

**Universidad Nacional
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Presencia y genotipos del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética
infecciosa (IHHNV) en fincas de cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus
vannamei*) en Costa Rica**

Modalidad: Tesis de grado

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico de
Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Jose Francisco Parajeles Mora

Campus Presbítero Benjamín Núñez, Heredia

2019

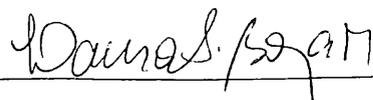
TRIBUNAL EXAMINADOR

Ricardo Mora Cartín, M. Sc



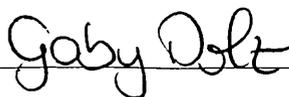
Representante Decanato Facultad Ciencias de la Salud

Laura S. Bouza Mora, M. Sc



Representante Dirección Escuela Medicina Veterinaria

Gaby Dolz Wiedner, PhD.



Tutora

Antony Solórzano Morales, Lic.



Lector

Nelson Peña Navarro, M. Sc



Lector

Fecha: 30/08/2019

DEDICATORIA

A mis padres, Jose y Guiselle, que gracias a ellos y a su apoyo incondicional durante todo este proceso es que ahora culmino de manera exitosa esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

A Dios en primer lugar, que es el motor de mi vida.

A mi familia, por apoyarme con este sueño de convertirme en veterinario.

A todos mis amigos y personas cercanas que se cruzaron durante el camino a llenarme de buenos deseos y me ayudaron de una u otra manera.

A mi tutora por guiarme con tanta paciencia y dedicación durante el proceso, de la cual aprendí un sinfín de cosas y me hizo enamorarme del mundo de la investigación.

A mis lectores, por compartirme tanto conocimiento y ayudarme de gran manera durante todo el proceso.

Al proyecto FIDA-UNA por financiar el proyecto "Situación Sanitaria del Camarón Blanco (*penaeus vannamei*) en Zonas Productivas de Costa Rica", del cual deriva este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE ABREVIATURAS	viii
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación	8
1.2.1 Hipótesis	9
1.3 Objetivos.....	9
1.3.1 Objetivo General	9
1.3.2 Objetivos Específicos	9
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
2.1 Área de estudio	11
2.2 Tipo y diseño de estudio.....	11
2.3 Recolecta de muestras	11
2.4 Análisis molecular y secuenciación.....	12
2.5 Toma de parámetros físico-químicos del agua, coordenadas geográficas y análisis estadístico	15
3 RESULTADOS	17
4 DISCUSIÓN.....	29
5 CONCLUSIONES.....	36
6 RECOMENDACIONES	38
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
8 ANEXOS.....	53
8.1 Encuesta.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resultado del análisis mediante PCR que detecta todas las variantes genéticas de IHHNV de las muestras de agua, postlarvas y estómagos y hepatopáncreas de los camarones juveniles en 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya, Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.....	11
Cuadro 2. Resultado del análisis mediante PCR que detecta exclusivamente los linajes patógenos de IHHNV de las muestras de agua, postlarvas y estómagos y hepatopáncreas de los camarones juveniles en 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya, Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.....	14
Cuadro 3. Cuadro comparativo de los resultados obtenidos utilizando el protocolo que detecta todas las variantes de IHHNV y el protocolo que detecta los linajes patógenos de IHHNV de 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya, Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.....	15
Cuadro 4. Características generales de manejo de 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya, Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.....	17
Cuadro 5. Medidas profilácticas realizadas en las 15 fincas del estudio, para el control de enfermedades en 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya, Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.....	18
Cuadro 6. Conocimiento previo, presencia y estatus sanitario actual de IHHNV de 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya, Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.....	19
Cuadro 7. Parámetros fisico-químicos de la calidad del agua de 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya, Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.....	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Deformación del <i>rostrum</i> y enanismo.....	3
Figura 2. Cuerpos de inclusión eosinofílicos producidos por IHHNV.....	4
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR que detecta todas las variantes genéticas de IHHNV, mostrando la presencia de IHHNV en todas las muestras analizadas de la Finca 11 del estudio.....	10
Figura 4. Cladograma de la secuenciación de las muestras positivas seleccionadas de los productos del PCR que detecta todas las variantes genéticas de IHHNV de 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya, Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.....	12
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR que detecta exclusivamente los linajes patógenos de IHHNV, mostrando la presencia de IHHNV en todas las muestras analizadas de la Finca 15 del estudio.....	13
Figura 6. Cladograma de la secuenciación de las muestras positivas seleccionadas de los productos del PCR que detecta exclusivamente los linajes patógenos de IHHNV de 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya, Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.....	15
Figura 7. Distribución geográfica de las 15 fincas productivas de camarón positivas y negativas a IHHNV en Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.....	16

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization)

FDA: Food and Drug Administration

IHHNV: Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus)

LMRMV: Límites Máximos para Residuos de Medicamentos Veterinarios

OIE: Oficina Internacional de Epizootias/ Organización Mundial de Salud Animal

ORF: Marco de Lectura Abierto (Open Reading Frame)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PFPAS-MAG: Programa del Fomento de la Producción Agropecuaria Sostenible- Ministerio de Agricultura y Ganadería

SENASA: Servicio Nacional de Salud Animal

WAHIS: Sistema Mundial de Información Zoonosanitaria (World Animal Health Information System)

RESUMEN

El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) pertenece a la familia Parvoviridae y causa crecimiento disminuido e irregular con presencia de deformidades cuticulares en el rostrum y los apéndices anteriores del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Aunque no se reporta una alta mortalidad, produce una reducción del crecimiento del 10-50%, lo que provoca un menor peso de cosecha y precios de mercado. Se han descrito tres genotipos patógenos y dos no patógenos de IHHNV (linaje 1-3 y tipos A-B, respectivamente).

