



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR



ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA ACUÍCOLA

TESIS DE PREGRADO

**Presencia de IMNV, IHNV y VP_{AHPND} en langostinos
silvestres del género *Litopenaeus* en Tumbes**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO PESQUERO

PRESENTADO POR:

Br. LUIS ALFREDO CALDERÓN ROMERO

TUMBES-PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR



ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA ACUÍCOLA

TESIS DE PREGRADO

**Presencia de IMNV, IHNV y VP_{AHPND} en langostinos
silvestres del género *Litopenaeus* en Tumbes**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO PESQUERO

PRESENTADO POR:

Br. LUIS ALFREDO CALDERÓN ROMERO

TUMBES-PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR



ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA ACUÍCOLA

TESIS DE PREGRADO

**Presencia de IMNV, IHNV y VP_{AHPND} en langostinos
silvestres del género *Litopenaeus* en Tumbes**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO PESQUERO

PRESENTADO POR:

Br. LUIS ALFREDO CALDERÓN ROMERO

TUMBES-PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR



ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA ACUÍCOLA

TESIS DE PREGRADO

**Presencia de IMNV, IHNV y VP_{AHPND} en langostinos
silvestres del género *Litopenaeus* en Tumbes**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO PESQUERO

PRESENTADO POR:

Br. Luis Alfredo Calderón Romero

Ejecutor

Dra. Tessy Peralta Ortiz

Docente Asesor

TUMBES-PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR



ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA ACUÍCOLA

TESIS DE PREGRADO

**Presencia de IMNV, IHNV y VP_{AHPND} en langostinos
silvestres del género *Litopenaeus* en Tumbes**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO PESQUERO

JURADO EVALUADOR:

M.Sc. César Estuardo Poma Sánchez

Presidente del Jurado

Dr. Teodoro Emilio Seminario Chirinos

Secretario del Jurado

Mg. Jorge Humberto Carrasco Casariego

Vocal del Jurado

TUMBES-PERÚ

2019

AGRADECIMIENTO

Al Organismo Nacional de Sanidad Pesquera – Sanipes y al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - INNOVATE PERU por permitirme desarrollar la investigación dentro del proyecto denominado "Reforzamiento de la vigilancia sanitaria para la prevención y control de agentes infecciosos causantes de enfermedades en langostinos del género *Litopenaeus* procedentes de cultivo y áreas naturales de la zona de Tumbes y Piura, en el Perú", Convenio N° 374-PNICP-PIAP.

El autor

DEDICATORIA

A mi madre Nilda Narcisa Romero Coronado, abuela Nélida Coronado Calero y abuelo Luis Alberto Romero Coello, por su amor infinito.

Y tener presente que “para una vida más liviana, más juguetona, hay que ser flexible. Hay que recordar que la libertad es el valor más alto y que si el amor no te está brindando libertad, entonces no es amor”.

Br. Luis Alfredo Calderón Romero

TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	13
Abstract.....	14
1. Introducción.....	15
2. Antecedentes.....	17
3. Material y Métodos.....	22
3.1. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	22
3.2. Población, muestra y muestreo.....	22
3.3. Método, técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	23
3.4. Procesamiento y análisis de datos.....	28
4. Resultados.....	29
4.1. Especies identificadas.....	29
4.2. Canales de marea y total de ejemplares capturados.....	29
4.3. Características individuales de las muestras.....	31
4.4. Parámetros físicos del agua: temperatura (°C) y salinidad (ppt).....	33
4.5. Muestreo 1. Mayo.....	33
4.6. Muestreo 2. Junio.....	34
4.7. Muestreo 3. setiembre.....	35
4.8. Muestreo 4. noviembre.....	37
4.9. Síntesis de los datos obtenidos.....	38
5. Discusión.....	41
6. Conclusiones.....	44
7. Recomendaciones.....	45
8. Referencias bibliográficas.....	46
Anexos.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de ejemplares colectados y coordenadas geográficas por estación de muestreo.	23
Tabla 2. Número total de ejemplares colectados y muestras compuestas obtenidas por cada agente patógeno en estudio, 2017.....	25
Tabla 3. Cebadores específicos para cada enfermedad y productos de amplificación de la PCR.....	27
Tabla 4. Características morfológicas de los langostinos silvestres extraídos de los canales de marea, 2017.	32
Tabla 5. Parámetros físicos del agua: temperatura (°C) y salinidad (ppt) por estación de muestreo de Tumbes, de mayo a noviembre del 2017.	33
Tabla 6. Prevalencia de infección en langostinos silvestres <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i> capturados en los canales de marea de Tumbes en el mes de mayo del 2017.....	34
Tabla 7. Prevalencia de infección en langostinos silvestres <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i> capturados en los canales de marea de Tumbes en el mes de junio del 2017.....	35
Tabla 8. Prevalencia de infección en langostinos silvestres <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i> capturados en los canales de marea de Tumbes en el mes de setiembre del 2017.....	36
Tabla 9. Prevalencia de infección en langostinos silvestres de <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i> capturados en los canales de marea de Tumbes en el mes de noviembre del 2017.....	37
Tabla 10. Prevalencia de cada agente patógenos en estudio, por estación de muestreo.....	39
Tabla 11. Prevalencia de cada agente patógeno en estudio, según estación de muestreo. En 2017.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Extracción de pleópodos en <i>L. vannamei</i> para la detección de IHHNV.	24
Figura 2. Ejemplares de langostinos silvestres: <i>L. stylirostris</i> (izquierda) y <i>L. vannamei</i> (derecha).	29
Figura 3. Ubicación de las estaciones de muestreo en estudio.....	30
Figura 4. (a) Ejemplar de langostino silvestre: <i>L. stylirostris</i> el cual fue examinado en el laboratorio presentando pleópodos de coloración amarilla y (b) urópodos con coloración rojiza leve.....	31
Figura 5. Relación entre las prevalencias de agentes patógenos en <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i> respecto a las temperaturas (°C) y salinidad (ppt) según los canales de marea: Boca del Río (BRT), Alcalde (AL), Jelí (J), Bendito (B), Soledad (S), Algarrobo (AG) y Envidia (E). Mayo 2017.	34
Figura 6. Relación entre las prevalencias de agentes patógenos en <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i> respecto a las temperaturas (°C) y salinidad (ppt) según los canales de marea: Boca del Río (BRT), Alcalde (AL), Jelí (J), Bendito (B), Soledad (S), Algarrobo (AG) y Envidia (E). Junio 2017.	35
Figura 7. Relación entre las prevalencias de agentes patógenos en <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i> respecto a las temperaturas (°C) y salinidad (ppt) según los canales de marea: Boca del Río (BRT), Alcalde (AL), Jelí (J), Bendito (B), Soledad (S), Algarrobo (AG) y Envidia (E). Setiembre 2017.....	36
Figura 8. Relación entre las prevalencias de agentes patógenos en <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i> respecto a las temperaturas (°C) y salinidad (ppt) según los canales de marea: Boca del Río (BRT), Alcalde (AL), Jelí (J), Bendito (B), Soledad (S), Algarrobo (AG) y Envidia (E). Noviembre 2017.....	38
Figura 9. Prevalencia de cada agente patógenos en estudio, salinidad (ppt) y temperatura (°C) promedio, por estación de muestreo.....	39
Figura 10. Prevalencia de cada agente patógeno en estudio y temperaturas promedio (°C), de mayo a noviembre del 2017.	40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Reaccion en cadena de la Polimerasa (PCR).	51
---	----

Presencia de IMNV, IHHNV y VP_{AHPND} en langostinos silvestres del género *Litopenaeus* en Tumbes.

Br. Luis Alfredo Calderón Romero¹
Dra. Tessy Peralta Ortiz²

RESUMEN

Se estudió la prevalencia del virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV), el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) y del *Vibrio parahaemolyticus* que causa la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda-AHPND (VP_{AHPND}) en *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris* procedentes de los siguientes canales de marea de la región Tumbes, Perú: La Boca del Río Tumbes, El Alcalde, El Jelí, El Bendito, La Envidia, La Soledad y El Algarrobo. En los cuales se efectuaron muestreos mensuales en mayo, junio, setiembre y noviembre del 2017, capturándose un total de 560 ejemplares (372 *L. vannamei* y 188 *L. stylirostris*) de 3,30 a 10,00 cm de longitud utilizando una atarraya de 1,22 cm de longitud de malla. Se extrajo pleópodos, músculo y hepatopáncreas para realizar la extracción de ADN/ARN, posteriormente se realizó la PCR detectándose los patógenos IHHNV y VP_{AHPND} con prevalencias de 7,58% y 3,51%, respectivamente. Así mismo, en todos los canales de marea de la región Tumbes las prevalencias oscilaron entre 2,80 a 12,11% para IHHNV y 1,42 a 5,90% en VP_{AHPND} en rangos de salinidades de 5 a 39 ppt y a temperaturas de 22,8 a 29,0 °C.

Palabras clave: IHHNV, IMNV, VP_{AHPND}, *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*.

¹ Bachiller de la Escuela de Ingeniería Pesquera Acuícola de la Universidad Nacional de Tumbes.

² Docente de la Escuela de Ingeniería Pesquera Acuícola de la Universidad Nacional de Tumbes.

Tesis presentada para obtener el título profesional de Ingeniero Pesquero
Universidad Nacional de Tumbes
Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar
Escuela Académica Profesional de Ingeniería Pesquera Acuícola
Calle Los Ceibos S/N Puerto Pizarro, Tumbes-Perú
e-mail: alfredo_14rc@hotmail.com
Presentado a OGI en enero del 2017.

Presence of IMNV, IHHNV and VP_{AHPND} in wild shrimp of the genus *Litopenaeus* in Tumbes.

Br. Luis Alfredo Calderón Romero¹

Dra. Tessie Peralta Ortiz²

ABSTRACT

The present research is about IMNV (infectious myonecrosis virus), IHHNV (infectious hypodermic, hematopoietic necrosis virus) and *Vibrio parahaemolyticus* in *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus stylirostris* that can cause acute hepatopancreatic necrosis-AHPND disease (VP_{AHPND}) this research has been made from the tidal channels of Tumbes like, Perú: La Boca del Río Tumbes, El Alcalde, El Jelí, El Bendito, La Envidia, La Soledad y El Algarrobo. In which monthly samplings were carried out in May, June, September and November of 2017, capturing a total of 560 specimens (372 *L. vannamei* and 188 *L. stylirostris*) of 3,30 to 10,00 cm in length using a slip of 1,22 cm mesh length. Pleópodos, muscle and hepatopancreas were extracted to perform the DNA / RNA extraction, subsequently the PCR was performed detecting the pathogens IHHNV and VP_{AHPND} with prevalences of 7,58% and 3,51%, respectively. Likewise, in all the tidal channels of the Tumbes region the prevalences ranged from 2,80 to 12,11% for IHHNV and 1,42 to 5,90% in VP_{AHPND} in salinity ranges from 5 to 39 ppt and at temperatures of 22,8 at 29,0 ° C.

Keywords: IHHNV, IMNV, VP_{AHPND}, *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*.

¹ Bachelor of the School of Aquaculture Fisheries Engineering of the National University of Tumbes.

² Teacher of the School of Aquaculture Fisheries Engineering of the National University of Tumbes.

