fase B fue de 7.143camarones/Ha; finalmente después de 54 días, con una supervivencia de 76% y un peso promedio para las hembras de 33g (Tabla V); las hembras y los machos seleccionados fueron trasladados a la reserva

de la maduración. Los datos completos de trazabilidad se muestran en el Anexo B-1.

La aclimatación, ablación y formación de tanques de producción se lo realizo a los 11 días subsiguientes a la recepción de los reproductores.

Tabla V. Trazabilidad lote B-21.

Fase	Densidad (a/Ha)	Permanencia (días)	Peso Inicial (g)	Supervivencia (%)	Peso Final (g)
Raceway	850.000*	3	0,003	92,89	0,004
Precriadero	262.000	17	0,004	73,87	0,16
Fase A	76.764	117	0,16	20,16	21,20
Fase B	7.143	54	22,5	76,00	33,00

Fuente: Trazabilidad OMARSA - Chongón, 2.008; * = post - larvas / raceway.

2.1.1.2 Trazabilidad Lote LGP6

Las post - larvas fueron recibidas en febrero 22, 2.008; 315.000 pl12 fueron sembradas en tanques de cuarentena a una densidad de 315.000pl/tq y con un peso aproximado de 140pl/gr.

Al cabo de 10 días de aclimatación, con 62.08% de supervivencia y peso promedio de 50pl/gr. Las larvas fueron transferidas a Fase A, la densidad fue de 48.653camarones/Ha.

En Fase A se mantuvieron 158 días, obteniendo un 40,15% de supervivencia y 24g de peso promedio para la selección masal y transferencia a Fase B.

La densidad de siembra en fase B fue de 6.563camarones/Ha; finalmente después de 45 días, con una supervivencia de 91,90% y un peso promedio para las hembras de 37g (Tabla VI); las hembras y los machos seleccionados fueron trasladados a la reserva de la maduración. Los datos completos de trazabilidad se muestran en el Anexo B-2.

La aclimatación, ablación y formación de tanques de producción se lo realizo a los 17 días subsiguientes a la recepción de los reproductores.

Tabla VI. Trazabilidad lote LGP-6.

Fase	Densidad (a/Ha)	Permanencia (días)	Peso Inicial (g)	Supervivencia (%)	Peso Final (g)
Raceway	315.000*	10	0,007	62,08	0,02
Fase A	48.653	158	0,02	40,15	22,5
Fase B	6.563	45	24	91,90	37,00

Fuente: Trazabilidad OMARSA - Chongon, 2.008; * = post - larvas / raceway.

2.1.1.3 Pesca Hembras grávidas

En la selección de hembras los tanques y días de producción, número de hembras por tanque y los

tanques de desove en los cuales fueron colocadas las hembras, del primer y segundo bioensayo se muestran en las Tablas No. VII y VIII, nótese que los lotes tenían en promedio una diferencia de 60 días de producción.

Se tomó 6 hembras con grado 5 de madurez gonadal por tanque; el desove ocurrió en tanques de 600litros, colocando 12 hembras/tanque.

Al momento de devolución de hembras, cosecha, desinfección y aclimatación de huevos, se muestreó un pleópodo por hembra, fijándolo en tubos 1,5ml con 700ul de etanol al 100%, para su posterior análisis y fueron identificadas con un anillo para evitar que una misma hembra desove en los dos bioensayos.

Tabla VII. Bioensayo 1: tanque y días de producción, número de hembras y número de tanque de desove por lote.

Lote	Tanque de producción	Días de producción	Número de hembras grávidas	Tanque de desove
B-21	11	84	6	18
	17	83	6	18
	24	82	6	17
	29	83	6	17
LGP-6	12	23	6	19
	23	23	6	20
	30	24	6	20

	42	22	6	19
--	----	----	---	----

Fuente: Trazabilidad BIOGEMAR - Ayangue, 2.008.

Tabla VIII. Bioensayo 2: tanque y días de producción, número de hembras y número de tanque de desove por lote.

Lote	Tanque de producción	Días de producción	Número de hembras grávidas	Tanque de desove
B-21	17	95	6	19
	29	95	6	19
LGP-6	12	35	6	20
	23	35	6	20

Fuente: Trazabilidad BIOGEMAR - Ayangue, 2.008.

2.1.2 Obtención de Post - larvas

La eclosión ocurrió en tanques de 400litros, manteniendo una temperatura de 30°C, a una salinidad de 30ppt; la cantidad de huevos, huevos por hembra, cantidad de nauplios II (N-II), porcentaje de fertilidad, cantidad de nauplios V (N-V) y nauplios V por hembra de cada desove para ambos bioensayos se muestran en las tablas IX y X.

Tabla IX. Bioensayo 1: Datos de desove y eclosión por lote.

Lote	Tq. de desove	No. de huevos	Huevos hembra	No. N-II	% Fertilidad	No. N-V	N-V hembra
B-21	17	2.535	211	1.755	69	3.080	128
	18	2.265	188	1.450	64		
LGP-6	19	2.385	198	1.540	64	3.106	129
	20	2.505	208	1.630	65		

Fuente: Trazabilidad BIOGEMAR - Ayangue, 2.008.

Tabla X. Bioensayo 2: Datos de desove y eclosión por lote.

Lote	Tq. de desove	No. de huevos	Huevos hembra	No. N-II	% Fertilidad	No. N-V	N-V hembra
B-21	19	2.028	169	1.600	79	1.536	128
LGP-6	20	1.956	163	1.670	85	1.630	135

Fuente: Trazabilidad BIOGEMAR - Ayangué, 2.008.

La larvicultura fue realizada en dos zonas geográficas diferentes, el primer bioensayo se lo realizó en Mar Bravo y el segundo fue en San Pablo; la densidad de siembra se mantuvo en 320 nauplios por litro y se utilizó el mismo protocolo de producción, la tabla de alimentación general se observa en el Anexo C.

Por cada lote se colectó 50 post - larvas 14 las cuales fueron fijadas en tubos de 1,5ml con 700ul de etanol al 100%.

2.2 DETERMINACION DEL TAMAÑO DE LAS MUESTRAS

Todo estudio de presencia de patógenos lleva implícito en la fase de diseño la determinación del tamaño de la muestra necesario para la ejecución del mismo. El no realizar dicho proceso, puede llevarnos a dos situaciones diferentes: Primera que realicemos el estudio sin el número adecuado de individuos, con lo cual no podremos ser precisos al estimar los parámetros y además no encontraremos diferencias significativas cuando en la realidad sí existen. La segunda situación es

que podríamos estudiar un número innecesario de individuos, lo cual lleva implícito no solo la pérdida de tiempo e incremento de recursos innecesarios sino que además la calidad del estudio, dado dicho incremento, puede verse afectada en sentido negativo.

En lo referente a progenitoras se muestrearon el 100% de hembras desovadas.

Para el primer bioensayo el lote B21 tenía una población de 181 hembras de las cuales se muestreo el 13.26%; en cambio para el lote LGP6 habían 184 hembras de las cuales se muestreo el 13.04%.

Para el segundo bioensayo, el lote B21 tenía 84 hembras muestreando el 14.29%, y LGP6 tenía 81 hembras de donde se muestreo el 14.81%.

En cuanto a las post - larvas se partió de la premisa de que nuestra población era infinita y dado que desconocemos de estudios previos el valor correspondiente a p lo llevamos al máximo permisible, es decir, 0,5:

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 * p * q}{d^2}$$

- $Z_{\alpha/2} = 1.962$ (ya que el nivel de confianza es 95%)
- $p =$ proporción esperada (en este caso 5% = 0.05)

- $q = 1 - p$ (en este caso $1 - 0.05 = 0.95$)
- n = tamaño de la muestra (en este caso 50 post- larvas)
- d = precisión (variable desconocida)

2.3 PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN

Una vez obtenidas todas las muestras del presente estudio, éstas fueron mantenidas a -20°C en etanol 100%, las mismas que siguieron el siguiente protocolo de extracción de ADN.

Descarte del etanol 100%, seguido de un lavado en solución salina con 500 μl de NaCl 0.85% durante 5 minutos. Posteriormente, se colocaba 200 μl de lysis buffer -0.01M NaOH, S.D.S. 0.025%- se dejaba actuar a la mezcla por 30 minutos para desintegrar el tejido. Al cabo de este tiempo, se procedía a macerar y extraer restos de exoesqueleto, en caso de que fuere necesario.

En cada tubo se colocaba seguros tipo caballero, para llevar las muestras a baño maría, aproximadamente 95°C durante 10 minutos. Las muestras fueron centrifugadas en una Eppendorf Centrifuge 5417c y llevadas a 13.000rpm por 10 minutos. Previamente se ponían en congelación tubos de 1,7ml con 300 μl de etanol 95%, para transferir 150 μl del sobrenadante obtenido en la primera centrifugación. Se agitaban los tubos para conseguir una buena

mezcla y se ponían en un congelador Dual Function Whirpool por 5 minutos.

Las muestras eran llevadas a una segunda centrifugación a 13.000rpm por 5 minutos, de esta manera se obtenía la presencia de un sedimento. Sin tocarlo se realizaron lavados con etanol helado. Los tubos tenían una tercera centrifugación a 13.000rpm por 5 minutos, se descartaba por completo el etanol 70% y se los secaba a temperatura ambiente durante 45 minutos para evaporar por completo la presencia de etanol.

Finalmente, las muestras eran re-suspendidas con agua ultra pura utilizando de 50 a 70 μ l, los tubos se los colocaba en un agitador Fisher Vortex Genie 2 durante 20 minutos, centrifugados a 13.000rpm por 5 segundos y almacenados en un congelador a -20°C , para su posterior análisis.

2.4 SISTEMA DE DETECCION POR REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PRC)

Se seleccionó el sistema de detección simple, puesto que para efectos del estudio la sensibilidad e intensidad de los productos de amplificación eran lo suficientemente confiables.