La presencia de IHHNV se diagnosticó por primera vez en Costa Rica en 2016 en una granja mediante técnicas moleculares; sin embargo, el genotipo no fue determinado. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia y genotipos de IHHNV presentes en granjas en Costa Rica mediante el cultivo de *L. vannamei*. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en 15 granjas camaroneras distribuidas en el Golfo de Nicoya y el Pacífico Central. Entre los años 2017 y 2018 se recolectaron muestras de agua, postlarvas y camarones juveniles durante un ciclo de producción.

Las muestras se sometieron a extracción de ADN y se analizaron mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR), utilizando distintos protocolos e iniciadores para determinar los genotipos de IHHNV presentes en el país. El día de la recolecta de los camarones juveniles se aplicó una encuesta a los productores para conocer sobre las condiciones de manejo y se midieron los parámetros físico-químicos del agua del estanque. La información obtenida mediante las encuestas y los resultados del PCR se procesaron utilizando el programa estadístico SAS para determinar factores de riesgo.

La presencia de IHHNV se determinó en el 86,6% (13/15) de las fincas analizadas y en todos los tipos de muestras analizadas (agua, postlarvas, estómagos y hepatopáncreas). La secuenciación de los productos amplificados determinó la presencia de linaje 3 de IHHNV en todas las muestras positivas, mostrando de un 99.2-100.0% de identidad con la secuencia KM485615.1 de Venezuela reportada en GenBank, con una variación de 1-3 nucleótidos. Se determinó un uso indiscriminado y sin regulación de antibióticos en el área de producción de camarones y con prácticas de manejo deficientes, sobre todo los parámetros físico-químicos del agua, que podrían estar causando en conjunto con la presencia de cepas patógenas de IHHNV, una baja producción.

Se recomienda realizar estudios para evaluar las pérdidas económicas que este agente podría ocasionar en estas fincas e implementar medidas de prevención y control.

ABSTRACT

The infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) belongs to the family Parvoviridae and causes reduced and irregular growth with cuticular deformities of the rostrum and the previous appendices of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Although no high mortality is reported, it produces 10-50% growth reduction, causing a lower weight and market prices. Three pathogenic and two nonpathogenic genotypes of IHHNV (lineage 1-3 and types A-B, respectively) have been described.

The presence of IHHNV was diagnosed for the first time in Costa Rica in 2016 in a farm using molecular techniques; however, the genotype was not determined. The objective of the present study was to determine the presence and genotypes of IHHNV present in farms in Costa Rica by cultivating *L. vannamei*. A cross-sectional descriptive study was carried out in 15 shrimp farms distributed in the northern Pacific region. Between 2017 and 2018, water samples, postlarvae and juvenile shrimp were collected during a production cycle.

The samples were subjected to DNA extraction and analyzed by the polymerase chain reaction (PCR) technique, using different protocols and primers to determine the genotypes of IHHNV present in our country. On the day of the collection of the juvenile shrimp, a survey was applied to the producers to know about the handling conditions and the physical-chemical parameters of the pond water were measured. The information obtained through the surveys and the PCR results were processed using the SAS statistical program to determine risk factors.

The presence of IHHNV was determined in 86.6% (13/15) of the farms analyzed and in all types of samples analyzed (water, postlarvae, stomachs and hepatopancreas). The sequencing of the amplified products determined the presence of IHHNV lineage 3 in all positive samples,

showing a 99.2-100.0% identity with the KM485615.1 sequence of Venezuela reported in GenBank, with a variation of 1-3 nucleotides.

An indiscriminate and unregulated use of antibiotics was determined in the shrimp production area and the production of shrimp with poor management practices, especially the physical-chemical parameters of the water, which could be causing it, together with the presence of pathogenic strains of IHHNV a low productivity.

It is recommended to conduct studies to assess the economic losses that this agent could have in these farms, and to implement prevention and control measures.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La acuicultura representa un importante sector de la producción alimentaria mundial y constituye una importante fuente de proteínas de alta calidad, empleo e ingresos, siendo la base del sustento de una gran parte de la población mundial (PFPAS-MAG 2007). En las últimas tres décadas, la acuicultura ha registrado un crecimiento significativo y más rápido entre los sectores productores de alimentos y se ha convertido en una industria global robusta y vital (FAO 2011). De hecho, entre los años 1961 a 2016, el aumento anual medio del consumo mundial de pescado comestible (3,2%) superó al crecimiento de la población (1,6%) y también al de la carne procedente de todos los animales terrestres juntos (FAO 2018).

A nivel nacional la actividad acuícola viene desarrollándose vertiginosamente, principalmente en el rubro de producción de la tilapia, la cual representa un 80% de la producción acuícola total; alcanzando para el 2018 una producción de 16.667 toneladas métricas por año; seguido de la producción de camarones marinos los cuales representaron un 13% de la producción acuícola total, generando 2689 toneladas en el mismo periodo (Peña and Chacón 2019).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO 2005a) la camaronicultura inició en Costa Rica en 1975 con el establecimiento de la empresa Maricultura S.A., empresa privada establecida en Chomes, Puntarenas, con el cultivo del camarón blanco. Esta ha sido una de las actividades acuícolas productivas que ha experimentado un mayor auge en la última década, registrándose para el 2016 una producción

de 3000 toneladas métricas, y generando ingresos aproximadamente de 3 millones de dólares (FAO 2016).