Thesis presented to obtain the professional title of Fisheries Engineer
National University of Tumbes
Faculty of Fisheries Engineering and Marine Sciences
Professional Academic School of Aquaculture Fisheries Engineering
Los Ceibos Street S / N Puerto Pizarro, Tumbes-Perú
e-mail: alfredo_14rc@hotmail.com
Presented to OGI in January 2017.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de langostino es una de las actividades económicas más importantes del norte del país; siendo Tumbes el mayor productor con más del 89% de la cosecha de langostino del país (Ministerio de la Producción 2017). Sin embargo, la intensificación del cultivo caracterizado por el incremento de las densidades de siembra, excesos en el empleo de alimento e insumos ha generado la aparición de enfermedades, poniendo en peligro las poblaciones de langostinos silvestres y de cultivo. Además, los langostinos silvestres pueden ser vectores de importantes agentes patógenos para los cultivos y viceversa (Alfaro y Guevara 2011). Por ende, el estudio de los patógenos seleccionados en esta investigación es de suma importancia porque permiten conocer sus prevalencias en la región Tumbes, las que podrían ocasionar altas mortalidades en el cultivo de langostino, generando pérdidas económicas, afectando además a poblaciones naturales de langostino y su rápida propagación en sistemas de cultivo.

Entre estos patógenos el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV) y el *Vibrio parahaemolyticus* (VP_{AHPND}) causante de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) son considerados de relevancia ya que perjudican el sector acuícola.

Según Lightner (2011), el IHHNV fue descrito por primera vez en Hawai en 1981 causando pérdidas económicas entre 0,5 a 1,0 billón de dólares; este agente patógeno es endémico de las poblaciones de langostinos silvestres de la región Tumbes (Alfaro, Guevara y Gonzales 2010), manifestándose con deformidad cuticular y crecimiento negativo del langostino “síndrome de la deformidad y del enanismo” (RDS) (Cuéllar-Anjel 2008).

El IMNV ocasionó pérdidas de 100 a 200 millones de dólares en Brasil en el 2004, es un patógeno que se caracteriza por producir necrosis en el músculo estriado del abdomen y cefalotórax conllevando a mortalidades progresivas del 40 a 70%, pudiendo llegar hasta 100% (Poulos et al. 2006).

El VP_{AHPND} registrado en Asia el 2009 ha causado pérdidas económicas por un valor de 350 millones de dólares (Lightner 2012), originalmente conocida como “Early Mortality Syndrome” (EMS por sus siglas en inglés) o Síndrome de la mortalidad

temprana, debido a que producía mortalidades súbitas y masivas (de hasta el 100%) de langostino entre los 10 a 30 días de cultivo, sus signos clínicos son: nado errático, crecimiento reducido, textura blanda del exoesqueleto, anorexia y contenido intestinal interrumpido, fuerte atrofia y palidez del hepatopáncreas (Tran et al. 2013).

En el Perú IMNV y VP_{AHPND} aún no han sido reportados, sin embargo, que no se hayan reportado aún, no pierde importancia de realizarles seguimientos sanitarios para prevenir al sector de algún brote.

Cabe resaltar que, las epidemias registradas en los sistemas de cultivo no se han observado en poblaciones silvestres ya que su identificación en el medio natural es bastante difícil debido a que, cuando ocurren estos eventos se localizan en zonas con baja densidades de organismos susceptibles.

Por lo expuesto, este trabajo permitió determinar la presencia de IHHNV, IMNV y VP_{AHPND}, en langostinos silvestres del género *Litopenaeus* en ambientes naturales aledañas a las áreas de producción acuícola de Tumbes: canal de marea El Bendito, El Algarrobo, Envidia, Boca del Río Tumbes, Alcalde, Jelí y Soledad, las que se relacionan con altas pérdidas de producción en el sector acuícola y la rápida propagación de estos patógenos al medio natural.

2. ANTECEDENTES

La acuicultura representa un importante sector de la producción alimentaria mundial (Moreno 2010), teniendo gran realce la actividad langostinera con volúmenes de producción crecientes, siendo los mayores productores Asia y América. En el Perú, la producción de langostino se realiza en las regiones de Tumbes y Piura por reunir las condiciones apropiadas para el cultivo de esta especie (Mendoza 2011). Sin embargo, la búsqueda de mejores rendimientos ha conducido a intensificar la actividad langostinera, propiciando la transmisión de agentes patógenos con consecuencias devastadoras (Rodríguez y Le Moullac 2000).

Cabe resaltar que, los Penstildensovirus, Totivirus y *Vibrio parahaemolyticus* con plásmido *Pir*, que se encuentran en prevalencias muy bajas en poblaciones silvestres, puede poner en riesgo el estatus sanitario de *L. vannamei* y *L. stylirostris* de cultivo debido al estrés producto de las altas densidades de población, fluctuaciones de temperatura, salinidad y nutrientes que alteran la calidad del agua del cultivo (Grant & Jones 2010).

Alfaro y Guevara (2011), indican que las prevalencias de los patógenos virales y bacterianos en langostinos silvestres van aumentando cada año. Lo que hace referencia a la amenaza en que se encuentra el sector acuícola, debido a su intensificación y a la mala práctica de algunas empresas acuícolas que vierten sus efluentes directamente al medio natural afectando de una y otra manera a la fauna silvestre. Otra causa de transferencia de agentes infecciosos es dada por la importación de postlarvas de langostino vivos con presencia de éstos patógenos (OIE 2017, Guevara y Alfaro 2012).

En Tumbes, se han descrito las especies *L. vannamei*, *L. stylirostris* y *Farfantepenaeus californiensis* como langostinos nativos del ecosistema de los manglares (Alfaro y Guevara 2011). El ciclo vital de los peneidos consiste en dos fases: marina y estuarina donde la puesta tiene lugar en el mar; las larvas y primeras postlarvas son planctónicas. Las postlarvas penetran en estuarios y canales de marea o se aproximan a la costa. Los langostinos regresan al mar cuando alcanzan una talla de 10 cm, terminando ahí su ciclo (García y Le Reste 1986).

Hoy en día, se han descrito alrededor de 20 virus que afectan de manera directa o indirecta a langostinos peneidos (Cuéllar-Anjel et al., 2008). Los más reportados son: el virus del síndrome de Taura (TSV), virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), virus de la cabeza amarilla (YHV), virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV) y el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), reportadas por los fuertes impactos sociales además de cuantiosas pérdidas económicas (Godínez et al. 2012).

IMNV perteneciente a la familia *Totiviridae*. Este virus cuenta con una única molécula de ARN de doble cadena (ARNbc), presenta un tamaño de 40 nm y su genoma consta de 75,6 Kb (Lightner 2011).

La especie más susceptible a IMNV es *L. vannamei* y los organismos infectados muestran áreas necróticas de color blanquecino del músculo estriado o en algunos casos rojo (Poulos and Lightner 2006). También, se demostró experimentalmente que las especies *L. stylirostris* y *L. monodon* son susceptibles a IMNV, pero no se produjo mortalidad como consecuencia de la infección experimental en esta prueba de laboratorio (Tang et al. 2005). Estos signos pueden aparecer de manera repentina ocasionada por estrés de captura, cambios bruscos de temperatura o salinidad (Lightner 2011). El IMNV se presenta como una enfermedad con un inicio agudo, signos graves y mortalidad elevada (40% a 70%), posteriormente la infección se torna crónica y la mortalidad puede llegar hasta 100% (Nunes, Cunha y Vasconcelos 2004; Lightner 2011). En Brasil esta enfermedad se encuentra focalizada solo en la región noreste, teniendo pérdidas en alrededor de 100 a 200 millones de dólares; sin embargo, se han observado organismos con síntomas similares en otras regiones del Caribe donde se cultiva *L. vannamei* (Lightner et al. 2012).

Alfaro y Guevara (2007), en el Laboratorio de Sanidad Acuícola, Instituto del Mar del Perú- Imarpe, Sede Tumbes, realizaron una investigación referente a la patobiología y sanidad acuícola en langostinos de cultivo y del ambiente natural aledaño de la Región Tumbes, incluyendo la vigilancia epidemiológica del virus IMNV. Los muestreos se realizaron quincenalmente por el periodo comprendido de febrero a diciembre del 2017 en los canales de marea: El Bendito, La Envidia, Soledad, El Algarrobo y Matanzas. Se usó la técnica de la PCR, reportando que *L.*

vannamei y *L. stylirostris* de la región de Tumbes se encuentran libres del IMNV (0 %).

Así mismo, Alfaro y Guevara (2008), analizaron ejemplares de *L. vannamei* y *L. stylirostris* capturados en los canales de marea ubicados en las provincias de Tumbes y Zarumilla: Boca del Río Tumbes, El Alcalde, Jelí, El Bendito, Soledad, Algarrobo y Envidia, confirmando la ausencia de IMNV en los langostinos silvestres de la región de Tumbes.

Otro virus de suma importancia es IHHNV perteneciente a la familia *Parvoviridae* que tiene una forma icosaédrica de 22 nm de diámetro con una molécula de ADN de una sola cadena y su genoma es de 4075 nucleótidos de largo, que lo convierte en el virus más pequeño conocido en langostinos peneidos (Escobedo and Ibarra 2014).

Aunque la mayoría de las especies de peneidos pueden resultar infectadas con IHHNV en *L. stylirostris*, el virus puede causar una epizootia aguda y una mortalidad masiva (90%). En los estadios juveniles y sub adultos de *L. vannamei* más que una elevada mortalidad, produce una enfermedad crónica que se conoce como “síndrome de la deformidad y del enanismo” (RDS), en donde los principales síntomas son un crecimiento reducido e irregular y deformidades cuticulares, y generalmente no hay una elevación notable en la mortalidad (Lightner 2011).

Algunos miembros de las poblaciones de *L. stylirostris* y *L. vannamei* que logran sobrevivir a las infecciones de IHHNV, son portadores del virus durante toda su vida y contagian a su progenie por transmisión vertical, esto ha sido demostrado por PCR y por hibridación *in situ* con sondas específicas para IHHNV, demostrando la transmisión vertical a través de los oocitos y a otras poblaciones por transmisión horizontal al consumir tejido infectado (Lightner 2011; Motte et al. 2003). IHHNV se encuentra distribuida a nivel mundial, tanto en langostinos silvestres como de cultivo (Cuéllar-Anjel 2008).

Guzmán et al. (2009) examinaron *Litopenaeus setiferus* (langostino blanco del atlántico) y *Farfantepenaeus aztecus* (langostino café) capturados en el estero de “La Pesca” en la laguna Madre, Tamaulipas, México, mediante histopatología y amplificación de ácidos nucleicos teniendo como resultados prevalencias positivas:

TSV (6,6%) y IHHNV (4,4%). Presentándose la mayoría de los casos en noviembre a marzo.

Así mismo; Alfaro, Guevara y Gonzales (2010), realizaron un estudio en el laboratorio de sanidad acuícola de Imarpe, sede Tumbes, durante los meses de marzo y diciembre de 2009, en los canales de marea Boca del río Tumbes, El Alcalde, Jelí, El Bendito, Soledad, Algarrobo y Envidia, en el cual analizaron las especies *L. vannamei*, *L. stylirostris* y *Farfantepenaeus californiensis*, a través de la técnica de PCR logrando detectar la presencia de IHHNV (0,3%). La más alta prevalencia de la infección por IHHNV se registró en el canal de marea el Jelí con 5,05% al parecer estuvo influenciada por escapes accidentales en la cosecha de *L. vannamei* cultivados e infectados.

De igual manera, Guevara y Alfaro (2012), en las mismas instalaciones analizaron post larvas importadas de *L. vannamei*, procedentes de laboratorios de maduración de Ecuador, ubicados en los poblados de Mar Bravo, Punta Carnero, Ayangue y San Pablo, de la provincia de Santa Elena, durante los años 2009 y 2010 detectando presencia de IHHNV con 9,60% y 16,79%, respectivamente.