2.4.1 Iniciadores

En estudios previos, para el diseño de los iniciadores se partió del genoma del virus con número de referencia del *Gen Bank* AF218266.

Para el segmento seleccionado se utilizaron los iniciadores forward (5'AAT TCG ACG CTG CCA ATG AT 3') y reverse (5'GCC AAT GTT ACG TCG GCT TC 3'), que amplificaban un producto de 345pb. Estos iniciadores fueron sintetizados por Invitrogen.

2.4.2 Mezcla de Reacción

Se elaboró la siguiente mezcla de reacción: 2 µl de 1x buffer PCR -20mM Tris-HCL, 50mM KCl-; 0,6 µl de MgCl₂ -1.5mM-; 0,4 µl de dNTPs -0,2mM-; 1 µl de cada uno de los iniciadores - 0,5 µM-; 1UI de *Taq* (invitrogen) polimerasa; 13,8 µl de agua ultra pura y 1 µl de ADN objetivo alcanzando un volumen final de reacción de 20 µl.

Tabla XI. Mezcla de Reacción.

Reactivo	C. inicial	Volumen (µl)	C. final
Buffer	10X	2	1X
MgCl ₂	50mM	0,6	1,5mM
DNTPs	10uM	0,4	0,2uM

Iniciador Forward	10uM	1	0,5uM
Iniciador Reverse	10uM	1	0,5uM
Taq polimerasa	5UI	0,2	1UI/ul
H₂O ultrapura		13,8	
ADN objetivo		1	
Volumen final		20	

Fuente: R. Marcillo - Ayangue, 2.008; C.= Concentración.

2.4.3 Programa del Termociclador

La programación en el termociclador fue: 1 ciclo (desnaturalización 95°C por 3 minutos), 41 ciclos (desnaturalización 95°C por 30 segundos; hibridación a 58°C por 30 segundos; y polimerización a 72°C por 1 minuto), 1 ciclo (polimerización a 72°C por 3 minutos) y un ciclo final de temperatura de incubación a 10°C indefinidamente.

Tabla XII. Programa Termociclador.

Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización 95°C	3 minutos	1
Desnaturalización 95°C	30 segundos	41
Hibridación a 58°C	30 segundos	
Polimerización a 72°C	1 minuto	
Polimerización a 72°C	3 minutos	1
Incubación a 10°C	Indefinido	Final

Fuente: R. Marcillo - Ayangue, 2.008.

2.5 ELECTROFORESIS

Una vez amplificados los productos del ADN objetivo, la visualización de cada una de las muestras, fueron resueltas por electroforesis en geles de agarosa 1,2%, teñidos con bromuro de etidio (0.5mg/ml).

Finalmente los amplicones de ADN eran observados en una habitación oscura por exposición del gel a radiación UV, cada uno de los geles fue fotografiado para su posterior análisis.

CAPÍTULO 3.

3.RESULTADOS

Los métodos utilizados en el laboratorio de BIOGEMAR, fueron adecuados para el diagnóstico de IHHNV, obteniéndose pocos artefactos. Los casos artefactuales fueron a su vez vueltos a evaluar en el laboratorio, con el fin de eliminar las amplificaciones imprecisas.

La regla de decisión para determinar la infección o no del virus era la presencia de una banda aproximadamente a 345pb; ya que este es el tamaño de la región del genoma de IHHNV a ser detectada.

3.1 PREVALENCIA EN PROGENITORAS

Con la finalidad de determinar la prevalencia de progenitoras, una muestra representativa de las hembras post desove fue seleccionada para obtener el material biológico para su evaluación por PCR. El tejido seleccionado como material biológico (pleópodos del sexto segmento abdominal) fue sometido a pruebas de PCR simple para la detección del virus de IHHNV.

3.1.1 Bioensayo 1

Los análisis por PCR simple utilizando material biológico del lote B-21, demostraron que 20 de los 24 progenitores hembras se encontraban infectados con el virus IHHNV.

Basados en estos datos se puede determinar que la prevalencia del IHHNV en esta población de reproductores hembras se encontraba aproximadamente en el orden del 83,3% Foto 2.

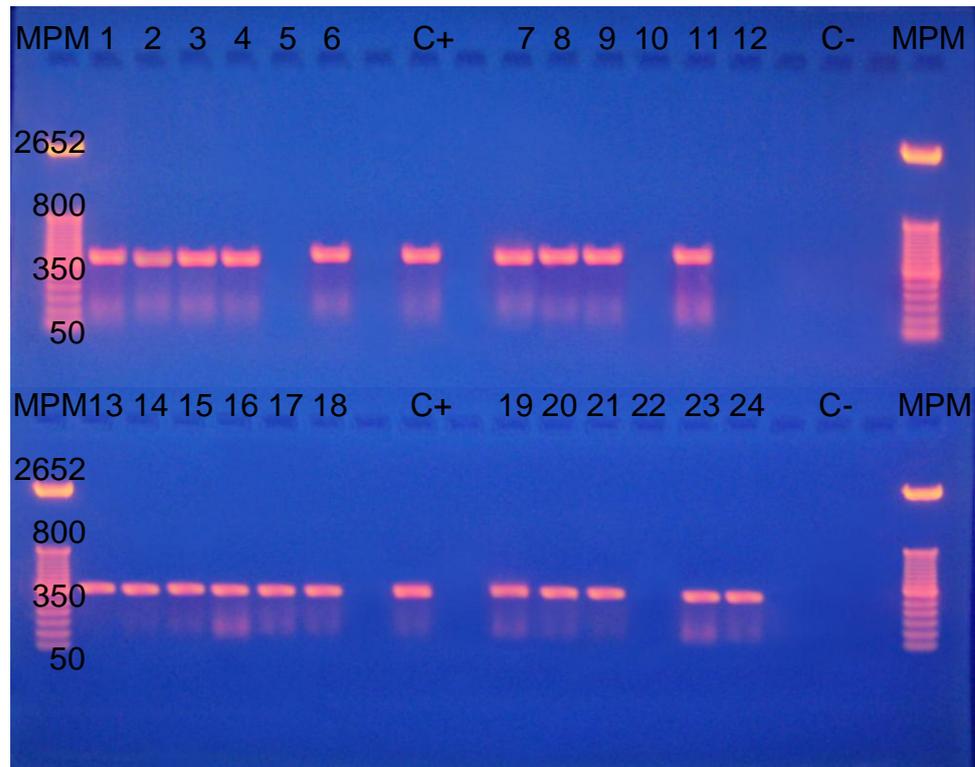


Foto 2. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHHNV Lote B-21, Reproductores, B1. 1-24: Reacciones de PCR. MPM = Marcador de peso molecular; C+ = Control positivo banda de 345pb. C- = Control negativo (Fuente: R. Marcillo Del C. Ayangue 2.009).

Los análisis por PCR simple utilizando material biológico del lote LGP-6, demostraron que 17 de los 24 progenitores hembras se encontraban infectados con el virus IHHNV.

Basados en estos datos se puede determinar que la prevalencia del IHHNV en esta población de reproductores hembras se encontraba aproximadamente en el orden del 70,8% Foto 3.

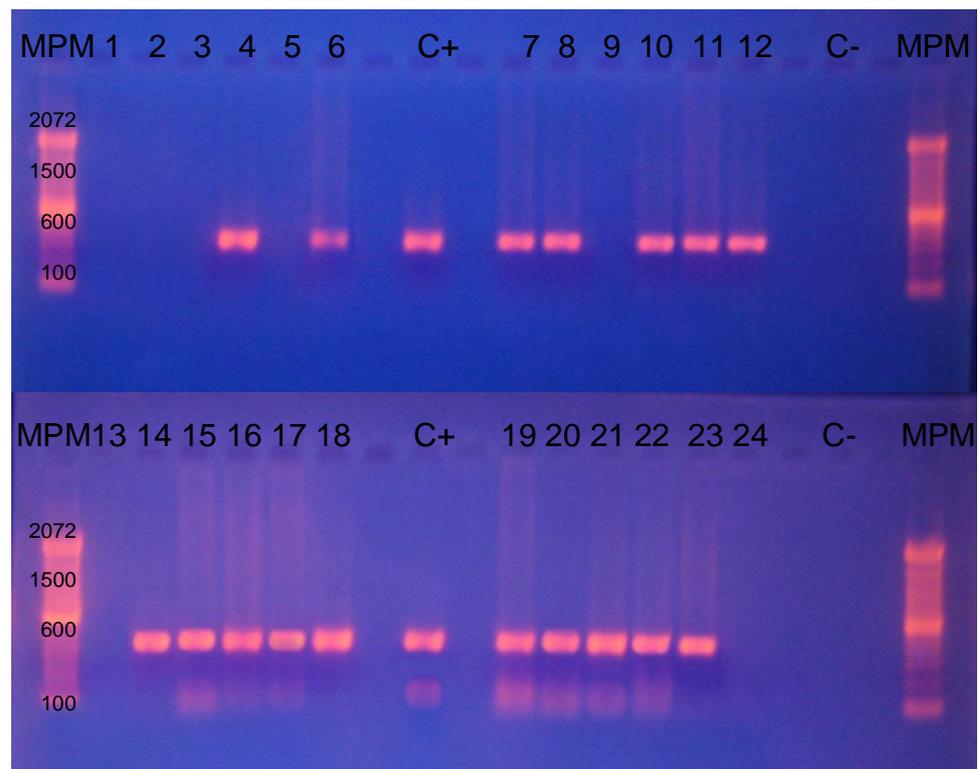


Foto 3. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHHNV Lote LGP-6, Reproductores, B1. 1-24: Reacciones de PCR. MPM = Marcador de peso molecular; C+ = Control positivo banda de 345pb. C- = Control negativo (Fuente: R. Marcillo Del C. Ayangue 2.009).