El camarón es un producto de alto valor para la exportación, se produce principalmente en Asia y América Latina, generando riqueza en muchas regiones de países en vías de desarrollo. Durante la década pasada surgieron considerables problemas en el cultivo del camarón, principalmente debido a enfermedades infecciosas. En particular, América Latina, donde *Litopenaeus vannamei* es la principal especie cultivada, la producción de camarones se ha caracterizado en la última década por diversas restricciones, siendo la ocurrencia de enfermedades de origen viral la más importante, habiéndose reportado 20 enfermedades virales como patógenas para especies de camarón silvestre o de cultivo, para el año 2008 (FAO 2004; Morales et al. 2011).

El Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) únicamente realiza vigilancia epidemiológica pasiva cuando se detectan mortalidades agudas o crónicas en los camarones. Así se determinó, por ejemplo, el ingreso de la enfermedad viral síndrome de la mancha blanca (WSSV) en el 2000 al país, la cual ocasionó altas mortalidades (60 a 70%), actualmente se considera una enfermedad endémica, que ocurre cuando los factores ambientales y nutricionales son desfavorables (SENASA 2010). Mediante esta vigilancia epidemiológica pasiva se han detectado y reportado al Organismo Internacional de Sanidad Animal (OIE) la presencia de otras enfermedades de etiología viral como es el caso de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHN) (OIE 2015).

El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) fue descubierto en Hawái en 1981, año en el cual provocó la mortalidad de aproximadamente el 90% de los camarones de la especie *Litopenaeus stylirostris* cultivados en esa isla (Lightner et

al. 1983a, b; Tang and Lightner 2002). Desde entonces el virus se ha detectado en otras especies de la familia de los peneidos en poblaciones alrededor del mundo, incluyendo América, Oceanía y Asia (Flegel 1997; Lightner 2001; Tang and Lightner 2002).

En el primer artículo publicado sobre IHHNV en 1983, se sugirió que el IHHNV era un picornavirus o un parvovirus (Lightner et al. 1983a). Posteriormente, mediante estudios ultraestructurales e histoquímicos se clasificó provisionalmente con los picornavirus, debido al tamaño del virión y las características morfológicas de las células infectadas (Lightner 1985). Algunos años después, luego de una caracterización más precisa, se logró demostrar que el IHHNV estaba más estrechamente relacionado con los parvovirus que picornavirus (Bonami et al. 1990; Lightner and Redman 1998).

Actualmente se ha logrado secuenciar casi todo el genoma del IHHNV y se conoce que este es un virus icosaédrico, no envuelto, con un genoma de ADN de una sola cadena de 4,1 kb, de 3909 pares de bases que presenta tres grandes marcos de lectura abierta (ORF) (Nunan et al. 2000; Shike et al. 2000). Está estrechamente relacionado con los virus del mosquito y se ha colocado tentativamente como una especie del género Brevidensovirus dentro de la familia Parvoviridae (Tattersall et al. 2005).

Aunque en los años ochenta se reportó que el IHHNV era extremadamente virulento para la especie *L. stylirostris*, en los últimos años se ha registrado una disminución de la mortalidad en esta población. Inicialmente se sospechó que la reducción en la virulencia podría deberse a cambios en el genoma del IHHNV (Morales et al. 1999). En el año 2002 se analizó el 70% del genoma de 14 aislamientos de IHHNV que se recolectaron durante 1982 a 1997 en las especies *L. stylirostris* y *L. vannamei*.

Los resultados establecieron variaciones muy bajas (menos de un 0.5%) entre las secuencias de aislamientos tempranos y recientes, además no se determinó una asociación aparente entre la disminución de la virulencia del IHHNV y las sustituciones nucleotídicas particulares establecidas. Sin embargo, se estableció que el porcentaje de sustitución nucleotídica era más alto en la región de las proteínas de cápside (ORF3) que en la región de las proteínas no estructurales (ORF 1) (Tang and Lightner 2002).

Actualmente se describen tres linajes (I, II y III) de IHHNV patógenos para las especies *L. vannamei* y *Litopenaeus monodon*, el linaje I se reportó en Australia, el II en el Sur de Asia y el III en América y el Este de Asia (principalmente Filipinas). Adicionalmente existen otras dos secuencias, tipo A y B, que son secuencias de IHHNV que se encuentran incorporadas en el genoma de los peneidos y no son infecciosas para las especies hospederas *L. vannamei* y *L. monodon*, y fueron reportadas en Madagascar (A), Australia (B) y Tanzania (B) (Silva et al. 2014).

La presencia de los linajes patógenos de IHHNV se ha determinado en todos los estadios de vida de *L. vannamei* (huevos, larvas, postlarvas, juveniles y adultos) (Montgomery et al. 2007). Los huevos de hembras infectadas con el IHHNV generalmente no llegan a desarrollarse ni a eclosionar, y aquellos que eclosionan muestran una alta prevalencia de infección, por lo que los animales que sobreviven pueden portar el virus de por vida y pasarlo a la progenie y a otras poblaciones, tanto por transmisión vertical como horizontal (Sinderman and Lightner 1988; Montgomery et al. 2007).

La transmisión horizontal ocurre por ingesta de camarones muertos infectados o por contacto con agua que contenga animales infectados, así como por vectores como las aves; las cuales pueden excretar partículas virales en heces que permanecerán infecciosas en el ambiente

La disponibilidad de métodos que permiten un diagnóstico temprano de la infección es esencial para establecer rutinas de monitoreo del estatus de salud de la finca y para prevenir brotes de la enfermedad (Wyban et al. 1992). Tradicionalmente se ha utilizado la histopatología como método de diagnóstico de IHHNV, la cual consiste en el examen histológico de tejido de origen tanto endodérmico como ectodérmico; donde se observan cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares rodeados por cromatina compacta en células con núcleos hipertrofiados (Figura 2). Sin embargo, estos cuerpos de inclusión pueden ser confundidos con los cuerpos de inclusión producidos por el virus de la mancha blanca (OIE 2017). En el año 2000 se desarrolló la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de IHHNV, la cual constituye una prueba más robusta que ofrece una alta sensibilidad y especificidad (Rai et al. 2012).