En el año 2009 en Asia particularmente en China aparecen los primeros brotes de AHPND (enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda) o EMS (síndrome de la mortalidad temprana), luego de 4 años se reporta en América en México, en el estado de Nayarit en marzo, y ya para el mes de mayo, en los cultivos de Sinaloa y Sonora (Nunan et al. 2014). AHPND causa mortalidad súbita y masiva (de hasta el 100%) en el langostino dentro los primeros 25 días después de la siembra post-larvaria (Soto et al. 2015; NACA 2012) y además es posible detectar AHPND luego de los 30 días después de la puesta en los estanques (De La Peña et al. 2015). Así mismo la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE 2016) manifiesta que las especies susceptibles son *L. vannamei*, *L. monodon* y *L. chinensis*.

En las primeras etapas de AHPND, el langostino presenta el hepatopáncreas de pálido a blanco debido a la pérdida de pigmento en las células R, así como una atrofia que puede reducir el tamaño del órgano en un 50% o más. En la fase terminal de la enfermedad, aparecen rayas o manchas negras (debido a la deposición de

melanina a partir de la actividad de los hemocitos) (De la Peña et al. 2015; Tran et al. 2013).

AHPND se le ha asociado con una cepa virulenta de *Vibrio parahaemolyticus* (Tran et al. 2013) y aunque no se conocían bien los mecanismos o factores virulentos que hacían tan letal a esta cepa, diversos estudios encontraron distintos genes que codifican a factores de virulencia que no habían sido reportados en cepas de *V. parahaemolyticus* (Gómez et al. 2014). Sin embargo, recientemente se ha determinado que la adquisición del plásmido pVA1 el cual contiene los genes que confieren hipervirulencia a la bacteria y se demostró que entre ellos las toxinas *PirA* y *PirB* de manera conjunta son los responsables de las mortalidades producidas por AHPND (Lee et al. 2015).

En lo que respecta a AHPND, De La Peña et al. (2015), examinaron especies *L. vannamei* y *P. monodon*, obtenidas de las langostineras de Bohol, Filipinas. Utilizando métodos de histología y PCR, sobre individuos con más de 30 días de cultivo (40 – 94 días) con presunta etiología de AHPND, lograron confirmar que dicha infección fue debido a cepas de VP_{AHPND}.

Así mismo, Soto et al. (2015), en el estado de Sinaloa, México, analizaron langostinos de cultivo y silvestres, durante abril y setiembre del 2013. Logrando identificar por histología y análisis microbiológico, baja carga bacteriana en la hemolinfa (máximo $2,05 \times 10^2$ UFC/ml) y alta carga de *Vibrio* en el estómago y hepatopáncreas (máximo $5,43 \times 10^8$ UFC/ml y $1,42 \times 10^9$ UFC/ml; respectivamente). Mientras que los análisis de PCR, permitieron identificar molecularmente a *V. parahaemolyticus* por la presencia del gen *tlh* atribuyendo a *V. parahaemolyticus*, como el agente bacteriano de AHPND, causante de las mortalidades en los cultivos de langostino en el Norte de México.

Este estudio permitió determinar la presencia de IHHNV, VP_{AHPND} y la ausencia de IMNV en langostinos silvestres del género *Litopenaeus* en los canales de marea: El Bendito, El Algarrobo, La Envidia, La Boca del Río Tumbes, El Alcalde, El Jelí y La Soledad; de mayo a noviembre del 2017, mediante el uso de técnicas moleculares: PCR, Nested PCR y RT Nested PCR.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

De acuerdo al objetivo que persigue: básica

De acuerdo al diseño de contrastación: descriptiva, porque los datos serán recogidos tal como se presentan sin modificarlos ni manipularlos, determinándose la presencia de IMNV, IHNV y VP_{AHPND} en langostinos silvestres del género *Litopenaeus* en Tumbes.

3.2. Población, muestra y muestreo

Se establecieron siete estaciones de muestreo en el ecosistema de los Manglares de Tumbes, las que corresponden a los canales de marea La Boca del Río Tumbes, El Alcalde, El Jelí, El Bendito, La Soledad, El Algarrobo y La Envidia, siguiendo las recomendaciones Alfaro, Guevara y Gonzales (2010). Estos canales, además de ser los más accesibles, se encuentran aledaños a las zonas de cultivo de *L. vannamei* y constituyen zonas de captación de agua y descarga de efluentes de las empresas langostineras.

Se capturó un total 560 ejemplares de langostinos silvestres del género *Litopenaeus* en los meses de mayo, junio, setiembre y noviembre del 2017 cuya longitud total varió de 3,30 a 10,0 cm. Las capturas se realizaron mediante lances de atarraya con longitud de malla de 1,22 cm, en lugares cuyas coordenadas geográficas fueron determinadas con un GPS Garmin SailAssist™. El número de ejemplares *L. vannamei* y *L. stylirostris* y coordenadas según estación de muestreo se detalla en la tabla 1.

Así mismo, se registraron los valores de temperatura superficial del agua con un termómetro de vidrio 0 a 100 °C y la salinidad del agua se midió usando un refractómetro de marca HHTEC de 0 a 100 ppt, según el orden de captura de los ejemplares por cada estación de muestreo.

Tabla 1. Número de ejemplares colectados y coordenadas geográficas por estación de muestreo.

Mes de Muestreo	Estación de Muestreo	Coordenadas	Total Ejemplares	L. <i>vannamei</i>	L. <i>stylirostris</i>
Mayo	Boca del Río Tumbes	3°32'30" S; 80°29'38,52" W	20	16	4
	Alcalde	3°31'7,44" S; 80°26'46,2" W	20	13	7
	Jelí	3°27'56,64" S; 80°19'41,82" W	20	17	3
	El Bendito	3°26'58,38" S; 80°19'4,14" W	20	20	0
	Soledad	3°27'32,7" S; 80°18'30,9" W	20	18	2
	Algarrobo	3°28'12,6" S; 80°17'54,84" W	20	16	4
	Envidia	3°27'18,18" S; 80°18'46,38" W	20	19	1
Junio	Boca del Río Tumbes	3°32'30" S; 80°29'38,52" W	20	20	0
	Alcalde	3°31'7,44" S; 80°26'46,2" W	20	20	0
	Jelí	3°27'56,64" S; 80°19'41,82" W	20	8	12
	El Bendito	3°26'58,38" S; 80°19'4,14" W	20	0	20
	Soledad	3°27'32,7" S; 80°18'30,9" W	20	8	12
	Algarrobo	3°28'12,6" S; 80°17'54,84" W	20	13	7
	Envidia	3°27'18,18" S; 80°18'46,38" W	20	19	1
Setiembre	Boca del Río Tumbes	3°32'30" S; 80°29'38,52" W	20	4	16
	Alcalde	3°31'7,44" S; 80°26'46,2" W	20	18	2
	Jelí	3°27'56,64" S; 80°19'41,82" W	20	1	19
	El Bendito	3°26'58,38" S; 80°19'4,14" W	20	3	17
	Soledad	3°27'32,7" S; 80°18'30,9" W	20	18	2
	Algarrobo	3°28'12,6" S; 80°17'54,84" W	20	0	20
	Envidia	3°27'18,18" S; 80°18'46,38" W	20	10	10
Noviembre	Boca del Río Tumbes	3°32'3" S; 80° 29'48" W	20	14	6
	Alcalde	3°32'3" S; 80°29'49" W	20	20	0
	Jelí	3°27'57" S; 80°19'42" W	20	19	1
	El Bendito	3°27'1" S; 80°19'2" W	20	7	13
	Soledad	3°27'32" S; 80°18'32" W	20	13	7
	Algarrobo	3°28'13" S; 80°17'55" W	20	19	1
	Envidia	3°28'13" S; 80°18'31" W	20	19	1
	Total		560	372	188

Las muestras obtenidas se transportaron frescas al Laboratorio de INCABIOTEC S.A.C. en bolsas con gel-pack y etiquetadas con los siguientes datos: Número, estación y fecha de muestreo; donde fueron procesadas y analizadas utilizando técnicas de diagnóstico molecular.

3.3. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos

Para determinar cada una de las especies capturadas en los muestreos se tomó en cuenta el número y posición de los dientes rostrales que se consignan en la Clave de identificación y distribución de los langostinos y camarones del

mar y ríos de la costa del Perú (Méndez 1981). Se registraron los pesos y tallas individuales de los ejemplares *L. vannamei* y *L. stylirostris* capturados. También se anotaron algunas características morfológicas externas de interés (coloración rojiza, músculo blando, branquias sucias y coloración de los urópodos).

Para determinar la presencia de IHHNV e IMNV, se extirparon los pleópodos de *L. vannamei* y *L. stylirostris* tal como se muestra en la Figura 1; asimismo se extrajo una porción de tejido muscular de la región dorsal por debajo del primer y segundo segmento abdominal, los que se mezclaron cada 5 langostinos, posteriormente se les realizó la extracción de ARN para su amplificación.



Figura 1. Extracción de pleópodos en *L. vannamei* para la detección de IHHNV.

Para determinar la presencia de VP_{AHPND} se extirpó el hepatopáncreas de los ejemplares muestreados, el cual se utilizó para aislamiento de la presunta cepa de *Vibrio parahaemolyticus* con el complejo de genes de toxicidad *Pir* causante de AHPND (VP_{AHPND}). Para ello se realizaron muestras compuestas de 5 hepatopáncreas (a excepción de los muestreos de mayo y junio que fueron agrupaciones de 10 individuos) (tabla 2), luego se maceraron y una alícuota de 20 μ l fue sembrada en medio líquido TSB (Tryptic Soy Broth) 2% de NaCl. Se incubaron por 24 horas y posteriormente se realizó la extracción de ADN.

Tabla 2. Número Total de ejemplares colectados y muestras compuestas obtenidas por cada agente patógeno en estudio, 2017.

Mes de Muestreo	Estación de Muestreo	Total de ejemplares colectados	Pools Totales/ Patógeno	Pools positivos IHHNV	Pools positivos IMNV	Pools positivos VP _{AHPND}
Mayo	Boca del Río	20	2	0	0	0
	Alcalde	20	2	0	0	0
	Jelí	20	2	0	0	0
	El Bendito	20	2	0	0	1
	Soledad	20	2	0	0	1
	Algarrobo	20	2	0	0	0
	Envidia	20	2	0	0	0
Junio	Boca del Río	20	2	2	0	0
	Alcalde	20	2	0	0	1
	Jelí	20	2	0	0	0
	El Bendito	20	2	0	0	0
	Soledad	20	2	0	0	0
	Algarrobo	20	2	0	0	0
	Envidia	20	2	0	0	1
Setiembre	Boca del Río	20	4	0	0	1
	Alcalde	20	4	0	0	0
	Jelí	20	4	0	0	0
	El Bendito	20	4	0	0	0
	Soledad	20	4	2	0	0
	Algarrobo	20	4	2	0	0
	Envidia	20	4	1	0	1
Noviembre	Boca del Río	20	4	4	0	2
	Alcalde	20	4	4	0	0
	Jelí	20	4	4	0	3
	El Bendito	20	4	4	0	1
	Soledad	20	4	4	0	2
	Algarrobo	20	4	0	0	1
	Envidia	20	4	4	0	2

Para la detección de IMNV se utilizó un protocolo modificado de Poulos et al. (2006), reportado por la OIE. La extracción de ARN se realizó usando aproximadamente 100 µL de músculo de langostino, el cual se lavó con 500 µL de agua ultra pura o solución salina (5 veces), se maceró, colocó 500 µL Tri Reagent (TRIZOL) y se homogenizó con fuerza. Luego, se incubó por 5 min a 4 °C, se añadió 100 µL de cloroformo, mezclándose vigorosamente invirtiendo

los tubos durante 1 min y dejando reposar 2 a 15 min a temperatura ambiente (sobre hielo). Inmediatamente se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4 °C, transfiriendo la fase superior a un nuevo microtubo agregando 300 µL de Isopropanol helado, luego se mezcló invirtiendo el microtubo varias veces y dejándose reposar por 10 min a temperatura ambiente (sobre hielo). Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4 °C, eliminándose el sobrenadante, se agregó 300 – 500 µL de Etanol 75% homogenizando la muestra. Para finalizar, se centrifugó a 7500 por 5 min a 4 °C, eliminándose el sobrenadante y dejando secar el pellet por 10 min a temperatura ambiente, resuspendiéndose el sedimento en 20 a 50 µL de agua ultra pura y tomándose 2 µL para la reacción de retrotranscripción.