3.1.2 Bioensayo 2

Los análisis por PCR simple utilizando material biológico del lote B-21, demostraron que 8 de los 12 progenitores hembras se encontraban infectados con el virus IHHNV.

Basados en estos datos se puede determinar que la prevalencia del IHHNV en esta población de reproductores hembras se encontraba aproximadamente en el orden del 66,7% Foto 4.

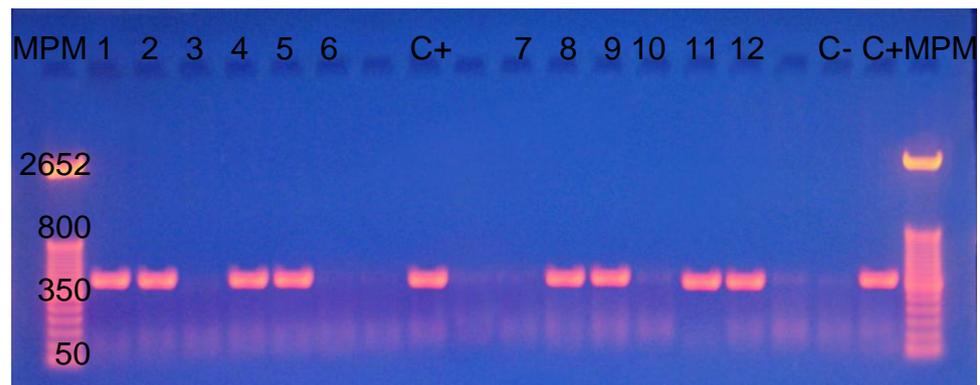


Foto 4. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHHNV Lote B-21, Reproductores, B2. 1-12: Reacciones de PCR. MPM = Marcador de peso molecular; C+ = Control positivo banda de 345pb. C- = Control negativo (Fuente: R. Marcillo Del C. Ayangue 2.009).

Los análisis por PCR simple utilizando material biológico del lote LGP-6, demostraron que 4 de los 12 progenitores hembras se encontraban infectados con el virus IHHNV.

Basados en estos datos se puede determinar que la prevalencia del IHHNV en esta población de reproductores hembras se encontraba aproximadamente en el orden del 33,3% Foto 5.

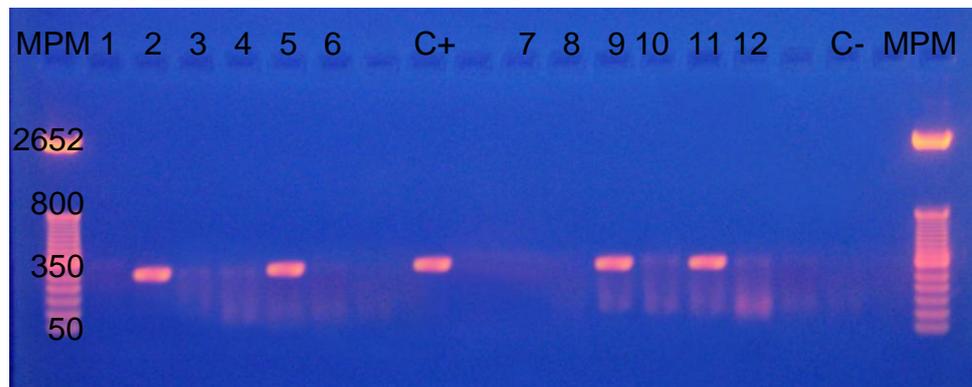


Foto 5. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHHNV Lote LGP-6, Reproductores, B2. 1-12: Reacciones de PCR. MPM = Marcador de peso molecular; C+ = Control positivo banda de 345pb. C- = Control negativo (Fuente: R. Marcillo Del C. Ayangue 2.009).

3.2 PREVALENCIA EN POST - LARVAS 14

La larvicultura se desarrollo en dos laboratorios ubicados en zonas geográficas diferentes: El primero ubicado en Mar Bravo-Salinas (Bioensayo 1) y el segundo ubicado en San Pablo (Bioensayo 2).

La densidad de siembra fue de aproximadamente 320nauplios/litro, tratando de mantener los mismos protocolos de producción para ambos laboratorios; manteniéndolos durante 21 días. A esta edad, es decir, pl14, se puede obtener la cantidad suficiente de ADN por individuo.

A fin de obtener información del estado de infección por IHHNV, se seleccionaron 50 post - larvas 14 por lote, las cuales fueron analizadas mediante el sistema de PCR simple descrito en materiales y métodos.

La finalidad de estos bioensayos era determinar si existe una relación entre los progenitores hembras infectadas y las post - larvas infectadas cuyos resultados serán presentados a continuación.

3.2.1 Bioensayo 1

El primer levantamiento de post - larvas de ambos lotes, fue realizado en un laboratorio ubicado en Mar Bravo, perteneciente a BIOGEMAR S. A.

Los análisis por PCR simple utilizando material biológico del lote B-21, demostraron que 38 de las 50 post - larvas se encontraban infectadas con el virus IHHNV (Foto 6). En cambio para el lote LGP-6, mostraron que 33 de las 50 post - larvas estaban infectadas por el mismo virus (Foto 7).

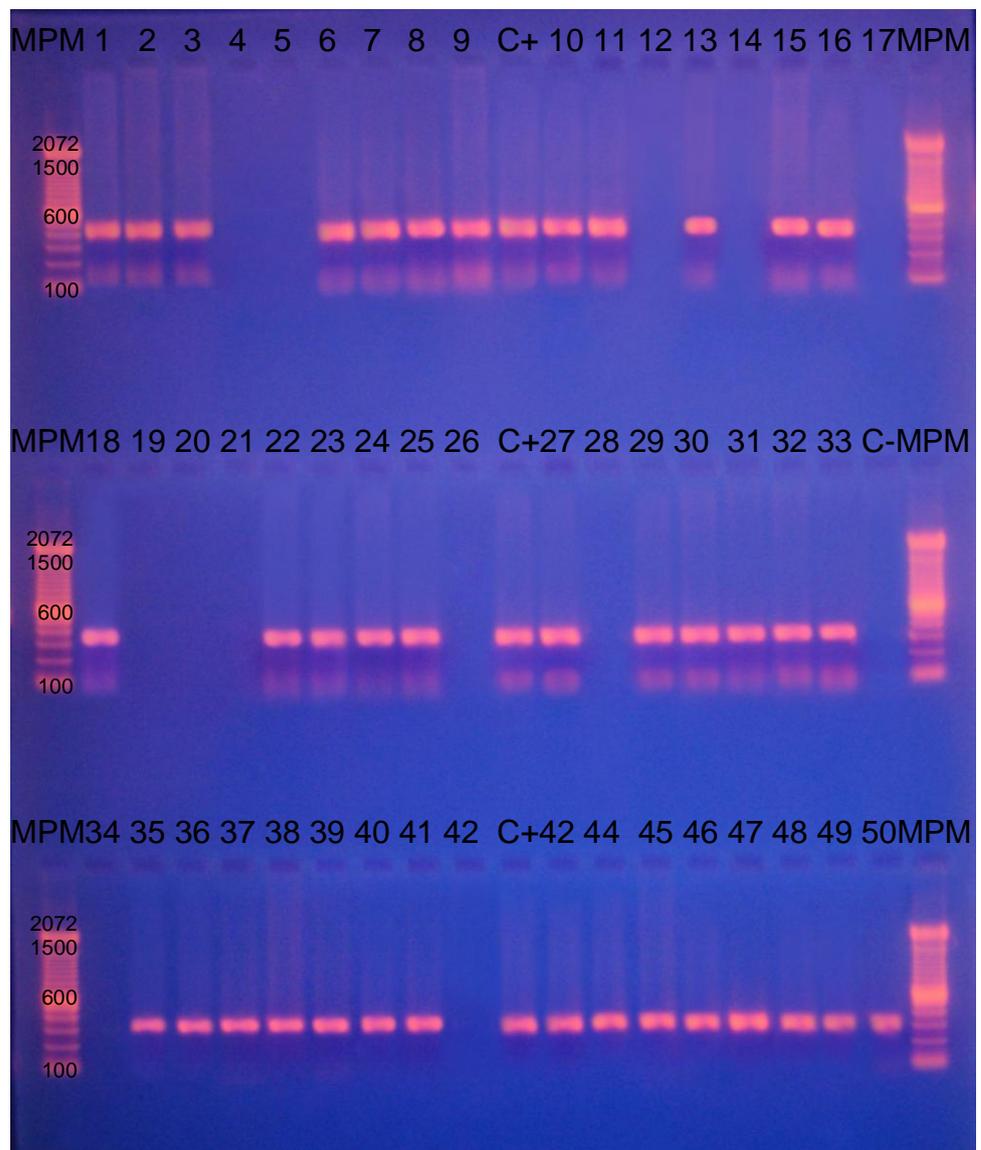


Foto 6. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHNV Lote B-21, Post - larva 14, B1. 1-50: Reacciones de PCR. MPM = Marcador de peso molecular; C+ = Control positivo banda de 345pb. C- = Control negativo (Fuente: R. Marcillo Del C. Ayangue 2.009).