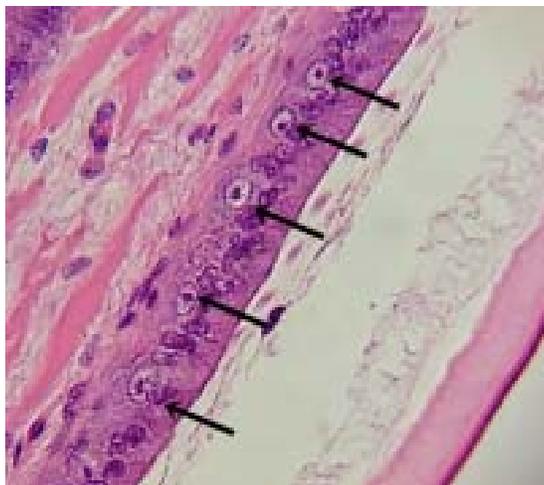


Figura 2. Cuerpos de inclusión eosinofílicos producidos por IHHNV (Peña and Varela 2016).

Debido a que existen múltiples variantes de IHHNV, algunas no son detectadas por todos los protocolos de PCR disponibles. Los cebadores 392 F/R y 389 F/R, los cuales amplifican un marco de lectura abierto de la proteína no estructural 1 (ORF1) son los más recomendados para

detectar todas las variantes (tanto las patógenas como las no patógenas) de IHHNV (Dhar et al 2019). La OIE recomienda la utilización del denominado "cebador universal" 389 F/R en primera instancia para realizar diagnóstico de IHHNV, y en caso de obtener resultados ambiguos, proceder a utilizar otros cebadores de una región distinta o confirmar mediante otro método diagnóstico como hibridación *in situ* o secuenciación. Otros protocolos de PCR utilizados para el diagnóstico de IHHNV son los que utilizan los cebadores 77012F/77353R, que amplifican una región del genoma situada entre la región que codifica una proteína no estructural y la que codifica una proteína de cápside, presente en todas las variantes geográficas de IHHNV, por el otro lado, los que utilizan los cebadores 309 F/R, amplifican un segmento diferente y más pequeño de la ORF1, específico de los linajes patógenos (PCR genotipo específico); y finalmente el cebador MG831 F/R, que amplifica una región de la proteína específica para los linajes no patógenos (OIE 2017).

Actualmente existe muy poca información a nivel mundial acerca de factores de riesgo relacionados a la presencia de IHHNV en fincas camaroneras. Un estudio realizado en el año 2016 en Shangai, donde se analizó variables como la temperatura, salinidad, pH y concentración de oxígeno disuelto; estableció la temperatura del agua como el factor de mayor importancia asociado con la presencia de IHHNV, ya que, a mayor temperatura del agua, mayor presencia de IHHNV (Chai et al. 2016).

La presencia de IHHNV en Costa Rica fue reportada por primera vez en el año 2006 ante la OIE; sin embargo, en el 2018 no se encontraron datos acerca del estado sanitario del país con respecto a este agente en el Sistema Mundial de Información Zoonosaria (WAHIS) (OIE 2019). Cabe destacar, que además no existe estudio alguno acerca de los genotipos de IHHNV presentes en camarones de nuestro país.

1.2 Justificación

Debido al auge de la camaronicultura a nivel mundial en los últimos años, se han implementado estrategias para optimizar esta actividad. Una de estas estrategias es la importación de nauplios de camarón blanco, para lograr un mejoramiento genético en las fincas, sin embargo, se desconoce si el producto viene libre de patógenos a Costa Rica (SENASA 2013). Contrario al resto del mundo, nuestro país muestra un declive importante en la producción de camarones, existiendo actualmente tan solo 89 fincas en todo el territorio nacional debido, sobre todo, al bajo rendimiento productivo de las fincas (Comunicación personal Dra. Carolina Elizondo, 2019).

Además, no existen estudios en el país que hayan cumplido con los requisitos que solicita la OIE para confirmar un caso positivo de IHHNV, que consiste en diagnosticar la presencia del agente mediante dos de tres técnicas que se enumeran a continuación: 1. hibridación *in-situ*, 2. PCR genotipo específico, 3. secuenciación. Tampoco se han determinado hasta la fecha los genotipos de IHHNV presentes en el país (OIE 2018). El único trabajo que reportó la presencia de IHHNV en el país, se realizó en una finca, y se diagnosticó mediante histopatología y PCR convencional que detecta todos los linajes del virus, constituyendo un reporte de caso sospechoso de IHHNV según la OIE (Peña and Varela 2016).

Por esto se requiere implementar un método de diagnóstico rápido y certero para utilizar en programas de vigilancia, además, determinar los genotipos de IHHNV presentes en el país, y determinar los factores asociados a la presencia de este patógeno en las fincas productoras de camarones. Finalmente, es de suma importancia involucrar al médico veterinario en la camaronicultura, con la finalidad de que pueda brindar apoyo a los productores y a las autoridades pertinentes para establecer programas de prevención (homólogos a los programas

de salud de hato implementados en otros sistemas productivos) y de control de agentes infecciosos, así como trabajar de forma interdisciplinaria con todos los profesionales involucrados en el desarrollo sostenible de la camaronicultura. El hecho de determinar la presencia de los genotipos de IHHNV en las fincas de camarones del país, puede facilitar la implementación de medidas preventivas para reducir el impacto productivo que ocasiona la enfermedad.

1.2.1 Hipótesis

H₀: No se encuentran diferentes genotipos de IHHNV en camarones en cultivos en Costa Rica.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar la presencia y genotipos de IHHNV en camarones de cultivo de la especie *L. vannamei* en 15 fincas de Costa Rica para recomendar medidas de prevención y control.