Para la detección de IHHNV se utilizaron los protocolos descrito por Motte et al. (2003) y Tang, Navarro & Lightner (2007), reportados por la OIE (2016). La extracción se realizó a partir de pleópodos, por medio del protocolo *PBS*.

Para la detección de VP_{AHPND} se utilizó el protocolo publicado por Dangtip et al. (2015) y reportado por la OIE. La extracción del ADN se realizó a partir de hepatopáncreas, usado en cultivo bacteriano por medio del protocolo *PBS*.

La extracción del ADN se realizó a partir de la maceración de la muestra lavada, la cual se le agregó 500 µL de PBS a la muestra y se incubó a 95 °C por 10 min. Luego, se centrifugó a 13 000 rpm por 5 min donde se recuperó 300 µL del sobrenadante que fue colocado en un nuevo microtubo y se le agregó 600 µL de Etanol al 95% (helado). Mas adelante, se centrifugó a 13 000 rpm durante 15 min y se descartar el sobrenadante agregándole 400 µL de Etanol al 75% (helado) y centrifugado a 13 000 rpm por 5 min. Finalmente se descartó totalmente el sobrenadante, se dejó secar el pellet por 20 a 30 min y se resuspendió el pellet totalmente seco con T. E. pH 8.0 (precalentado a 50 °C).

Se utilizó cebadores específicos recomendados por la OIE (2016) para cada agente etiológico (tabla 3).

Tabla 3. Cebadores específicos para cada enfermedad y productos de amplificación de la PCR.

Patógeno	Cebador	Secuencia (5' a 3')	Producto (pares bases)	Referencia
IHHNV	389F	CGGAACACAACCCGACTTTA	389	Tang, Navarro & Lightner (2007) OIE (2016)
	389R	GGCCAAGACCAAAATACGAA		
IMNV	4587F	CGACGCTGCTAACCATACAA	328	Poulos et al. (2006) OIE (2016)
	4914R	ACTCGGCTGTTCGATCAAGT	139	
	4725NF	GGCACATGCTCAGAGACA		
	4863NR	AGCGCTGAGTCCAGTCTTC		
VP _{AHPND}	AP4-F1	ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC	1269	Dangtip et al. (2015) OIE (2017)
	AP4-R1	ACGATTTTCGACGTTGCCCAA	230	
	AP4-F2	TTGAGAATACGGGACGTGGG		
	AP4-R2	GTTAGTCATGTGACCACCTTC		

Para la detección de cada agente patógeno, se utilizaron las técnicas:

Para IMNV se utilizó la RT Nested PCR que consiste que en la primera PCR se utilizaron 2 cebadores externos 4587 F y 4914 R y para la segunda reacción se utilizaron cebadores internos 4725NF y 4863NR, los que amplificaron un producto de 139 pares de bases.

VP_{AHPND} se usó la Nested PCR donde la primera PCR se utilizaron 2 cebadores externos AP4-F1 y AP4-R1 y la segunda PCR se utilizaron 2 cebadores internos AP4-F2 y AP4-R2, los que amplificaron un producto de 230 pares de bases.

Y para IHHNV se usó la PCR donde se utilizaron 2 cebadores 389F y 389R que amplificaron para un producto de 389 pares de bases.

Realizando la mezcla de reactivos indicadas en el kit de *Taq DNA Polymerase Recombinant* de Thermo Fisher y siguiendo los programas de PCR para la detección de cada agente patógeno (ver Anexo 1).

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio como agente intercalante (0,5 µg/µl) y usando como tampón de migración *buffer* TAE 1X (Tris, Ácido Acético y EDTA). La migración fue llevada en una cámara de electroforesis a 90V y por un tiempo promedio de 30 minutos.

Se estimó la prevalencia individual cuando se usa muestras compuestas mediante el uso de la siguiente fórmula dada por Kline et al. (1989):

$$P (\%) = 1 - \left(1 - \frac{PP}{PT}\right)^{\frac{1}{TP}}$$

Donde:

- ✓ P (%): Prevalencia o proporción de langostinos que presentan el agente etiológico a estudiar en un momento dado.
- ✓ PP: Total de muestras compuestas de langostinos que dieron positivo para el agente etiológico a estudiar.
- ✓ PT: Total de muestras compuestas de langostinos para el diagnóstico de los agentes etiológicos a estudiar.
- ✓ TP: Total de langostinos usados para preparar una muestra compuesta.

3.4. Procesamiento y análisis de datos

Para estimar la prevalencia individual a partir de muestras compuestas, se utilizó el programa EpiTools epidemiological calculators (Sergeant, ESG 2019), con un nivel de confianza del 95%; y se comparó con los resultados obtenidos a través de la fórmula de Kline et al. (1989).

4. RESULTADOS

4.1. Especies identificadas

Durante el proceso de muestreo se identificaron *L. vannamei* y *L. stylirostris* con fórmula rostral 8-9/1-2 y 7/3-4, respectivamente (figura 2), capturados mediante lances de atarraya.

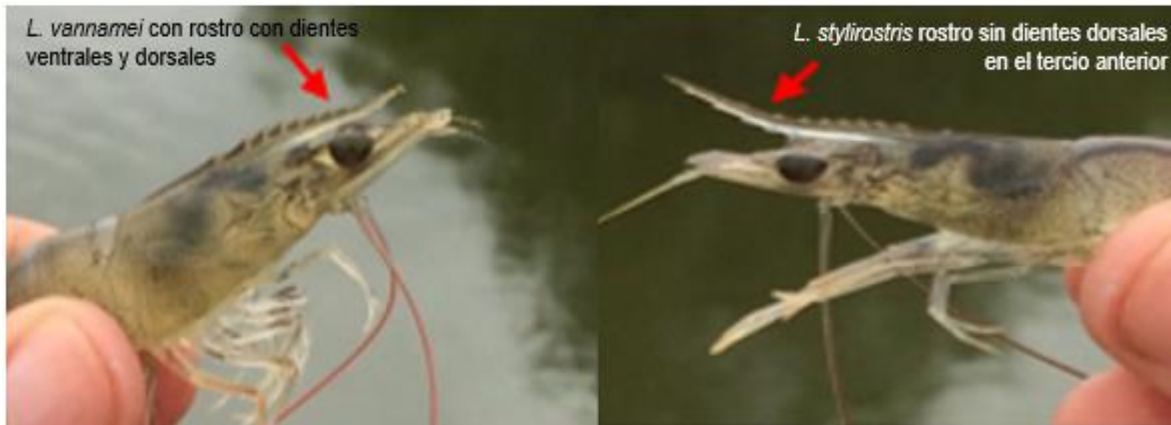


Figura 2. Ejemplar de langostino silvestre: *L. vannamei* (izquierda) y *L. stylirostris* (derecha).

4.2. Canales de marea y total de ejemplares capturados

Se realizaron 4 muestreos durante los meses de mayo, junio, setiembre y noviembre del 2017 colectándose 560 langostinos silvestres del género *Litopenaeus* de los cuales se identificaron 372 *L. vannamei* y 188 *L. stylirostris*, colectados en las 7 estaciones de muestreo establecidas (figura 3).

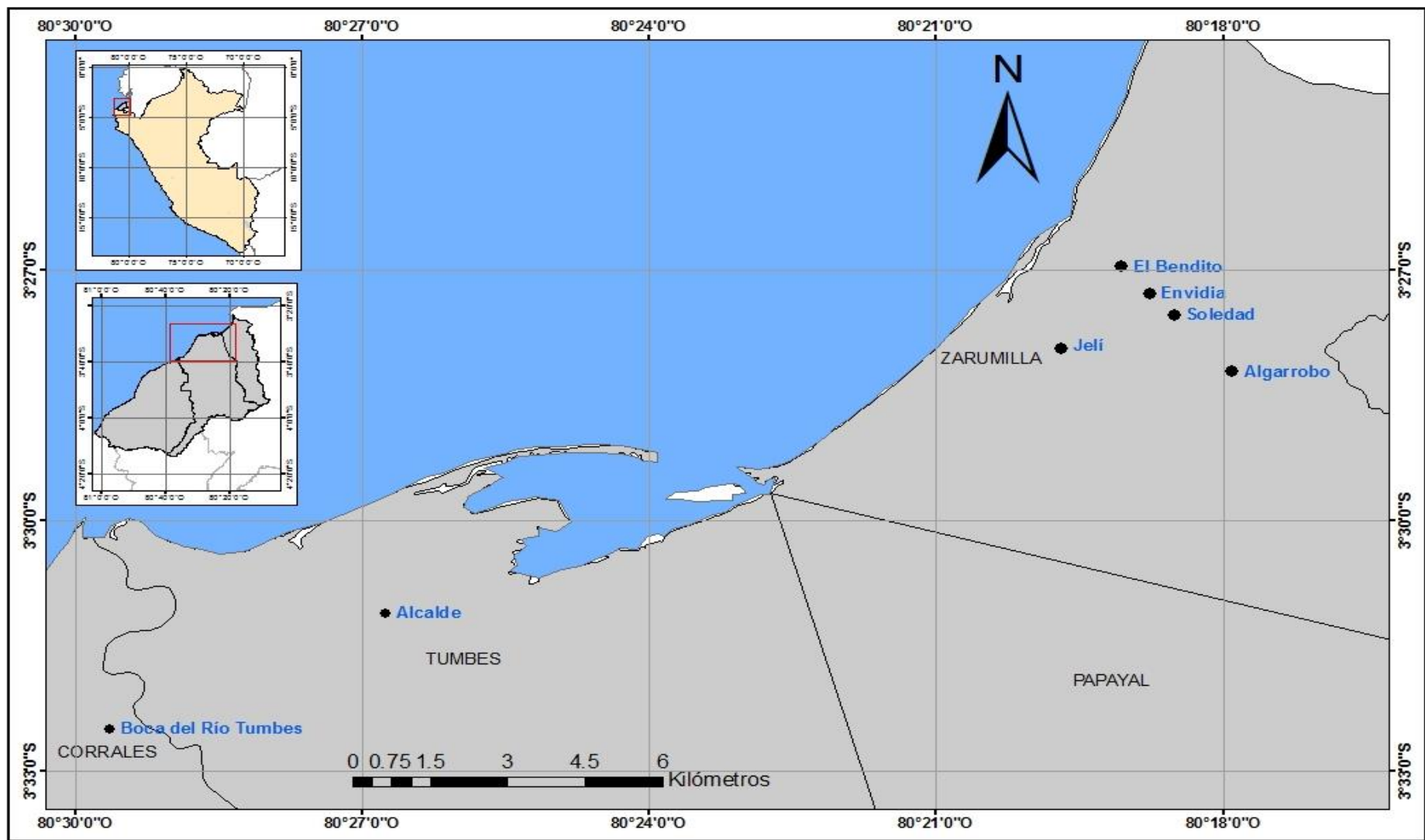


Figura 3. Ubicación de las estaciones de muestreo en estudio.