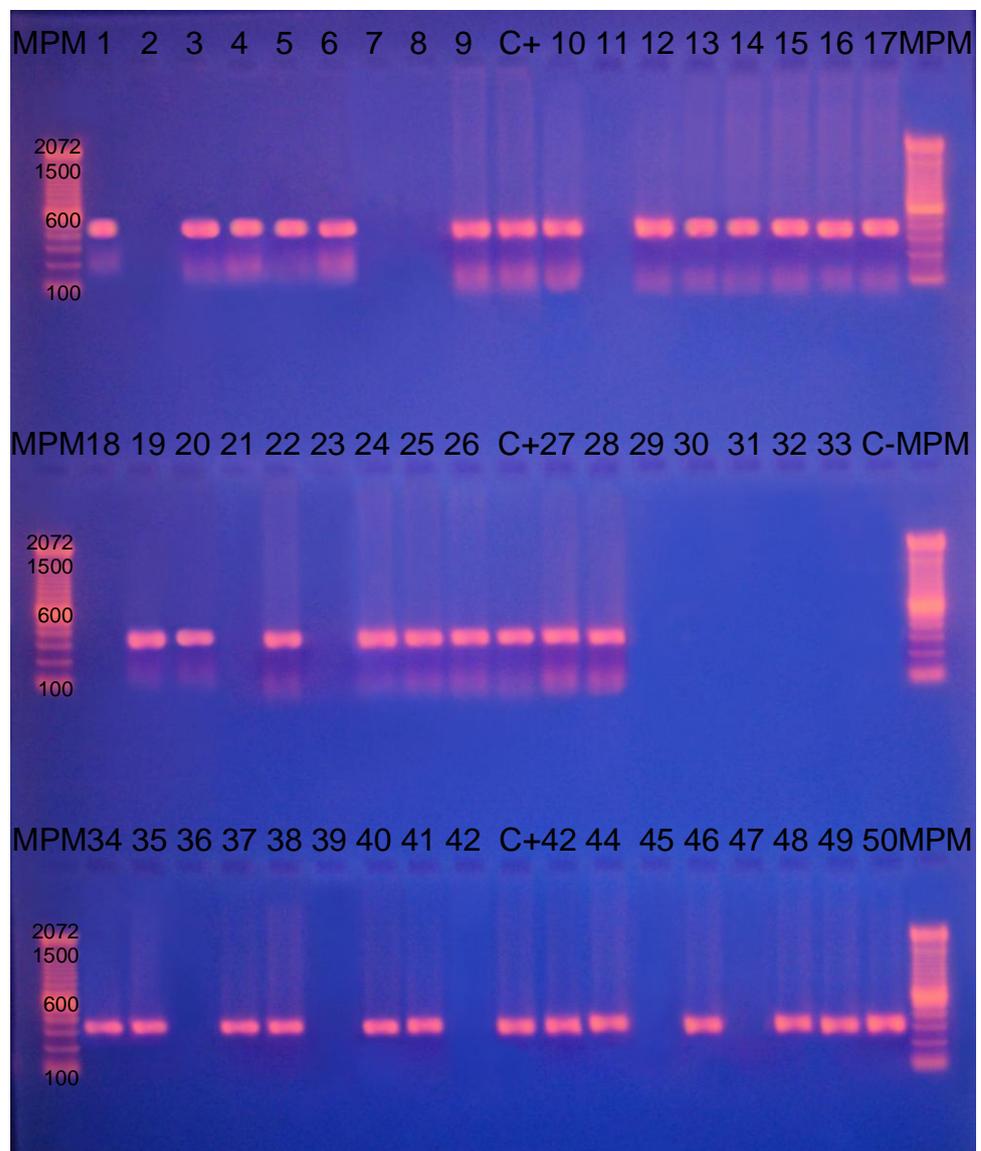


Foto 7. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHHNV Lote LGP-6, Post - larva 14, B1. 1-50: Reacciones de PCR. MPM = Marcador de peso molecular; C+ = Control positivo banda de 345pb. C- = Control negativo (Fuente: R. Marcillo Del C. Ayangue 2.009).

Basados en estos datos se puede determinar que la prevalencia del IHHNV en esta población de post - larvas 14 se encontraban aproximadamente en el orden del 76% para el lote B-21 y 66% para el lote LGP-6.

3.2.2 Bioensayo 2

La larvicultura del segundo bioensayo, se la realizo en un laboratorio ubicado en San Pablo, siguiendo el mismo protocolo de producción que el primer bioensayo, de igual manera el laboratorio pertenece a BIOGEMAR S. A.

Los análisis por PCR simple utilizando material biológico del lote B-21, demostraron que 29 de las 50 post - larvas se encontraban infectadas con el virus IHHNV (Foto 8). En cambio para el lote LGP-6, mostraron que 15 de las 50 post - larvas estaban infectadas por el mismo virus (Foto 9).

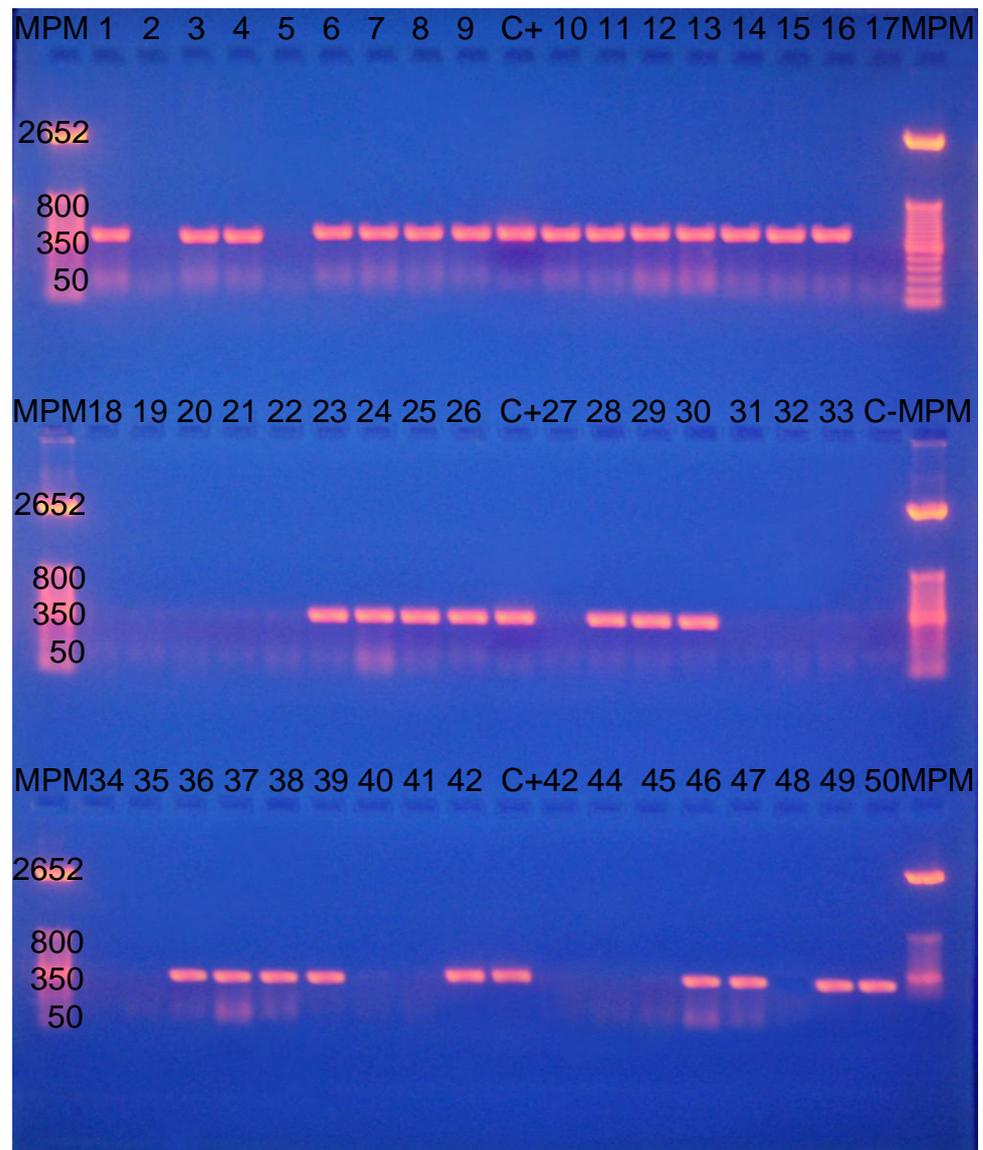


Foto 8. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHNV Lote B-21, Post - larva 14, B2. 1-50: Reacciones de PCR. MPM = Marcador de peso molecular; C+ = Control positivo banda de 345pb. C- = Control negativo (Fuente: R. Marcillo Del C. Ayangue 2.009).