1.3.2 Objetivos Específicos

1.3.2.1 Validar técnicas de diagnóstico molecular para determinar la presencia de diferentes genotipos de IHHNV en Costa Rica.

1.3.2.2 Determinar la presencia de genotipos de IHHNV presentes en fincas de cultivo de camarón de Costa Rica por medio de la técnica de PCR y secuenciación.

1.3.2.3 Identificar factores de riesgo asociados a la presencia de IHHNV en las fincas del estudio.

1.3.2.4 Fomentar la participación de los médicos veterinarios en el área de la acuicultura.

1.3.2.5 Buscar soluciones en conjunto con el SENASA, para ofrecer éstas a los productores.

1.3.2.6 Realizar capacitaciones para brindar recomendaciones a los productores con respecto a buenas prácticas de bioseguridad y control y prevención del agente.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

Se trabajó en 15 de un total de 89 fincas de cultivo de camarones a nivel nacional localizadas en el Golfo de Nicoya y el Pacífico Central del país (Punta Morales, Colorado de Abangares, Quebrada Honda, Lepanto y Jicaral). La selección de las 15 fincas se realizó en forma no aleatoria, escogiendo fincas que estaban produciendo únicamente en un estanque, debido a que se asumió, que correspondían a las fincas más pequeñas en la que los productores contaban con menos apoyo técnico; y por tanto existía una probabilidad más alta de encontrar agentes infecciosos, además por facilidad de acceso al productor y por razones presupuestarias.

2.2 Tipo y diseño de estudio

Se realizó un estudio transversal descriptivo en cada una de las fincas participantes durante un ciclo de producción de tres a cuatro meses. Las fincas se visitaron al inicio del ciclo de producción y seis a siete semanas después de la siembra.

2.3 Recolecta de muestras

El día de siembra se visitó las fincas, y se tomó una muestra de 10 mL de agua del estanque, previo a la siembra. Además, se recolectó alrededor de 100 postlarvas en proceso de acondicionamiento, las cuales fueron almacenadas en alcohol al 95%. Siete semanas posteriores a la siembra, se visitó las fincas y se tomaron diez camarones en tres sitios diferentes (a la entrada de agua, en el medio y en el sitio de desagüe del estanque). A estos individuos se les extrajo el hepatopáncreas y el estómago, y se almacenaron en alcohol al 95%. Todas las muestras recolectadas fueron transportadas en refrigeración al Laboratorio de Medicina

Poblacional de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, donde se almacenaron a una temperatura de -80°C .

2.4 Análisis molecular y secuenciación

Debido a que las extracciones iniciales presentaron bajo contenido de ADN y alta contaminación con proteínas, fue necesario realizar lavados con fenol-cloroformo-alcoholisoamílico (PCI) a una concentración de 50:48:2 para extraer ADN de mayor pureza. El PCI es un solvente orgánico que permite obtener un alto rendimiento en la extracción debido a que produce la separación de los ácidos nucleicos y las proteínas (Red Biobancos 2011). Dicho proceso se realizó según el siguiente protocolo:

1. Selección de hepatopáncreas, estómagos y postlarvas respectivamente, los cuales se sacaron con pinzas estériles, se secó el exceso de alcohol en papel toalla y se colocaron en un tubo.
2. Adición de 300 μL de PBS (Tampón Fosfato Salino), mezclando el contenido del tubo mediante inversión y centrifugación a 5000g por cinco minutos a 4°C .
3. Remoción del PBS y adición de 200 μL de ATL (Tampón de lisis tisular).
4. Maceración de la muestra y adición de 200 μL de PCI, mezclar con vortex durante un minuto y centrifugación a 30000g durante cinco minutos a 4°C .
5. Transferencia de aproximadamente 150 μL de la fase acuosa con punta de 100 μL .
6. Adición de 180 μL de buffer ATL y 20 μL de proteinasa K.

A partir del punto anterior se procedió a realizar la extracción utilizando el kit Dneasy® Blood and Tissue, (QIAGEN, Venlo, Netherlands), procediendo según instrucciones del fabricante.

Se extrajo el ADN de las postlarvas, el hepatopáncreas y los estómagos de camarones juveniles (obtenidos a la entrada del agua, en el medio del estanque y en el sitio de desagüe del estanque) y del agua tomada previo a la siembra. Mediante espectrofotómetro se obtuvo las concentraciones de ADN (ng/ μ L) de las muestras.

Adicionalmente las muestras obtenidas tras la extracción de ADN de los camarones fueron sometidas, como parte de un control interno, a un PCR donde se amplificó el gen β -actina para determinar la integridad del ADN extraído en las muestras y descartar inhibiciones en la amplificación de este. Se utilizaron los iniciadores Actin-F (5'-CCCAGAGCAAGAGGTA-3') y Actin-R3 (5'GCGTATCCTTCGTAGATGGG-3'). El volumen de la reacción (25 μ L) incluyó 12.5 μ L de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X (ThermoScientific, Waltham, USA), 0.75 μ L de cada iniciador a una concentración de 10 pmol/ μ L, 1.5 μ L de ADN y 9.5 μ L de agua grado biología molecular (Thermo Scientific).

Los pasos de amplificación consistieron en: dos minutos de desnaturalización inicial a 94°C; 35 ciclos repetidos de desnaturalización (94°C por 20 seg), alineación (55°C por 10 seg), extensión (72°C por 30 seg) y una extensión final a 72°C por cinco minutos. El tamaño del fragmento amplificado fue de 339 pb, el cual fue visualizado en electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 0.5x (Tris Base, Ácido acético glacial, EDTA pH 8, 0.5 M), teñidos con Gel Red (0.5 μ g/mL) y corridos en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 45 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó GenRuler 100 bp DNA Ladder Plus (ThermoScientific, Waltham, USA) (Dhar et al. 2001).