4.3. Características individuales de las muestras

Las tallas promedio que se obtuvieron de los ejemplares oscilaron entre 3,30 a 10,00 cm de longitud y con pesos entre 0,61 a 10,00 g (Tabla 4).

La mayoría de ejemplares capturados presentaron branquias sucias, pleópodos amarillos, urópodos rojos leves, urópodos verdes fosforescentes, branquias amarillas y textura blanda, debiendo indicar que el mes de noviembre la mayor parte de langostinos presentó esta última característica (Figura 4).



Figura 4. (a) *L. stylirostris* con pleópodos de color amarillo y (b) urópodos con coloración rojiza leve.

Tabla 4. Características morfológicas de los langostinos silvestres extraídos de los canales de marea, 2017.

Mes de Muestreo	Estación de Muestreo	Peso Promedio (g)	Talla Promedio (cm)	Características externas
Mayo	Boca del Rio Tumbes	4,60	8,50	URL, UVF
	El Alcalde	6,70	9,60	URL, UVF
	El Jelí	10,00	10,00	BAM, PLA, URL, UVF
	El Bendito	3,10	7,50	URL, UVF
	La Soledad	5,10	8,80	URL
	El Algarrobo	6,70	9,60	URL, UVF
	La Envidia	9,70	10,00	URL
Junio	Boca del Rio Tumbes	7,90	9,73	BAM, UR
	El Alcalde	3,93	7,60	BAM, URL
	El Jelí	8,04	10,00	BAM, URL, UVF
	El Bendito	10,00	10,00	BS, PLR, URL, UVF
	La Soledad	2,30	6,33	BS, PLA
	El Algarrobo	5,23	8,28	BS, BAM, URL
	La Envidia	5,09	8,38	BS, BAM, URL
Setiembre	Boca del Rio Tumbes	2,06	5,44	URL
	Alcalde	2,72	6,20	URL
	Jelí	2,68	6,30	BS, BAM, URL, UVF
	El Bendito	3,43	6,75	URL, UVF
	Soledad	5,64	8,45	BS, PLA
	Algarrobo	3,87	7,54	BS, URL
	Envidia	4,93	7,93	BS, URL
Noviembre	Boca del Rio Tumbes	3,38	7,13	UR, BL (5%) *
	Alcalde	0,61	3,30	URL, BL (15%) *
	Jelí	2,99	7,65	UR, PLA, BL (5%) *
	El Bendito	7,28	8,70	UR, BAM, PLA, BL (10%) *
	Soledad	2,26	6,48	BAM, URL, BL (10%) *
	Algarrobo	3,36	8,05	URL, UVF, BL (15%) *
	Envidia	3,38	7,88	URL, BL (10%) *

Leyenda:

URL: Urópodos rojos leves,

UR: Urópodos rojos,

UVF: Urópodos verdes fosforescentes,

BAM: Branquias amarillas,

PLA: Pleópodos amarillos,

BS: Branquias sucias,

PLR: Pleópodos rojos,

BL: Blando, *Porcentaje de blandos por canal de marea.

4.4. Parámetros físicos del agua: temperatura (°C) y salinidad (ppt).

La temperatura del agua osciló entre 22,8 a 26,0 °C, dato registrado a las 8:30 am que empezaba el muestreo y generalmente días soleados. Las salinidades oscilaron entre 5 a 39 ppt. El canal de marea Boca del Río Tumbes registró las salinidades más bajas que variaron entre 5 a 8 ppt (tabla 5).

Tabla 5. Parámetros físicos del agua: temperatura (°C) y salinidad (ppt) por estación de muestreo de Tumbes, de mayo a noviembre 2017.

Canal de marea/ mes de muestreo	Salinidad (ppt)					Temperatura (°C)				
	May	Jun	Set	Nov	Prom.	May	Jun	Set	Nov	Prom.
Boca del Rio Tumbes	5	6	5	18	9	25,0	24,7	26,0	22,8	24,6
Alcalde	20	25	30	33	27	25,0	24,5	26,0	24,3	25,0
Jelí	20	25	37	36	30	25,0	24,5	26,0	25,0	25,1
El Bendito	20	26	38	37	30	25,0	25,6	26,0	23,8	25,5
Soledad	20	25	39	37	30	25,0	24,4	25,0	24,0	24,6
Algarrobo	20	25	35	38	30	25,0	24,7	24,0	23,1	24,2
Envidia	20	26	38	34	30	25,0	24,5	26,0	23,8	24,8
Promedio						25,0	24,7	25,6	23,8	

4.5. Muestreo 1. Mayo

Se registró en los langostinos silvestres *L. vannamei* y *L. stylirostris* capturados en El Bendito y La Soledad la presencia de la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* con el complejo de genes de toxicidad *Pir* que causa AHPND (VP_{AHPND}) con una prevalencia de 6,70% (ver tabla 6 y figura 5) a salinidades y temperaturas promedio de 20 ppt y 25 °C, respectivamente.

Tabla 6. Prevalencia de infección en langostinos silvestres *L. vannamei* y *L. stylirostris* capturados en los canales de marea de Tumbes en el mes de mayo del 2017.

Estación	Prevalencia IHHNV (%)	Prevalencia IMNV (%)	Prevalencia VP _{AHPND} (%)
Boca del Río	0,00	0,00	0,00
Alcalde	0,00	0,00	0,00
Jelí	0,00	0,00	0,00
El Bendito	0,00	0,00	6,70
Soledad	0,00	0,00	6,70
Algarrobo	0,00	0,00	0,00
Envidia	0,00	0,00	0,00

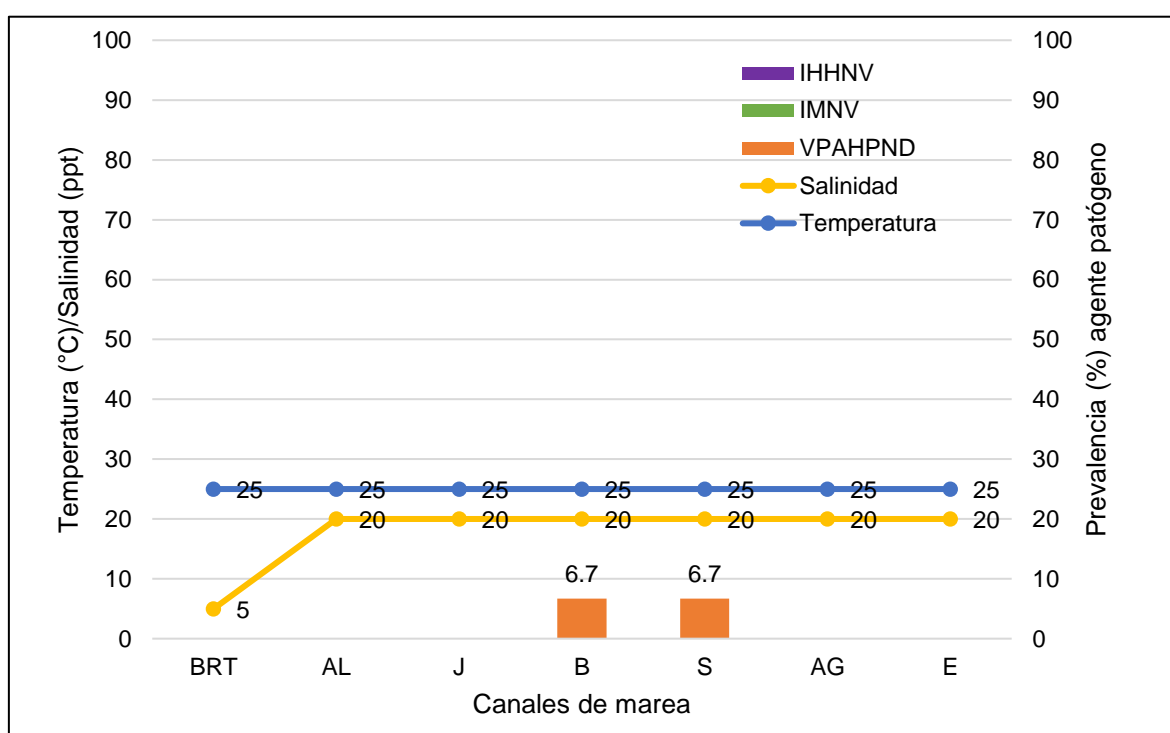


Figura 5. Relación entre las prevalencias de agentes patógenos en *L. vannamei* y *L. stylirostris* respecto a la temperatura (°C) y salinidad (ppt) según los canales de marea: Boca del Río (BRT), Alcalde (AL), Jelí (J), Bendito (B), Soledad (S), Algarrobo (AG) y Envidia (E). Mayo 2017.

4.6. Muestreo 2. Junio

Se registró la prevalencia de 100% de IHHNV en *L. vannamei* y *L. stylirostris* extraídos en el canal de marea La Boca del Río Tumbes, la salinidad reportada fue de 6 ppt; además en los canales de marea El Alcalde y La Envidia la

prevalencia de VP_{AHPND} fue de 6,70% y la salinidad fue de 24,5 ppt con una temperatura promedio de 24,5 °C (tabla 7 y figura 6).

Tabla 7. Prevalencia de infección en langostinos silvestres *L. vannamei* y *L. stylirostris* capturados en los canales de marea de Tumbes en el mes de junio del 2017.

Estación	Prevalencia IHHNV (%)	Prevalencia IMNV (%)	Prevalencia VP _{AHPND} (%)
Boca del Río	100,00	0,00	0,00
Alcalde	0,00	0,00	6,70
Jelí	0,00	0,00	0,00
El Bendito	0,00	0,00	0,00
Soledad	0,00	0,00	0,00
Algarrobo	0,00	0,00	0,00
Envidia	0,00	0,00	6,70

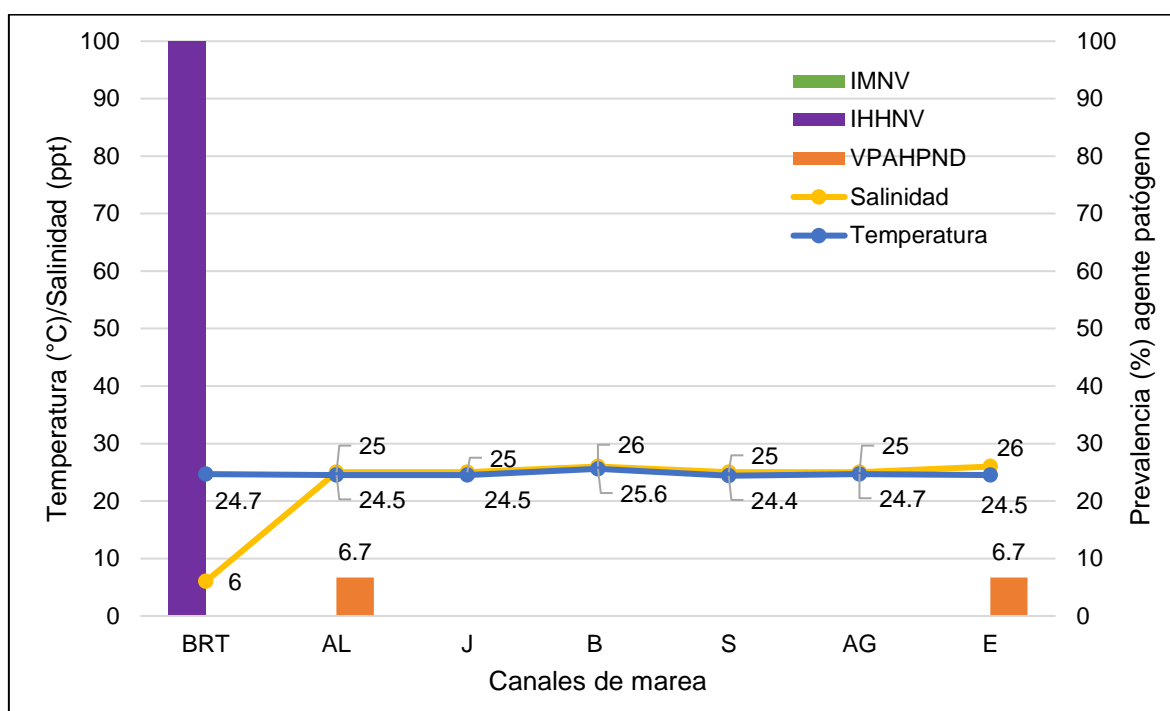


Figura 6. Relación entre las prevalencias de agentes patógenos en *L. vannamei* y *L. stylirostris* respecto a la temperatura (°C) y salinidad (ppt) según los canales de marea: Boca del Río (BRT), Alcalde (AL), Jelí (J), Bendito (B), Soledad (S), Algarrobo (AG) y Envidia (E). Junio 2017.