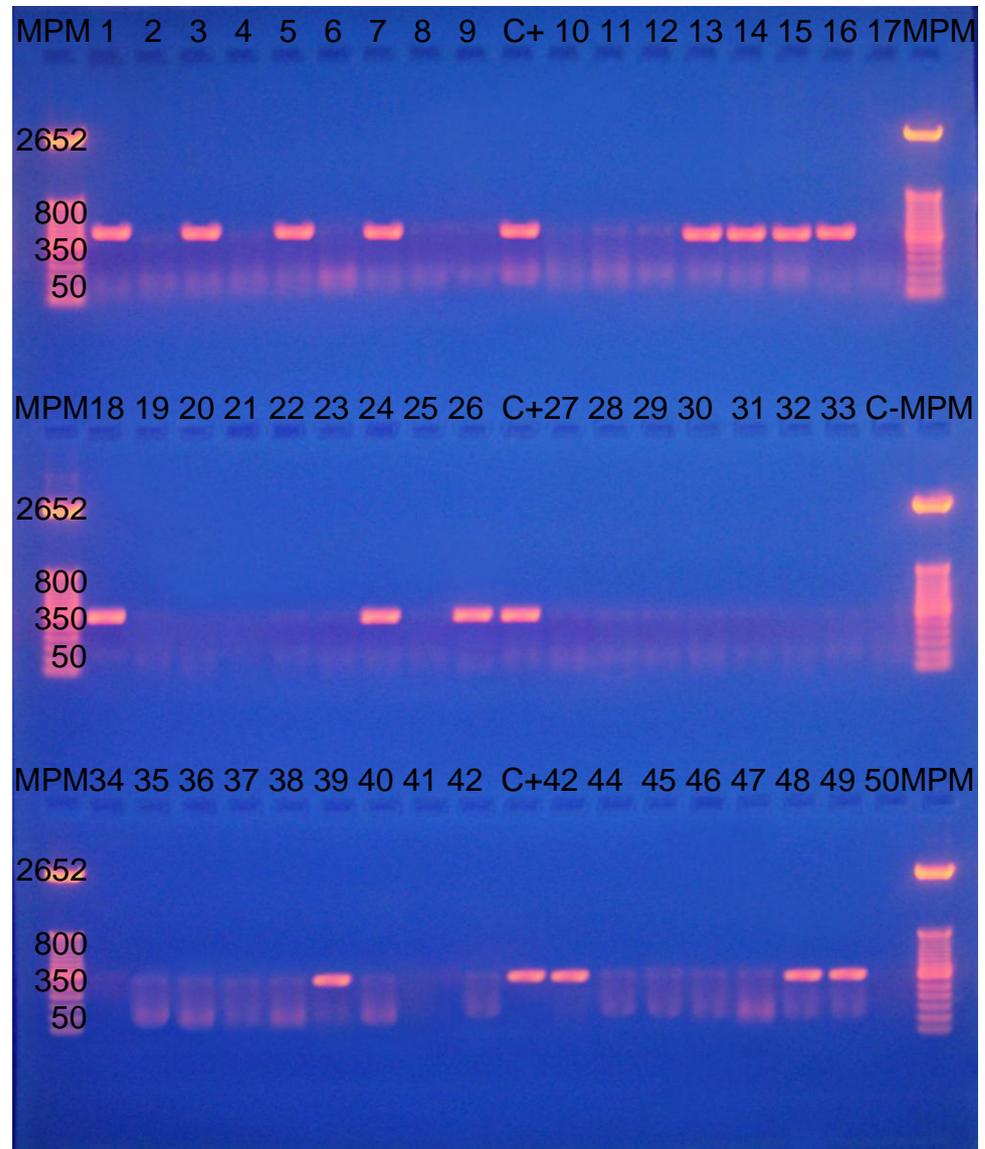


Foto 9. Reacciones de amplificación de PCR reveladas en geles de agarosa 1,2% para la detección de IHHNV lote LGP-6, Post - larva 14, B2. 1-50: Reacciones de PCR. MPM = Marcador de peso molecular; C+ = Control positivo banda de

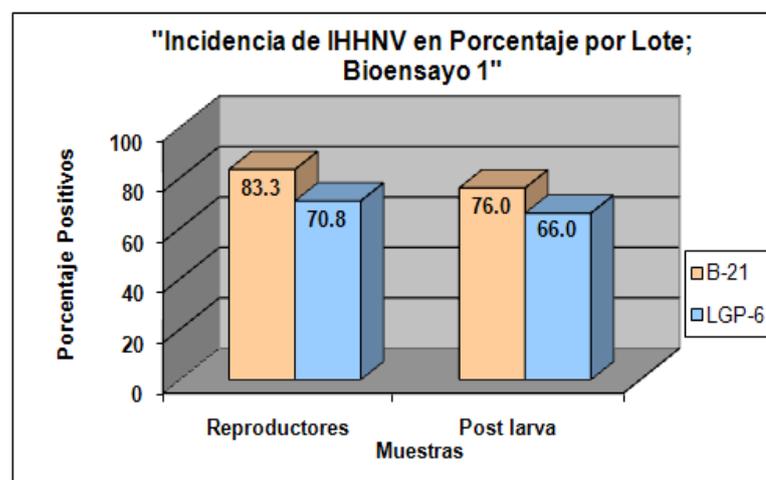
345pb. C- = Control negativo (Fuente: R. Marcillo Del C. Ayangue 2.009).

Basados en estos datos se puede determinar que la prevalencia del IHHNV en esta población de post - larvas 14 se encontraban aproximadamente en el orden del 58% para el lote B-21 y 30% para el lote LGP-6.

3.3 ANALISIS ESTADISTICO

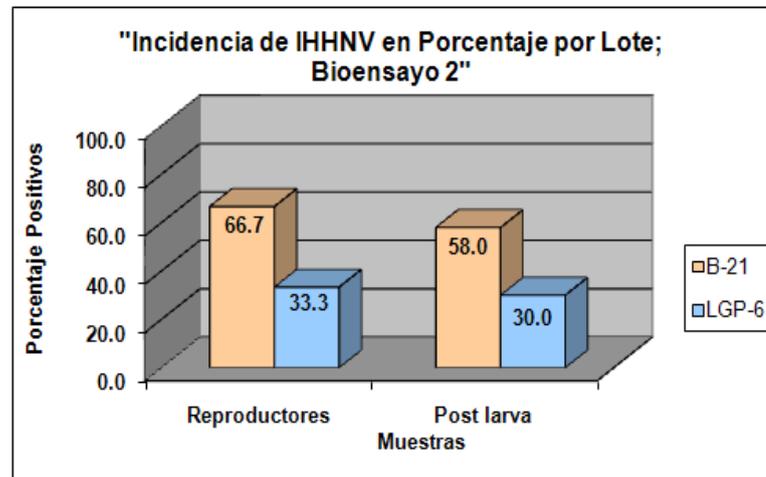
Los resultados obtenidos de la larvicultura realizada en Mar Bravo (Bioensayo 1), como la realizada en San Pablo (Bioensayo 2) se encuentran resumidos en los Gráficos 3 y 4, respectivamente.

Gráfico 3. Prevalencia de IHHNV en porcentaje por lote; Bioensayo 1.



Fuente: R. Marcillo Del C. Ayangue 2.009.

Gráfico 4. Prevalencia de IHHNV en porcentaje por lote; Bioensayo 2.



Fuente: R. Marcillo Del C. Ayangue 2.009.

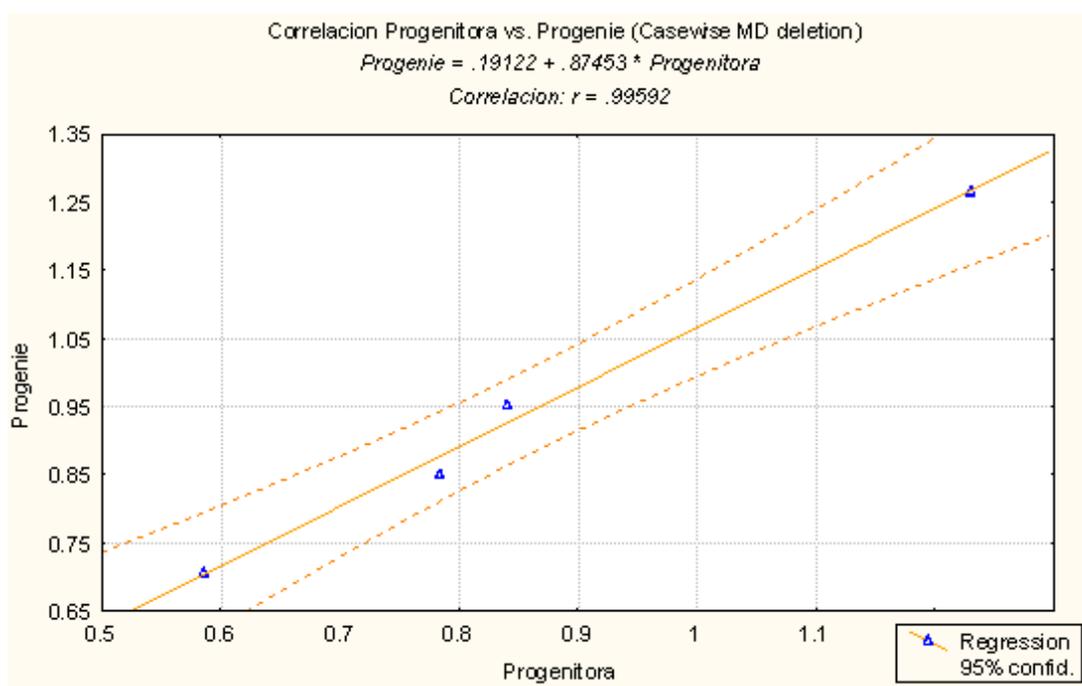
Los datos obtenidos por análisis de PCR simple fueron evaluados en una prueba t de student, para muestras pareadas de variables dependientes, con un nivel de confianza del 95%, en el programa Statistica para Windows, versión 4.3. En el cual, se encontraron diferencias significativas con un $p < .05$ (Gráfico 5).

Gráfico 5. Prueba T, Muestras Paredadas de Variables Dependientes.

T-test for Dependent Samples (new.sta)								
Marked differences are significant at p < .05000								
Variable	Mean	Std. Dev.	N	Diff.	Std. Dev. Diff.	t	df	p
PROG	.860500	.270094						
PL	.943750	.237173	4	-.083250	.040086	-4.15353	3	.025368

Los datos también fueron evaluados para la correlación de Pearson dando un coeficiente de correlación de: $r = .99592$, a un $p < .05$ (Gráfico 6).

Gráfico 6. Correlación Prevalencia Progenitora vs. Prevalencia Progenie para IHHNV.



CAPÍTULO 4.

4.DISCUSION

Ante la demanda sostenida en el ámbito mundial, la camaricultura aporta con un 30% de la producción total de camarón evaluada en 5.2 millones de toneladas [9]. En el Ecuador esta actividad tuvo sus inicios en la década de los años 1.970.

En 40 años de actividad acuícola, el sector se ha visto afectado por pandemias ocasionadas principalmente por agentes virales, esto ha llevado a los productores de este crustáceo:

1. Cerrar el ciclo con la domesticación de la especie;
2. Implementación de programas de mejoramiento genético;

3. Desarrollo de técnicas moleculares, para la detección rápida y oportuna de estos patógenos.

De todas las herramientas moleculares para la detección de agentes etiológicos de infecciones virales, la PCR con su sistema de detección simple, es una de las más utilizadas debido a su especificidad, sensibilidad y costo. No obstante, existen herramientas conjuntas, que han permitido incrementar en especificidad y sensibilidad la detección de IHHNV de animales en estudio [47 y 48].