Posteriormente las muestras se sometieron al análisis molecular de secuencias de la región codificante para una porción de la proteína no-estructural (ORF1) de IHHNV, mediante un PCR, que detecta todas las variantes genéticas de IHHNV (Tang et al. 2007). Se utilizaron los iniciadores 389F (5'-CGGAACACAACCCGACTTTA-3') y 389-R (5'GGCCAAGACCAAATACGAA-3') (OIE 2017).

Se utilizó el mismo protocolo para el gen actina descrito anteriormente, únicamente se aumentó el tiempo de la extensión final a cinco minutos. El tamaño del fragmento amplificado fue de 389 pb, el cual fue visualizado en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 0.5x (Tris Base, Ácido acético glacial, EDTA pH 8, 0.5 M), teñidos con Gel Red (0.5 µg/mL) y corridos en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 30 min. Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen (Seoul, Corea) para su purificación y secuenciación.

La secuencia parcial se alineó con el programa Bio Edit Sequence Alignment Editor® (Hall 1999) y se comparó mediante el algoritmo BLASTn con secuencias de la base de datos del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information). Posteriormente se importó en MEGA X (Kumar et al. 2018), para el diseño del cladograma. Se calcularon diez mil réplicas (Felsenstein 1985). Se utilizaron como referencia las secuencias DQ228358.1 (Madagascar) y EU675312.1 (Australia) para la secuencia tipo A, AY124937.1 (Tanzania) para la secuencia tipo B, CQ475529.1 (Australia) para el linaje I, AY362547.1 (Thailandia) para el linaje II y KM485615.1 (Venezuela) para el linaje III.

Seguidamente, las muestras que arrojaron resultados positivos fueron sometidas al análisis molecular de secuencias de la región codificante para una porción más pequeña de la proteína no-estructural (ORF1) de IHHNV, mediante un PCR, que detecta los linajes patógenos

de IHNV (Cowley et al. 2018). Se utilizaron los iniciadores 309F (5'-TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A-3') y 309-R (5'-TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A-3) (OIE 2017). Se utilizó el mismo protocolo de PCR descrito anteriormente para los iniciadores 389 F/R, únicamente ampliando el tiempo de extensión final a siete minutos.

El tamaño del fragmento amplificado fue de 309 pb, el cual fue visualizado en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 0.5x (Tris Base, Ácido acético glacial, EDTA pH 8, 0.5 M), teñidos con Gel Red (0.5 µg/mL) y corridos en una cámara de electroforesis a 90 voltios durante 45 min. Al igual que en el protocolo anterior, los productos de PCR fueron enviados a Macrogen para su purificación y secuenciación, se realizó alineación de la secuencia parcial y se creó el cladograma en MEGA X, utilizando las mismas secuencias de referencia.

2.5 Toma de parámetros físico-químicos del agua, coordenadas geográficas y análisis estadístico

Al momento de obtener las muestras juveniles de camarón se tomó además los parámetros fisicoquímicos de la calidad del agua (temperatura, oxígeno, pH y salinidad) con un multiparámetro portátil (Hanna® Instruments, USA). Así mismo, se registraron las coordenadas geográficas de las cuatro esquinas de cada uno de los estanques en los que se recolectaron los camarones juveniles, con un equipo de posicionamiento global (GPS GARMIN, USA).

A los productores de las fincas participantes se les aplicó una encuesta que permitió la recolecta de datos sobre las condiciones generales de la finca (área de cultivo, área del estanque y uso de agua), condiciones de manejo (densidad de siembra, origen de la postlarva, volumen de agua, tasa de recambio, métodos de alimentación, almacenamiento de alimento, conversión alimenticia, duración de ciclos de cultivo, tiempo de secado) y manejo sanitario (conocimiento

sobre enfermedades, presencia de enfermedades, uso y aplicación de antibióticos), durante la toma de muestras de camarones juveniles. Esta encuesta la realizó el M.Sc. Nelson Peña en el marco de su tesis en la Maestría en Enfermedades Tropicales, se contó con su aprobación para utilizar los datos (Anexo 1).

Se procedió a crear una base de datos en la que se incluyó el sitio de muestreo, fecha, coordenadas geográficas, respuestas de la encuesta, parámetros del agua y el resultado obtenido por PCR para IHHNV. Además, mediante la utilización del programa QGIS 2.14.0, se creó un mapa para mostrar la distribución de las fincas camaroneras analizadas y los casos positivos identificados.

Con la finalidad de realizar un análisis descriptivo de las condiciones de cada finca, se analizaron distintas variables tales como: área de cultivo, área del estanque, tipo de sistema de producción, distancia con la finca camaronera más cercana, tipo de geografía colindante al estanque, lugar de extracción del agua, densidades de siembra, origen de la postlarva, volumen de agua en el estanque, tasa de recambio del estanque, conversión alimenticia, ciclos de cultivo al año, uso de antibióticos, aplicación de periodos de secado, parámetros físico-químicos del agua, y presencia de agentes infecciosos y depredadores; las cuales se compararon estadísticamente con la presencia de IHHNV.

El análisis se realizó utilizando el programa estadístico SAS ® versión 9.4, donde se crearon tablas dinámicas y de contingencia con las frecuencias observadas, con un nivel de confianza de $\alpha=0.05$, se aplicó el estadístico Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher (Morales et al. 2011).