4.7. Muestreo 3. Setiembre

En el mes de setiembre las salinidades oscilaron entre 5 a 39 ppt y la temperatura promedio fue de 25,6 °C. Se registró la presencia de IHHNV en los

langostinos silvestres *L. vannamei* y *L. stylirostris* procedentes de los canales de marea La Soledad (12,94%), El Algarrobo (12,94%) y La Envidia (5,59%); y la presencia de VP_{AHPND} en los canales de marea La Envidia y La Boca del Río Tumbes con 5,59% respectivamente, asimismo la salinidad registrada fue de 5 ppt (tabla 8 y figura 7).

Tabla 8. Prevalencia de infección en langostinos silvestres *L. vannamei* y *L. stylirostris* capturados en los canales de marea de Tumbes en el mes de setiembre del 2017.

Estación	Prevalencia IHHNV (%)	Prevalencia IMNV (%)	Prevalencia VP _{AHPND} (%)
Boca del Río	0,00	0,00	5,59
Alcalde	0,00	0,00	0,00
Jelí	0,00	0,00	0,00
El Bendito	0,00	0,00	0,00
Soledad	12,94	0,00	0,00
Algarrobo	12,94	0,00	0,00
Envidia	5,59	0,00	5,59

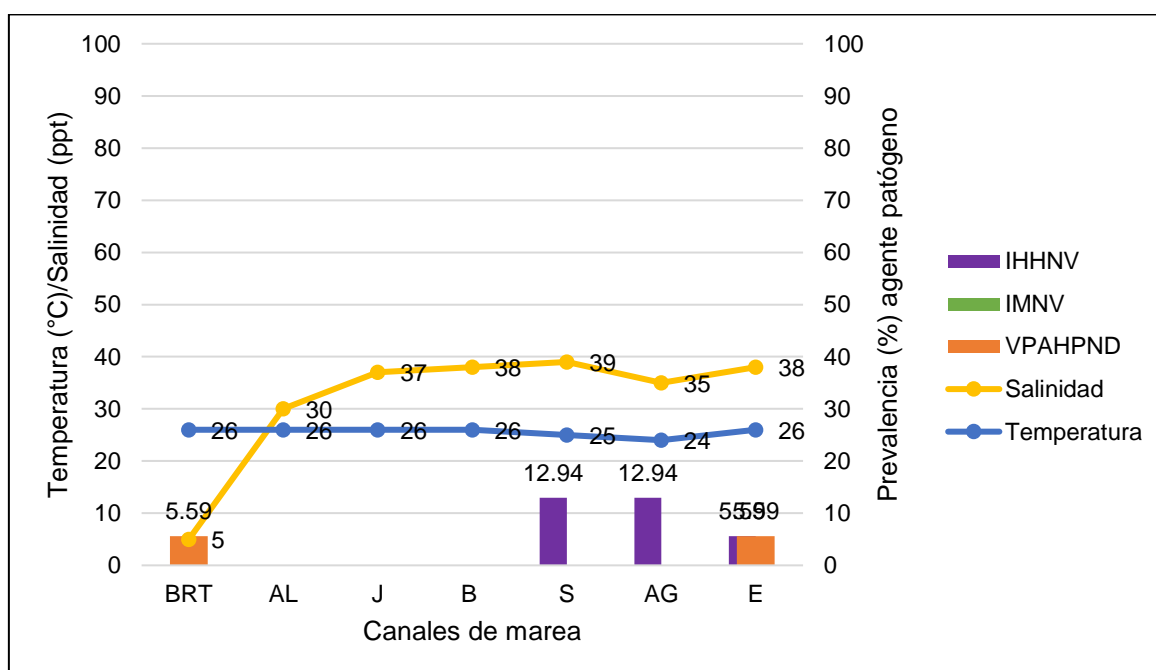


Figura 7. Relación entre las prevalencias de agentes patógenos en *L. vannamei* y *L. stylirostris* respecto a la temperatura (°C) y salinidad (ppt) según los canales de marea: Boca del Río (BRT), Alcalde (AL), Jelí (J), Bendito (B), Soledad (S), Algarrobo (AG) y Envidia (E). Setiembre 2017.

4.8. Muestreo 4. Noviembre

En el mes de noviembre las salinidades oscilaron entre 18 a 38 ppt y la temperatura promedio fue de 24,0 °C. En este mes la prevalencia de IHHNV fue del 100% en *L. vannamei* y *L. stylirostris*, a excepción de las especies extraídas del canal de marea El Algarrobo (0%); y, por último, la prevalencia VP_{AHPND} varió de 0% hasta 24,21% en ambas especies capturadas de todos los canales de marea. Además, se debe resaltar que hubo presencia de VP_{AHPND} en un pool de sólo *L. stylirostris* correspondiente al canal de marea Boca del Río Tumbes. Ver tabla 9 y figura 8.

Tabla 9. Prevalencia de infección en langostinos silvestres de *L. vannamei* y *L. stylirostris* capturados en los canales de marea de Tumbes en el mes de noviembre del 2017.

Estación	Prevalencia IHHNV (%)	Prevalencia IMNV (%)	Prevalencia VP_{AHPND} (%)
Boca del Río	100,00	0,00	12,94
Alcalde	100,00	0,00	0,00
Jelí	100,00	0,00	24,21
El Bendito	100,00	0,00	5,59
Soledad	100,00	0,00	12,94
Algarrobo	0,00	0,00	5,59
Envidia	100,00	0,00	12,94

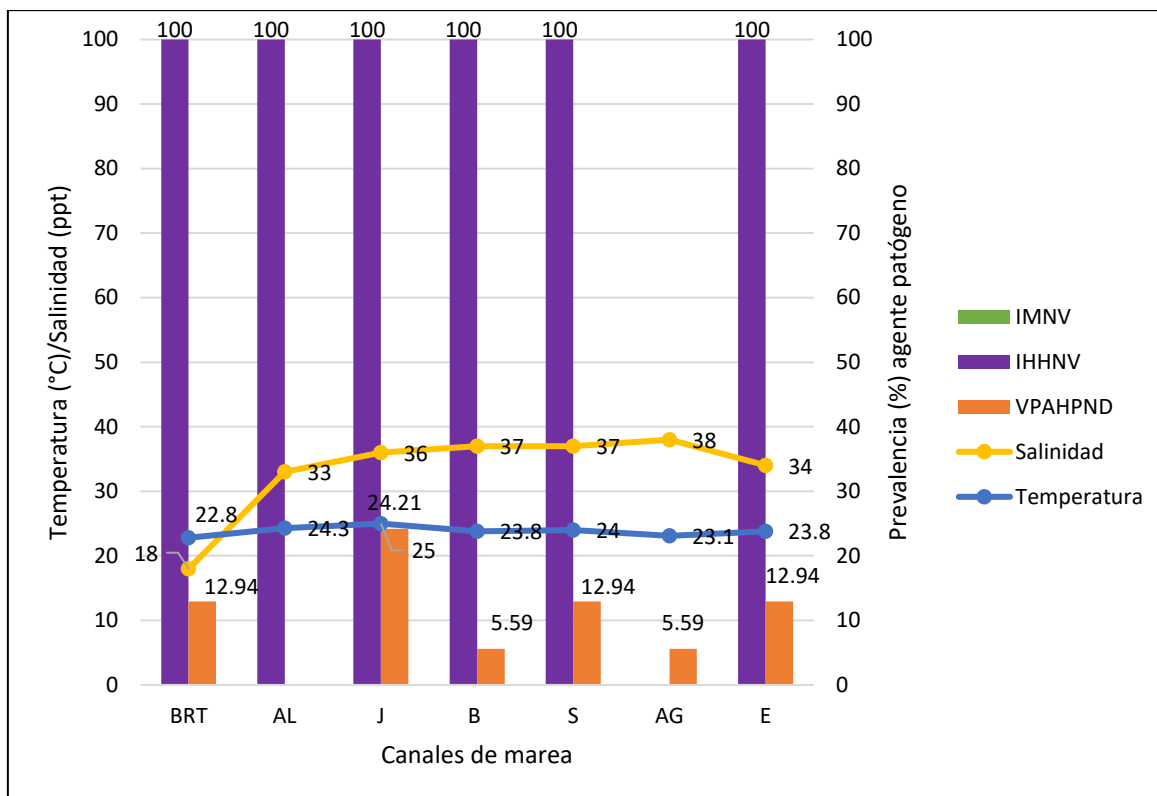


Figura 8. Relación entre las prevalencias de agentes patógenos en *L. vannamei* y *L. stylirostris* respecto a la temperatura (°C) y salinidad (ppt) según los canales de marea: Boca del Río (BRT), Alcalde (AL), Jelí (J), Bendito (B), Soledad (S), Algarrobo (AG) y Envidia (E). Noviembre 2017.

4.9. Síntesis de los datos obtenidos

IHHNV y VP_{AHPND} se detectaron en todos los canales de marea en estudio con prevalencias que oscilaron entre 4,47 a 12,11% para IHHNV y de 1,32 a 5,90% para VP_{AHPND}. Ver tabla 9 y figura 9.

Además, IHHNV, un virus ya establecido en el sector acuícola local con una prevalencia global de 7,58% y la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* con el complejo de genes de toxicidad *Pir* que causa AHPND (VP_{AHPND}) con prevalencia global de 3,51% (Tabla 10; figura 10) y temperaturas promedio que oscilan entre 23,8 a 25,6 °C.

Podemos asumir, que todos los ejemplares resultaron negativos al IMNV, obteniéndose que la población bajo estudio se encuentra libre de IMNV (tabla 10).

Tabla 10. Prevalencia de cada agente patógeno en estudio, por estación de muestreo.