El objetivo de esta investigación fue determinar, si la prevalencia de IHHNV en progenitoras de un lote estaba íntimamente ligada a la prevalencia de su progenie, en dos sistemas de producción, ubicados en zonas geográficas diferentes.

Para este propósito se determinó la prevalencia en progenitoras y post-larvas 14, de dos lotes con diferencia de producción de 60 días en promedio.

El hecho de haber obtenido mayor prevalencia en el primer bioensayo con respecto al segundo, en ambos lotes, podría derivarse de la “forma no contagiosa supuesta de IHHNV”, sugerido por Dos Santos *et al.*, 2009, y la probable activación del virus podría ser atribuida a elevados niveles de stress al momento del desove. Esto indicaría la presencia de IHHNV en camarones asintomáticos, que son utilizados para su

reproducción, los mismos que son resistentes o en todo caso tolerantes a la infección del virus, lo cual es sugerido por Boada *et al.*, 2.008.

Hay que tener en cuenta que, Lotz, 1.997, indica que la infección de IHNV puede ocurrir por transmisión horizontal con ingestión del camarón infectado muerto o por el contacto con agua donde se encuentren animales infectados.

No obstante, podríamos decir que los resultados obtenidos probablemente sugieren una transmisión vertical, ligada a la prevalencia de las progenitoras respecto a su progenie al momento del desove, ya que se encontraron diferencias significativas con $p < 0.05$ para una prueba *t* de variables dependientes pareadas; corroborando los resultados obtenidos por Motte *et al.*, 2.003.

La presente investigación abre la posibilidad de pensar en una integración del virus en poblaciones de *P. vannamei*, cultivadas en el Ecuador, lo cual ya es sugerido para *P. monodon* [49]; el cual se mantiene latente, hasta que condiciones de estrés y ambientales provocarían su activación, por ende una transmisión vertical a su progenie al momento del desove y que la progenitora es la que mayormente aporta a la misma.

CONCLUSIONES

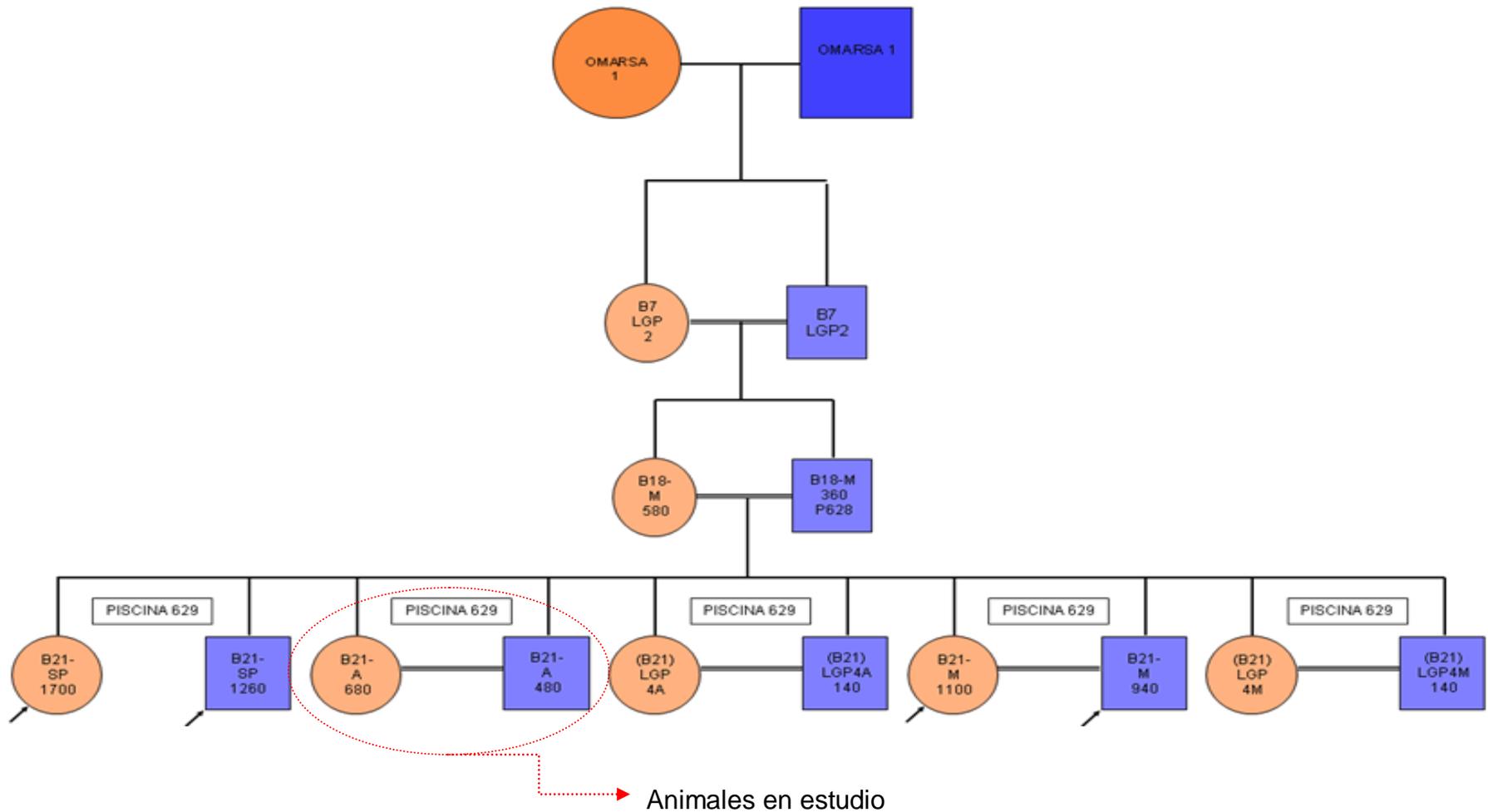
1. Los protocolos de extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa fueron los óptimos, al momento de evaluar el material biológico de estudio.
2. Los datos evidenciados, sugieren que existe una probable relación ($r = 0.99895$) entre la prevalencia de la progenitora, respecto a su progenie, a nivel de post - larvas 14, el cual es el tamaño promedio para su comercialización.
3. Aparentemente el tiempo de permanencia en producción de reproductores no es una probable limitante para la activación del virus, más bien, el estrés al momento del desove lo provocarían.
4. Podríamos decir, que el mayor aporte al mecanismo de transmisión vertical del virus es la progenitora y que existe un relación directa entre el estatus de ésta con respecto a su progenie.

RECOMENDACIONES

1. La prevención de enfermedades virales debería ser una de las prioridades del sector camaronero en el Ecuador, con el desarrollo de programas de mejoramiento genético y de esta manera obtener líneas de progenitores libres de patógenos potencialmente peligrosos para el cultivo de camarón.
2. Se recomienda utilizar métodos más sensibles que podrían hacer a los datos obtenidos más confiables, el utilizar sistemas conjuntos de detección como PCR anidada o Dot Blot/PCR sería aconsejable para incrementar la sensibilidad al momento de análisis de las muestras en estudio.
3. La generación de familias libres de patógenos, debe de ser una de las estrategias de los productores, para minimizar el impacto de las infecciones virales en sus cultivos e incrementar o mantener los rendimientos de los mismos.