3 RESULTADOS

Un total de 86.7% (13/15) fincas resultaron positivas en el PCR, que detecta todas las variantes genéticas de IHHNV, tanto patógenas como no patógenas. En dos de las fincas se determinó la presencia del agente tanto en las muestras de agua, como en postlarvas y estómagos y hepatopáncreas de los camarones juveniles recolectados al inicio, mitad y final del estanque (Figura 3 y Cuadro 1). Las secuencias del segmento de 389 pares de bases de la proteína no estructural 1 de las muestras de Costa Rica resultaron ser 99.2% (386/389 pb) a 100% (389/389 pb) similares con la secuencia KM485615.1 de Venezuela reportada en GenBank, con una variación de uno a tres nucleótidos. El cladograma las agrupó dentro del linaje III del virus (Figura 4).

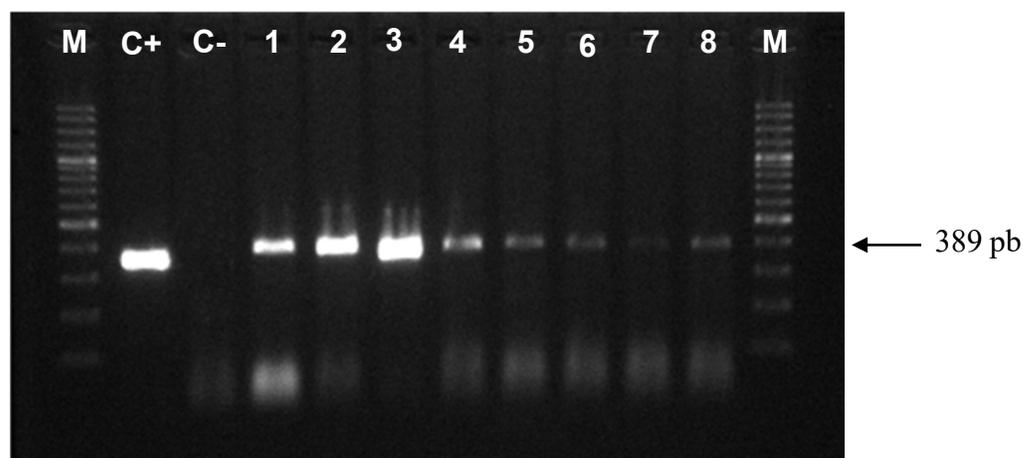


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR que detecta todas las variantes genéticas de IHHNV, mostrando la presencia de IHHNV en todas las muestras analizadas de la Finca 11 del estudio. M: marcador de peso molecular de 100 pb, C+: control positivo, C-: control negativo, 1: muestra de agua, 2: postlarvas, 3: hepatopáncreas de camarones al inicio del estanque, 4: estómago de camarones al inicio del estanque, 5: hepatopáncreas de camarones a la mitad del estanque, 6: estómagos de camarones a la mitad del estanque, 7: hepatopáncreas de camarones al final del estanque, 8: estómagos de camarones al final del estanque.

Cuadro 1. Resultado del análisis mediante PCR que detecta todas las variantes genéticas de IHHNV de las muestras de agua, postlarvas y estómagos y hepatopáncreas de los camarones juveniles en 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya y Pacífico Central de Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.

FINCA	Muestras analizadas mediante PCR							
	Agua	Postlarvas	H1	E1	H2	E2	H3	E3
1	+	-	+	+	-	-	+	+
2	+	-	-	+	-	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	+	-	+
5	+	+	+	-	+	+	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	+	+	+	+	-	-
8	+	+	-	+	+	-	-	+
9	-	+	-	+	+	+	-	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	+	-	-	-	-	-	+
13	+	+	-	+	-	-	-	+
14	+	+	-	-	-	-	-	-
15	+	-	+	+	+	+	-	+

H1: hepatopáncreas de camarones al inicio del estanque, E1: estómago de camarones al inicio del estanque, H2: hepatopáncreas de camarones a la mitad del estanque, E2: estómagos de camarones a la mitad del estanque, H3: hepatopáncreas de camarones al final del estanque, E3: estómagos de camarones al final del estanque. += Muestras enviadas para secuenciación.