Estación	Total de ejemplares colectados	Prevalencia IHHNV (%)	Prevalencia IMNV (%)	Prevalencia VP _{AHPND} (%)
Boca del Río	80	9,82	0,00	4,49
Alcalde	80	6,47	0,00	1,42
Jelí	80	6,47	0,00	4,49
El Bendito	80	6,47	0,00	2,74
Soledad	80	12,11	0,00	4,21
Algarrobo	80	2,80	0,00	1,32
Envidia	80	8,91	0,00	5,90
Total	560	7,58	0,00	3,51

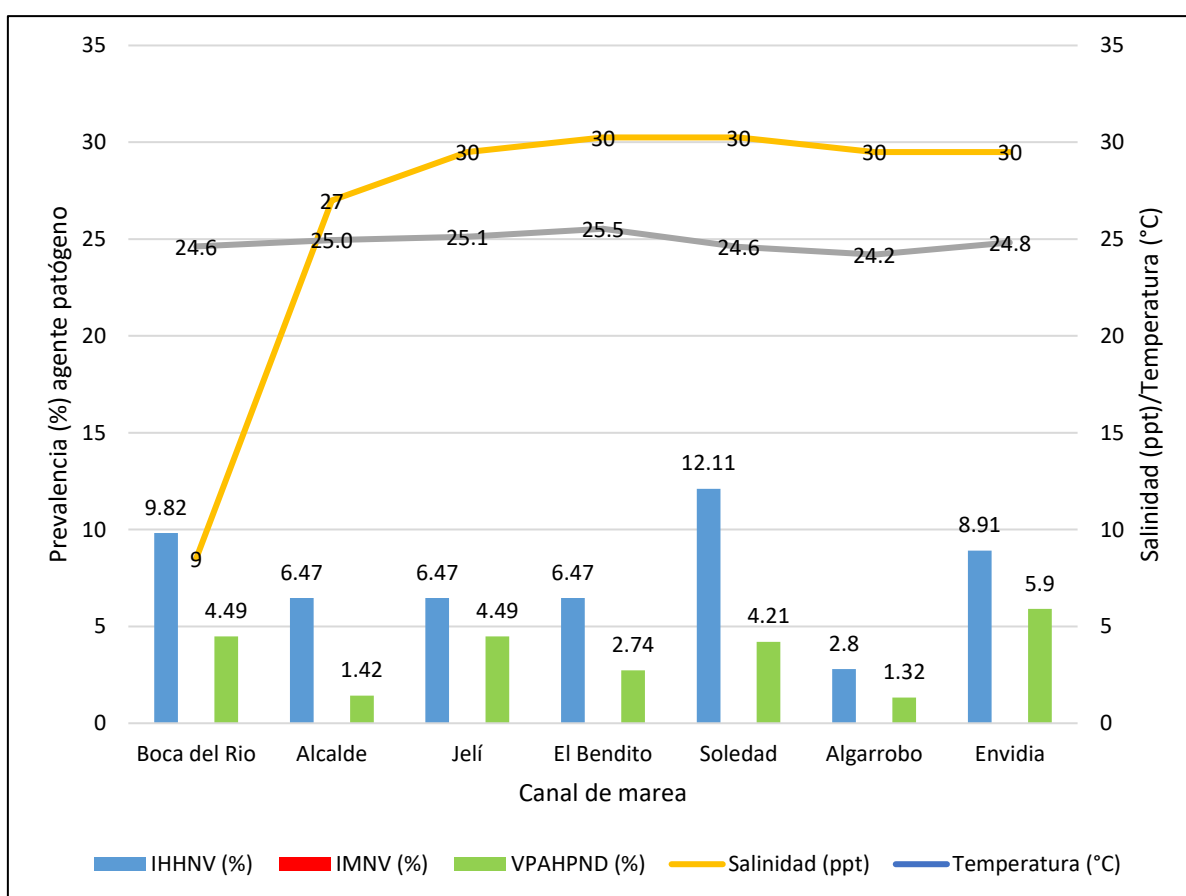


Figura 9. Prevalencia de cada agente patógeno en estudio, salinidad (ppt) y temperatura (°C) promedio, por estación de muestreo.

Tabla 11. Prevalencia de cada agente patógeno en estudio, según mes de muestreo. En 2017.

Muestras	Total de ejemplares colectados	Prevalencia IHHNV (%)	Prevalencia IMNV (%)	Prevalencia VP _{AHPND} (%)
Mayo	140	0,00	0,00	1,53
Junio	140	1,53	0,00	1,53
Setiembre	140	3,86	0,00	1,47
Noviembre	140	32,24	0,00	9,50
Total	560	7,58	0,00	3,51

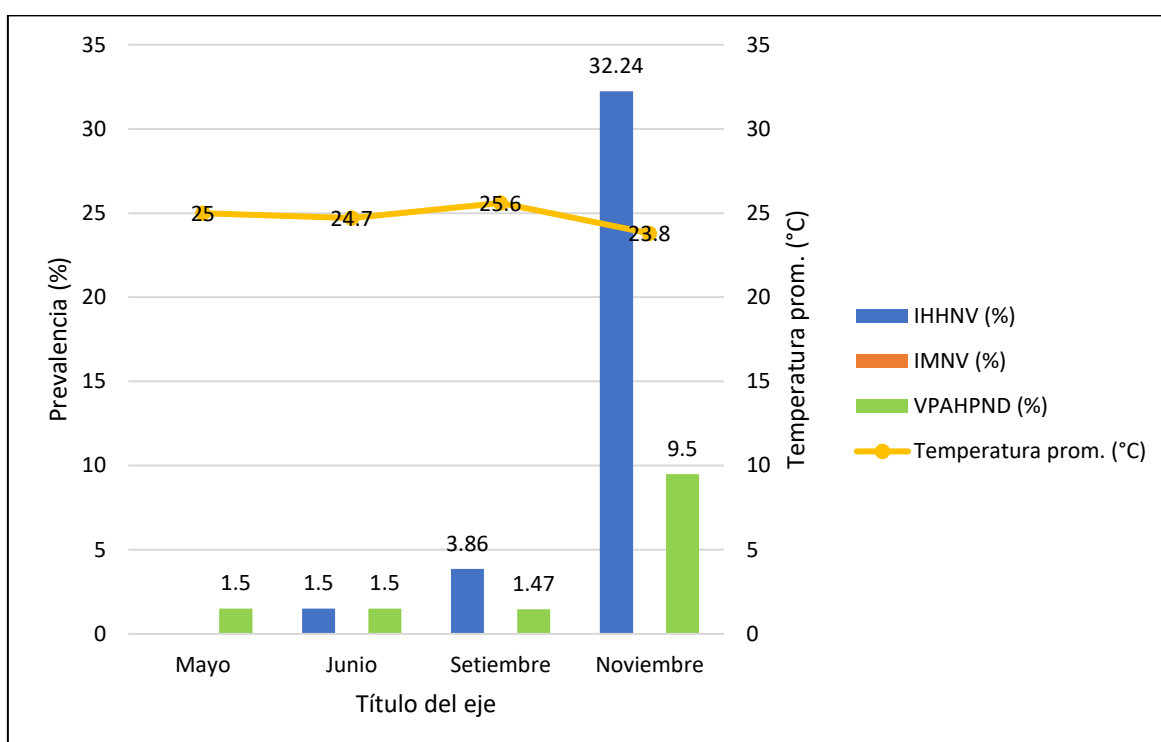


Figura 10. Prevalencia de cada agente patógeno en estudio y temperaturas promedio (°C), de mayo a noviembre del 2017.

5. DISCUSIÓN

En la presente investigación se reporta la presencia de IHHNV en langostinos silvestres *L. vannamei* y *L. stylirostris*. Según los muestreos se detectó la presencia del patógeno en todos los canales de marea con una prevalencia de 7,58%. Este resultado es mayor a los hallazgos de Alfaro, Guevara y Gonzales (2010), quienes colectaron las especies *L. vannamei*, *L. stylirostris* y *F. californiensis* y reportan una prevalencia de 0,31% de IHHNV en *L. vannamei* durante los meses de marzo a noviembre, probablemente los efluentes de las langostineras sean un factor que ha propiciado el incremento de este patógeno puesto que no se realiza ningún tratamiento a estas aguas, además IHHNV ha mostrado ser un virus enzoótico de langostinos silvestres y de cultivo (Lightner 2011; OIE 2017), reportándose a nivel de América en *L. vannamei* y *L. stylirostris* (Cuéllar-Anjel 2008; Lightner 2011; OIE 2017).

Se encontró prevalencias de IHHNV según el periodo tiempo desde 0% (mayo) hasta 32,24% (noviembre) y según las estaciones de muestreo desde 2,80% hasta 12,11%, observando que en la estación Jelí la prevalencia fue de 6,47% en *L. vannamei* y *L. stylirostris* siendo diferente a lo reportado por Alfaro, Guevara y Gonzales (2010), quienes encontraron prevalencia de IHHNV de 5,71% en el canal de marea El Jelí en el mes de diciembre, atribuyéndole el hecho a los escapes accidentales de langostinos en la cosecha de *L. vannamei* cultivados e infectados, además este incremento observado probablemente se debe a que esta población silvestre es dinámica, puesto que entran y salen individuos de manera constante.

Cabe mencionar que la presencia de IHHNV, se evidenció cuando las temperaturas oscilaban entre 24,0 °C a 26,0 °C como se observa en el muestreo del mes de noviembre que fueron las prevalencias más elevadas, concordando con lo reportado en la OIE (2017), ya que manifiestan que el IHHNV aumenta su tasa de replicación mientras más se aproxima a 24 °C. Por otro lado, según Montiel de Morales et al. (2007) y Bray, Lawrence y Leung-Trujillo (1994) aportan que la salinidad no es un factor que influya en la expresión de la infección de IHHNV, que los langostinos infectados pueden presentar el virus y ser asintomáticos para la deformación del rostro, demostrando que la infección con

IHHNV no explica por sí sola la presencia de la deformación de rostro, sino que son necesarios otros factores. Otro hecho particular, pero no aislado fue, que los langostinos capturados no mostraron signos clínicos de IHHNV (deformidad cuticular y crecimiento reducido), así como lo manifiesta la OIE en el 2017, en el que se indica la existencia de poblaciones de *L. vannamei* y *L. stylirostris* infectados, pero sin signos evidentes de infección.

Por otro lado, se detectó también una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* con el complejo de genes de toxicidad *Pir* que causa AHPND/EMS (VP_{AHPND}) en todos los canales de marea con una prevalencia de 3,51% (tabla 9), y bajo salinidades de 5 a 39 ppt, discutiendo con la OIE (2017), ya que no reporta la presencia de este patógeno en langostinos silvestres, y además manifiesta que la baja salinidad del agua (entre 5 a 10 ppt) reduce la prevalencia del patógeno. Además, se detectó infección de dicha bacteria en *L. stylirostris*, pues, la OIE (2016) manifiesta que las especies susceptibles son *L. vannamei*, *L. monodon* y *L. chinensis*.

Resaltando también que los langostinos no mostraron signos de enfermedad, puesto que AHPND causa palidez y atrofia del hepatopáncreas que puede reducir el tamaño del órgano en un 50% o más, lo cual se puede evidenciar externamente (Soto et al. 2015; Tran et al. 2013; OIE 2017; De La Peña et al. 2015). Es posible, que esta cepa bacteriana no tenga la misma patogenicidad que la reportada en México y Asia, con mortalidades masivas entre los 20 a 30 días de cultivo (Soto et al. 2015; Tran et al. 2013; NACA 2012; Nunan et al. 2014) o la de Filipinas con mortalidades después de los 30 días de cultivo (De La Peña et al. 2015), ya que se han obtenido resultados positivos para VP_{AHPND} en langostinos de centros de cultivo en Tumbes, sin embargo no se ha reportado altas mortalidades, en estadios juvenil y adulto.

Para corroborar este hecho, SANIPES realizó bioensayos con la cepa obtenida de langostinos de cultivo, inoculando por vía oral 10^6 UFC/g en postlarvas PL-12 y manteniéndolas durante 15 días, sin embargo, no se observó mortalidad durante el bioensayo (datos no publicados), en comparación con el realizado por

Nunan et al. (2014), quienes inoculando 10^8 UFC/g en langostinos de 3 g, observaron mortalidad dentro de las 12 horas con el 100% a los 4 días.

Con respecto a IMNV, los langostinos *L. vannamei* y *L. stylirostris* de los 7 canales de mareas de Tumbes durante los muestreos resultaron negativos, confirmando lo reportado por Alfaro y Guevara (2007, 2008 y 2011), quienes manifiestan que las poblaciones de langostinos silvestres colectados se encuentran libres de este agente patógeno, siendo los mismos resultados los obtenidos en langostinos de centros de cultivo de Tumbes monitoreados por el Sanipes (datos no publicados). Lo que indica que el virus, que por el momento solo se ha reportado en Brasil, no se ha manifestado en nuestro territorio por las barreras sanitarias brindadas por el organismo responsable.