Anexos

ANEXO A-1. Árbol Genealógico Lote B-21 a partir del Omarsa 1



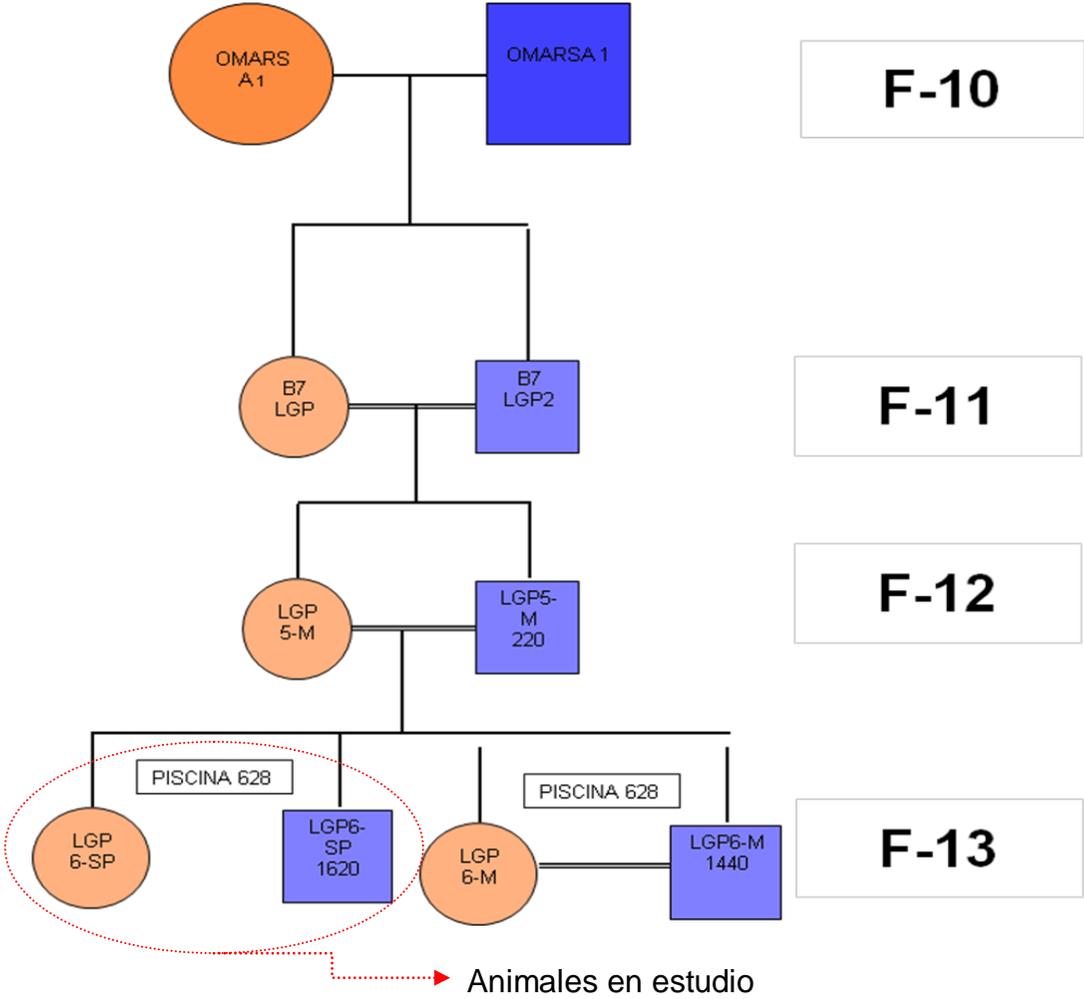
F-10

F-11

F-12

F-13

ANEXO A-2. Árbol Genealógico Lote LGP-6 a partir del Omarsa 1



ANEXO B-1. Resumen General Trazabilidad Lote B-21

1. DATOS GENERALES			
1.1. NOMBRE DE CAMARONERA:	MARSA S. A.	1.2. SECTOR:	VIGSA
1.3. PISCINA(AS) No.:	629	1.4. LOTE:	TQ# 6 F1 - B18 - LGP2(B7) - 01

2. DATOS DE PRODUCCION FASE "A"			
2.1. NOMBRE LAB. DE LARVAS:	IASCA - BIOGEMAR	2.2. PL (edad):	11
2.4. CANTIDAD ADQUIRIDA REAL:	1,700,000	2.3. PL/GRAMO	311
2.6. GUIA DE REMISION No.:	2308	2.5. TIPO DE SIEMBRA:	RACEWAYS <input checked="" type="checkbox"/> PRECRIADERO* <input type="checkbox"/> DIRECTA** <input type="checkbox"/>
2.7. FECHA DE TRANSFERENCIA:	1/20/2008	* PASE AL NUMERAL 2.18. POR FAVOR ** PASE AL NUMERAL 2.27. POR FAVOR	
2.8. # RACEWAYS SEMBRADOS:	2	2.9. RACEWAYS No.:	14 Y 15
2.10. D. DE SIEMBRA (animal/Tq)	850,000	2.11. TIEMPO DE PERMANENCIA (días)	3
2.12. %SUPERVIVENCIA	92.89	2.13. DISPARIEDAD (TALLAS?):	1 2 3 4 5 6 7 8
2.14. PL/GRAMO INICIAL	311		<input type="checkbox"/>
2.15. PL/GRAMO FINAL	250	2.17. TRANSFERENCIA:	PRECRIADERO <input checked="" type="checkbox"/> PISCINA* <input type="checkbox"/>
2.16. FECHA DE TRANSFERENCIA:	1/23/2008	* PASE AL NUMERAL 2.27. POR FAVOR	
2.18. # PRECRIADEROS SEMBRADOS	2	2.19. PRECRIADEROS No.:	739 (1,80Ha) Y 627 (1,53Ha)
2.20. DENSIDAD DE SIEMBRA (animal/Ha)	262,000	2.21. TIEMPO DE PERMANENCIA (días)	17
2.22. FCA	0.8	2.23. %SUPERVIVENCIA	73.87
2.24. PL/GRAMO INICIAL	250	2.25. PESO PROMEDIO FINAL (g)	0.16
		2.26. FECHA DE TRANSFERENCIA	2/19/2008
2.27. # PISCINAS SEMBRADAS	2	2.28. PISCINAS No.:	736 (2,67Ha) y 738 (2,00Ha)
2.29. DENSIDAD DE SIEMBRA (animal/ha)	76,764	2.30. TIEMPO DE PERMANENCIA (días)	117
2.31. FCA	1.10	2.32. %SUPERVIVENCIA	20.16
2.33. PESO PROMEDIO INICIAL (g)	0.16	2.34. PESO PROMEDIO FINAL (g)	22.5
2.35. FECHA COSECHA	3/23/2008	2.36. CANTIDAD COSECHADA (lb/ha)	722.50

3. DATOS DE PRODUCCION FASE "B"			
3.1. # PISCINAS SEMBRADAS	1	3.2. PISCINAS No.:	629 (1,47Ha)
3.3. DENSIDAD DE SIEMBRA (animal/ha)	7,143	3.4. TIEMPO DE PERMANENCIA (días)	54
3.5. FCA	1.5	3.6. %SUPERVIVENCIA	76
3.7. PESO PROMEDIO INICIAL (g)	22.5	3.8. PESO PROMEDIO FINAL (g)	32

4. DATOS DE COSECHA			
4.1. FECHA COSECHA	7/29/2008	4.2. HORA DE INICIO	18:00
4.3. EDAD (meses)	6 meses 1 semana	4.4. PISCINA (ss)#	629
4.5. # HEMBRAS	1,600	4.6. PESO PROMEDIO HEMBRAS	33
4.7. # MACHOS	1,260	4.8. PESO PROMEDIO MACHOS	31
4.9. # TOTAL REPRODUCTORES	2,860	4.10. PESO PROMEDIO POBLACION	32

ANEXO B-2. Resumen General Trazabilidad Lote LGP-6

1. DATOS GENERALES			
1.1. NOMBRE DE CAMARONERA:	MARSA S. A.	1.2. SECTOR:	VIGSA
1.3. PISCINA(S) No.:	628	1.4. LOTE:	TQ# 5 F1 - LGP5 - LGP2(B7) - 01

2. DATOS DE PRODUCCION FASE "A"			
2.1. NOMBRE LAB. DE LARVAS:	MASCA - BIOGEMAR	2.2. PL (edad):	12
2.3. PL/GRAMO		2.4. CANTIDAD ADQUIRIDA REAL:	315
2.5. TIPO DE SIEMBRA:	RACEWAYS <input type="checkbox"/> PRECRIADERO* <input type="checkbox"/> DIRECTA** <input type="checkbox"/>	2.6. GUIA DE REMISION No.:	2385
2.7. FECHA DE TRANSFERENCIA:	2/22/2008	* PASE AL NUMERAL 2.18. POR FAVOR ** PASE AL NUMERAL 2.27. POR FAVOR	
2.8. # RACEWAYS SEMBRADOS:	1	2.9. RACEWAYS No.:	11
2.10. D. DE SIEMBRA (animal/Tq)	315,000	2.11. TIEMPO DE PERMANENCIA (días)	10
2.12. %SUPERVIVENCIA	62.08	2.13. DISPAREIDAD (TALLAS?):	1 2 3 4 5 6 7 8
2.14. PL/GRAMO INICIAL	140		<input type="checkbox"/>
2.15. PL/GRAMO FINAL	50	2.17. TRANSFERENCIA:	PRECRIADERO <input type="checkbox"/> PISCINA* <input checked="" type="checkbox"/>
2.16. FECHA DE TRANSFERENCIA:	3/3/2008	* PASE AL NUMERAL 2.27. POR FAVOR	
2.18. # PRECRIADEROS SEMBRADOS	NA	2.19. PRECRIADEROS No.:	NA
2.20. DENSIDAD DE SIEMBRA (animal/Ha)	NA	2.21. TIEMPO DE PERMANENCIA (días)	NA
2.22. FCA	NA	2.23. %SUPERVIVENCIA	NA
2.24. PL/GRAMO INICIAL	NA	2.25. PESO PROMEDIO FINAL (q)	NA
2.26. FECHA DE TRANSFERENCIA	NA		
2.27. # PISCINAS SEMBRADAS	2	2.28. PISCINAS No.:	530 (2,00Ha) y 627 (1,53Ha)
2.29. DENSIDAD DE SIEMBRA (animal/ha)	48,653	2.30. TIEMPO DE PERMANENCIA (días)	158
2.31. FCA		2.32. %SUPERVIVENCIA	
2.33. PESO PROMEDIO INICIAL (q)	0.02	2.34. PESO PROMEDIO FINAL (q)	
2.35. FECHA COSECHA	8/8/2008	2.36. CANTIDAD COSECHADA (lb/ha)	

3. DATOS DE PRODUCCION FASE "B"			
3.1. # PISCINAS SEMBRADAS	1	3.2. PISCINAS No.:	628 (1,67Ha)
3.3. DENSIDAD DE SIEMBRA (animal/ha)	6,563	3.4. TIEMPO DE PERMANENCIA (días)	45
3.5. FCA	1.5	3.6. %SUPERVIVENCIA	91.9
3.7. PESO PROMEDIO INICIAL (q)	24	3.8. PESO PROMEDIO FINAL (q)	36

4. DATOS DE COSECHA			
4.1. FECHA COSECHA	9/21/2008	4.2. HORA DE INICIO	17:00
4.3. EDAD (meses)	7 meses	4.4. PISCINA (s)#	628
4.5. # HEMBRAS	1,340	4.6. PESO PROMEDIO HEMBRAS	38
4.7. # MACHOS	1,620	4.8. PESO PROMEDIO MACHOS	34
4.9. # TOTAL REPRODUCTORES	3,560	4.10. PESO PROMEDIO POBLACION	36