Por lo que es necesario el monitoreo sanitario de patógenos exóticos como el IMNV; que si bien, a nivel de América, sólo ha sido reportado en Brasil (Lightner 2011) he infecta a *L. vannamei*, y experimentalmente en *L. stylirostris* (Tang et al. 2005); su aparición en poblaciones silvestres puede poner en riesgo el estatus sanitario de los animales de cultivo llegando a mostrar altos niveles de prevalencia y mortalidad debido al estrés producto de las altas densidades de población, fluctuaciones de temperatura, salinidad y nutrientes que alteran la calidad del agua del cultivo (Alfaro y Guevara 2011; Grant and Jones 2010).

Así mismo, la detección de brotes de enfermedades en poblaciones silvestres es bastante difícil, debido a que, cuando ocurre una epidemia, esta se localiza en una zona, luego se diluye debido a la baja densidad de los organismos susceptibles (Alfaro y Guevara 2011; Alfaro, Guevara y Gonzales 2010).

6. CONCLUSIONES

1. Se registró una prevalencia de 7,58% de IHHNV en ejemplares de langostinos silvestres: *L. vannamei* y *L. stylirostris* en toda el área de estudio. Las prevalencias por estación de muestreo fueron: La Boca del Río Tumbes (9,82%), El Alcalde (6,47%), El Jelí (6,47%), El Bendito (6,47%), La Soledad (12,11%), El Algarrobo (2,80%) y La Envidia (8,91%).
2. Se registró una prevalencia de 3,51% de una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* con el complejo de genes de toxicidad *Pir* que causa AHPND (VP_{AHPND}) en ejemplares de langostinos silvestres *L. vannamei* y *L. stylirostris* en toda el área de estudio. Las prevalencias por estación de muestreo fueron: La Boca del Río Tumbes (4,49%), El Alcalde (1,42%), El Jelí (4,49%), El Bendito (2,74%), La Soledad (4,21%), El Algarrobo (1,32%) y La Envidia (5,90%).
3. No se detectó presencia de IMNV en las poblaciones silvestres de langostino del género *Litopenaeus* en la región de Tumbes.

7. RECOMENDACIONES

- Implementar medidas preventivas como vigilancias epidemiológicas para proteger a las poblaciones silvestres y prevenir al sector acuícola de cuantiosas pérdidas económicas.
- Realizar investigaciones para identificar la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* con el complejo de genes de toxicidad *Pir* que causa AHPND hallada en Tumbes para confirmar si es la misma cepa o parecida a las encontradas en Asia o México.
- Determinar la carga viral y bacteriana de los efluentes de langostineras aledaños a los canales de marea.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfaro, R., y M. Guevara. 2007. Vigilancia Epidemiológica del virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV) en poblaciones silvestres de *L. vannamei* y *L. stylirostris* de la Región de Tumbes. Informe anual Imarpe N°4.
- Alfaro, R., y M. Guevara. 2008. Vigilancia Epidemiológica del virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV) y *P. vannamei* Nodavirus (PvNV) en canales de marea y estanques de cultivo intensivo de la Región de Tumbes. *Boletín informativo Imarpe, octubre 2008(2)*.
- Alfaro, R., M. Guevara, y I. Gonzales. 2010. Prevalencia y distribución de los principales agentes etiológicos que afectan los langostinos silvestres en Tumbes, Perú. *Rev. Peru. Biol.* 17(3):359-364.
- Alfaro, R., y M. Guevara. 2011. El Virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV) en poblaciones silvestres de *Penaeus vannamei* y *Penaeus stylirostris* en Tumbes. *Informe Imarpe* 38(4).
- Bray, W. A., A. L. Lawrence, y J. R. Leung-Trujillo. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture* 122(2-3): 133-146.
- Cuéllar-Anjel, J., C. Pantoja, D. Lightner, A. Lemos, E. Mendes, T. Vasconcelos, V. Da Silva, et al. 2008. *Guía técnica – Patología e inmunología de camarones peneidos*. Rep. De Panamá, Panamá: OIRSA, 270 pp.
- Dangtip, S., R. Sirikharinb, P. Sanguanrut, S. Thitamadee, K. Sritunyalucksana, S. Taengchaiyaphum, R. Mavichak, P. Proespraiwong, and T. Flegel. 2015. AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports* 2: 158–162.
- De La Peña, L., N. Cabillon, D. Cathedral, E. Amar, R. Usero, W. Monotilla, A. Calpe, D. Fernandez, and C. Saloma. 2015. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis Aquat Org* 116: 251–254.

- Escobedo, C., and J. Ibarra. 2014. Susceptibility to an inoculum of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in three batches of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *ZooKeys*. 457: 365–365.
- García, S., y L. Le Reste. 1986. Ciclos vitales, dinámica explotación y ordenación de las poblaciones de camarones peneidos costeros.
- Godínez, D., O. González, A. Hernández, A. García, J. Gamboa, J. Guadalupe, y E. Godínez. 2012. Principales patógenos virales de camarón en América y su relación con ambientes de baja salinidad. *Ra Ximhai* 8(3): 61–69
- Gomez, B., S. Soto, R. Lozano, and M. Betancourt. 2014. Draft Genome Sequence of *Vibrio parahaemolyticus* Strain M0605, Which Causes Severe Mortalities of Shrimps in Mexico. *Genome Announcements* 2(2): 1-2
- Grant A. and S. Jones. 2010. Pathway of effects between wild and farmed finfish and shellfish in Canada: Potential factors and interactions impacting the bi-directional transmission of pathogens. *Canadian Science Advisory Secretariat* 6: 58
- Guevara, M., y R. Alfaro. 2012. Patógenos introducidos al Perú en post larvas de *Litopenaeus vannamei* importadas. *Rev. Peru. Biol.* 19(2): 181-186.
- Guzmán, F. Molina, R. Pérez, J. Ibarra, y L. Galavíz. 2009. Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) y virus del síndrome de Taura (TSV) en camarón silvestre (*Farfantepenaeus aztecus* Ives, 1891 y *Litopenaeus setiferus* Linnaeus, 1767) de La Laguna Madre, Golfo de México. *Rev. De Biología Marina y Oceanografía* 44(3): 663- 672.
- Kline, R.L., T.A. Brothers, R. Brookmeyer, S. Zeger and T.C. Quinn. 1989. Evaluation of human immunodeficiency virus seroprevalence in population surveys using pooled sera. *Journal of Clinical Microbiology* 27(7): 1449-1452.
- Lee, C., I. Tung, Y. Yanga, T. Yanga, T. Kod, Y. Huanga, J. Huanga, et al. 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *PNAS* 112(34): 1–10

- Lightner, D. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*. 106: 110–130.
- Lightner, D., R. Redman, K. Tang, K. Tang, N. Schofield, L. Mohny, L. Nunan, and S. Navarro. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110: 174–183.
- Méndez, M. 1981. Claves de identificación y distribución de los langostinos y camarones (48rustácea: decapoda) del mar y ríos de la costa del Perú. *Boletín Imarpe* 5: 1-170.
- Mendoza, D. 2011. *Panorama de la Acuicultura Mundial, en América Latina y el Caribe y en el Perú*. Lima, Perú: Dirección General de Acuicultura, *Ministerio de la Producción* 40-42.
- Ministerio de la producción. 2017. Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola. *Perú* 1-195. <http://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/shortcode/oe-documentos/publicaciones/publicaciones-anuales/item/825-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2017>
- Montiel de Morales, M., S. E. Laramore, C. R. Laramore, F. Morales, y J. Scarpa. 2007. Transmisión experimental del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) en *Litopenaeus vannamei*: Influencia de la salinidad en la expresión de la infección. *CIENCIA* 15(3): 311 – 318
- Moreno, F. 2010. Industria del camarón: su responsabilidad en la desaparición de los manglares y la contaminación acuática. *Redvet* 11(5):1-20
- Motte, E., E. Yugcha, J. Luzardo, F. Castro, G. Leclercq, J. Rodríguez, P. Miranda, et al. 2003. Prevention of IHHNV vertical transmission in the White shrimp *L. vannamei*. *Aquaculture* 219(1-4): 57–70.
- NACA (Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific). 2012. Diseases of crustaceans: Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS). *Tarjeta de enfermedad*. <http://library.enaca.org/Health/DiseaseLibrary/ahpns-disease-card.pdf>

- Nunan, L., D. Lightner, C. Pantoja, and S. Gomez. 2014. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis Aquat Org* 111: 81–86
- Nunes, A., P. Cunha, y P. Vasconcelos. 2004. Camaronicultura amenazada. *Rev. Panoram. Aquic.* 83: 37–51
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2016. Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-acuatico/>
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2017. Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. http://www.oie.int/index.php?id=171&L=2&htmfile=chaptre_ahpnd.htm
- Poulos, B., and D. Lightner. 2006. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Dis Aquat Org* 73: 69–72
- Poulos, B., K. Tang, C. Pantoja, J. Bonami, and D. Lightner. 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology* 87: 987–996
- Rodríguez, J., and G. Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191(1-3): 109-119
- Sergeant, ESG. 2019. Epitools epidemiological calculators. Ausvet Pty Ltd. <http://epitools.ausvet.com.au>.
- Soto, S., B. Gomez, R. Lozano, M. Betancourt, and M. Morales. 2015. Field and Experimental Evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Cultured Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *AEM* 81(5)
- Tang, K., C. Pantoja, B. Poulos, R. Redman, and D. Lightner. 2005. *In situ* hybridization demonstrates that *L. vannamei*, *L. stylirostris* and *L. monodon*

are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 63(2-3): 261-165.

Tang K., S. Navarro, and D. Lightner. 2007. A PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 74: 165–170

Tauhid, I., and L. Lestari. 2009. Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Indonesia. *The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh* 61(3).

Tran, L., L. Nunan, R. Redman, L. Redman, L. Mohny, C. Pantoja, K. Fitzsimmons, and D. Lightner. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 105: 45–55.

ANEXOS

Anexo 1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

DETECCIÓN DE IMNV POR RT NESTED PCR:

PCR (Fragmento: 328 bp)		
60, 90 °C	30 minutos, 2 minutos	1 ciclo
95, 60 °C	45 segundos, 45 segundos	39 ciclos
60 °C	7 minutos	1 ciclo

NESTED PCR (Fragmento: 139 bp)		
95 °C	2 minutos	1 ciclo
95, 65, 72 °C	30 segundos, 30 segundos, 30 segundos	39 ciclos
72 °C	2 minutos	1 ciclo

DETECCIÓN DE IHHNV POR SIMPLE PCR:

PCR (Fragmento: 389 bp)		
95°C	5 minutos	1 ciclo
95°C	30 segundos	
55°C	30 segundos	35 ciclos
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	1 ciclo
4°C	∞	

LEYENDA: INFINITO (∞)

DETECCIÓN DE AHPND POR NESTED PCR:

PCR (Fragmento: 1264 bp)		
94°C	3 minutos	1 ciclo
94°C	30 segundos	
55°C	35 segundos	30 ciclos
72°C	45 segundos	
72°C	5 minutos	1 ciclo
4°C	∞	

NESTED PCR (Fragmento: 230 bp)		
94°C	3 minutos	1 ciclo
94°C	20 segundos	
55 °C	20 segundos	25 ciclos
72°C	20 segundos	
72°C	4 minutos	1 ciclo
4°C	∞	

LEYENDA: INFINITO (∞)