ANEXO C. Tabla Alimentación Larviculturas

TABLA DE ALIMENTACION

CORRIDA ORGANICA VIII - 2008				DEL: 22 Y23 agosto 2008				AL: 9 - 16 septiembre 2008				FASE I Y FASE II								
Alimento Artificial gramos/millón de larvas																Alimento Natural				
																Artemia n/animal	cell/ml			
	Spirulina M	Lancz Spir	Lancz Spir	Lancz ZM	Lancz Spir	Lancz MPL	Lancz MPL	Lancz MPL	Flake	Flake	Flake	Flake	Flake	Flake	Nutrilarva	Epibal	nutrilarva	A. cong	A. viva	Thalassiosira
	LHF 1				AP100-150	AP100-150	AP100-150	Epac PI	Epac PI	Epac PI	Nutrilarva	Epibal	Nutrilarva	Epibal						
1	Z1	2																		60,000
2	Z2	4																15		80,000
3	Z3		5															20		80,000
4	M1			6.3														30		80,000
5	M2				7.9													50		100,000
6	M3					10												50		100,000
7	M3/P11					15												50		100,000
8	P11							21											70	100,000
9	P12								30										100	100,000
10	P13										42								120	100,000
11	P14										59								150	100,000
12	P15											70							175	100,000
13	P16											80							175	100,000
14	P17																85		175	100,000
15	P18																95		175	100,000
16	P19																105		175	100,000
17	P110																115		175	100,000
18	P111																125		175	100,000
19	P112																135		175	100,000
20	P113																145		175	100,000
21	P114																155		175	100,000
T. INORG.		6	5	6.3	7.9	25	21	30	101	150	960									
T. ORG.																			8208	806

BIBLIOGRAFÍA

1. Lightner D. V., R. M. Readman, B. T. Poulos, L. M. Numan, J. L. Mari and K. W. Asno. 1996. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. Review of science and technology of the office of international epizootics. 16 (1): 146-160.
2. Nieto J. 2003. El reto de la industria camaronera para el siglo 21. Nuevas técnicas para el manejo sostenible. Investigación & Desarrollo, órgano de difusión del centro de Investigación Científico y Tecnológico de la ESPOL. Revista Informativa. ESPOL. 20-24.
3. Argue B., Arce S., Lotz J., Moss S. 2002. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaesus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. Aquaculture. 204: 447-460.

4. Pérez F. 2003. Desarrollo de marcadores moleculares tipo microsatélite en camarón *Litopenaeus vannamei* para mejoramiento genético. CENAIM INFORMA. No. 92.
5. Bierne N., Bezart I., Vonau V., Bonhomme F., Bédier E. 1999. Microsatellite-Associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 184: 203-219.
6. Lightner D. V. (1996) A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Peneid Shrimp. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A.
7. Kalagayan H., Godin D., Kanna R., Hagino G., Sweeney J., Wiban J., and Brock J. 1991. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquacult. Soc.* 22, 235-243.
8. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. Abril 2003. Resumen Informativo sobre la Pesca por Países.
9. De la Rosa Vélez Jorge and Bonami Jean Robert, (2006) Detección Molecular de enfermedades virales que afectan el desarrollo del cultivo de camarón. *Hidrobiológica* 3, 275-293.

10. Cámara Nacional de Acuicultura. 1998. Revista de la Cámara Acuicultura en el Ecuador 26: 4-10
11. "Desarrollo y problemática ambiental del área del Golfo de Guayaquil", Comisión Asesora Ambiental de la Presidencia de la Republica del Ecuador, 1.996.
12. Proyecto de Asistencia para el Manejo Sanitario del Cultivo de Camarón en América Latina, FAO – CENAIM/Gobierno del Ecuador, 2002.
13. Estadísticas exportaciones de camarón periodo 1.990 a 2.009, Estadística 2.010, CNA, 2.010.
14. "Análisis de una Traumática Experiencia: El WSSV en Ecuador", Jorge Calderón V., Ph. D., Fundación CENAIM – ESPOL, 2001.
15. Hasson, K.W., Lightner, D.V., Poulos, B.T., Redman, R.M., White, B.L., Brock, J.A. & Bonami, J.R. 1.995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. Diseases of Aquatic Organisms 23, 115±126.

16. Brock, J.A., Gose, R., Lightner, D.V. & Hasson, K. 1995. An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. In Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, pp. 84±94. Edited by C. L. Browdy & J. S. Hopkins. Baton Rouge: World Aquaculture Society.
17. Poulos, B.T., Lightner, D.V. 1992. Recent developments in penaeid virology: Biotechnology applications for disease diagnosis of shrimp viruses of concern in Mexico and the Americas.
18. Bonami J. R., Trumper B., Mary J., Brehelin M., and Lightner D. V., 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. J. Gen. Virol. 71, 2657 – 2654.
19. Tattersall, P., Bergoin, M., Boom, M.E., Brown, K.E., Linden, R.M., Muzycska, N., Parrish, C.R., Tijssen, P., 2005. Family Parvoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 353–369.

20. Lightner, D., Redman, R., Bell, T., Brock, J. 1983a. Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J World Maric Soc*, 14: 221-225.
21. Tang K.F.J. & 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, 93-97.
22. Lotz, J.M., Overstreet, R.M., Lightner, D.V., and Redman, R.M. 1989. Occurrence of IHHN virus in penaeid shrimp from wild populations of the eastern Pacific Ocean. *World Aquaculture Soc.*, 22nd Annual Conf. and Expo. Program and Abstracts. 40.
23. Lightner, D.V., Redman, R.M. 1991. Hosts, geographic range and diagnostic procedures for the penaeid viruses of concern to shrimp culturist in the Americas. In: P. De Loach, W. I. Dougherty and M.A. Davison (eds.), *Frontiers of Shrimp research*. Elsevier, pp. 173-196.
24. Lightner, D.V., Redman, R.M. 1992. Penaeid virus diseases of the shrimp culture industry of the Americas. Chapter 26. In: A. W. Fast and L. J. Lesters (eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier, 569-588.

25. Brock, J.A., Lightner, D.V. and Bell, T.A. 1.983. A review of four viruses (BP, MBV, BMN and IHHN). Diseases of penaeid shrimp with particular reference of clinical significance, diagnosis and control in shrimp aquaculture. Proc. 71st Intl. Council for the Exploration of the Sea. C.M. 1.983/Gen: 10/1-8.
26. Bell T. A., and Lightner D. V., 1984. IHHNV virus: Infectivity and Pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. Aquaculture 38, 185 – 194.
27. Brock, J.A. and Lightner, D.V. 1.990. Diseases of Crustacea. Diseases caused by microorganism. In: O. Kinne (ed.). Diseases of Marine Animals. Vol. 3. John Wiley. New York. Pp. 245-349.
28. Lightner, D.V. 1.992. Shrimp virus diseases: Diagnosis, distribution and management. In; J. Wyban (ed.), Proc. Special Session on Shrimp Farming World Aquaculture Soc., Baton Rouge, pp 238-253.
29. Boada, M., De Donato, M. y Rodulfo, H. 2.008. Detección del virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV) en camarones blancos cultivados asintomáticos, *litopenaeus vannamei* (boone), en Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XVIII, N° 1, 7 – 11.

30. Dos Santos, R.F., Rodrigues, C.P., Garcia, L., Cunha, P.C., Pereira, M., Vasconcelos, R. 2009. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus vannamei* cultured in northeastern Brazil. *Aquaculture* 288 (2009) 143–146.
31. Lotz, J.M., 1997. Special topic review: viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 405–413.
32. Motte E., Yugcha E., Luzardo J., Castro F., Leclercq G., Rodriguez J., Miranda P., Borja O., Serrano J., Terreros M., Montalvo K., Narvaez A., Tenorio N., Cedeño V., Mialhe E., Boulo V., 2003. Prevention of IHHNV vertical transmission in the White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 219, 57-70.
33. Bray, W.A., Lawrence, A.L. & Leung-Trujillo, J.R. (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture*, 122, 133–146.

34. Lightner, D.V. (ED.) (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304pp.
35. Pruder, G.D., Brown, C.L., Sweeney, J.N. & Carr, W.H. (1995). High health shrimp systems: seed supply – theory and practice. *En: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 40–52.
36. Primavera, J.H. & Qunitio, E.T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Crustacean Biol.*, 20, 796–802.
37. Carr, W.H., Sweeney, J.N., Nunan, L., Lightner, D.V., Hirsch, H.H. & Reddington, J.J. (1996). The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, 147, 1–8.

38. Lightner, D.V. and R. M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. 164: 201 – 220.
39. Yang B., Song X-L., Huang J., Shi C-Y., Liu Q-H. and Liu L., 2006. A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Journal of Diseases* 29, 301-305.
40. Numan, L.M., Poulos, B.T. & LIGHTNER D.V. 2000. Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, 2, 319–328.
41. Lightner D.V. y Pantoja C.R., 2001. Bioseguridad en el cultivo de camarones. Centro de Investigacion de Ecosistemas Acuaticos (CIDEA).
42. Lightner D.V., R. M. Redman, B.T. Poulos, L.M. Numan, J.L. Mari and K.W. Asno. 1996. *Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp*. Review of science and technology of the Office of International Epizootics. 16 (1): 146-160.

43. Dhar Arun K., Roux Michelle M., and Klimpel Kurt R., 2001. Detection and Quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus and White Spot Virus in Shrimp Using Real – Time Quantitative PCR and SYBER Green Chemistry. *Journal of Clinical Microbiology*, 2835-2845.
44. Tang, K.F.J. & 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, 93-97.
45. Yang B., Song X-L., Huang J., Shi C-Y., Liu Q-H. and Liu L., 2006. A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Journal of Diseases* 29, 301-305.
46. Zhao-Feng Sun, Chao-Qun Hu, Chun-Hua Ren, Qi Shen (2006). Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 131, 41-46.

47. Veloz, N. (2008) Desarrollo de un sistema anidado para la detección del virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) en la especie *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Grado, ESPOL.
48. Castro, J. (2009) Desarrollo y Análisis del Sistema Conjunto PCR/Dot Blot para la Detección del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa. Tesis de Grado, ESPOL.
49. Withyachumnarnkul, B., Chayaburakul, K., Lao-Aroon, S., Plodpai, P., Sritunyalucksana, K., Nash, G. (2006) Low impact of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) on growth and reproductive performance of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **69**: 129-136.