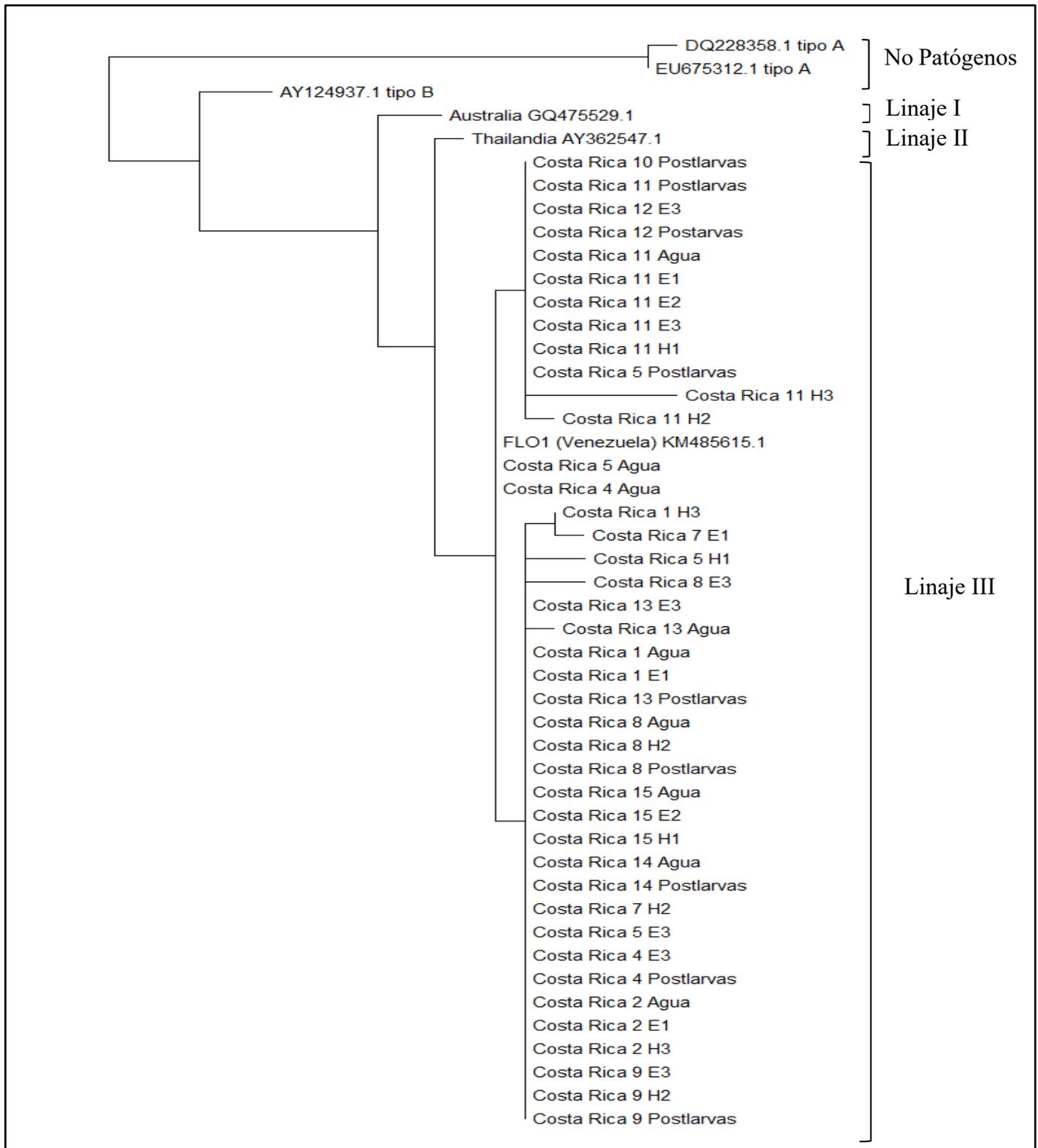


Figura 4. Cladograma de la secuenciación de las muestras positivas seleccionadas de los productos del PCR que detecta todas las variantes genéticas de IHHNV de 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya y Pacífico Central de Costa Rica, durante el periodo 2017-2018

Mediante el PCR que detecta exclusivamente los linajes patógenos, se confirmó la presencia de IHHNV en las mismas 13 fincas tanto en las muestras de agua, como en postlarvas y hepatopáncreas de los camarones juveniles recolectados al inicio, mitad y final del estanque (Figuras 5 y Cuadro 2), aunque no se detectó IHHNV patógeno en ocho de las muestras (finca 1 H1 y E3, finca 4 E1 y E2, finca 5 H1, H2 y E2 y finca 9 E2), que habían resultado positivas al protocolo anterior, que detectó todas las variantes del virus. En el Cuadro 3 se comparan los resultados de ambos protocolos. En la Figura 6 se muestra el cladograma que sitúa las muestras analizadas dentro del linaje III de IHHNV.

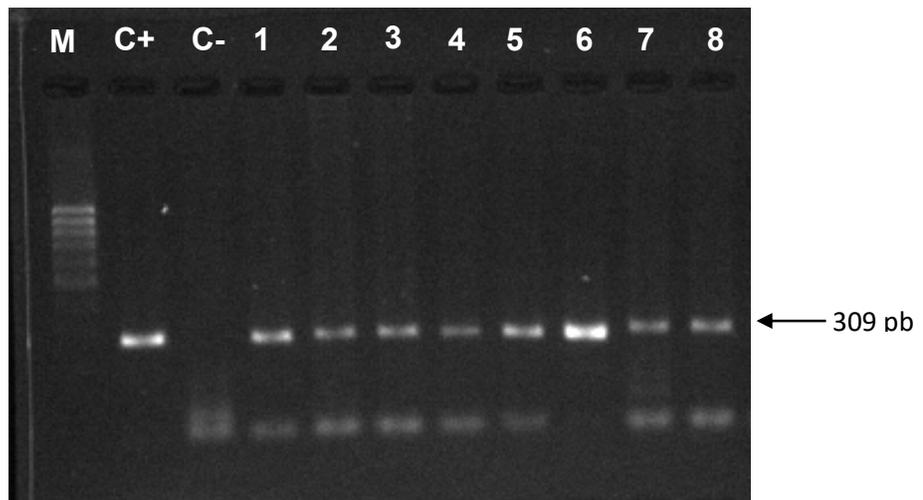


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR que detecta exclusivamente los linajes patógenos de IHHNV, mostrando la presencia de IHHNV en todas las muestras analizadas de la Finca 11 del estudio. M: marcador de peso molecular de 100 Kb, C-: control negativo, C+: control positivo, 1: muestra de agua, 2: postlarvas, 3: hepatopáncreas de camarones al inicio del estanque, 4: estómago de camarones al inicio del estanque, 5: hepatopáncreas de camarones a la mitad del estanque, 6: estómagos de camarones a la mitad del estanque, 7: hepatopáncreas de camarones al final del estanque, 8: estómagos de camarones al final del estanque.

Cuadro 2. Resultado del análisis mediante PCR que detecta exclusivamente los linajes patógenos de IHHNV de las muestras de agua, postlarvas y estómagos y hepatopáncreas de los camarones juveniles en 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya y Pacífico Central de Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.

FINCA	MUESTRA							
	Agua	Postlarvas	H1	E1	H2	E2	H3	E3
1	+	-	-	+	-	-	+	-
2	+	-	-	+	-	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-	-	+
5	+	+	-	-	-	-	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	+	+	+	+	-	-
8	+	+	-	+	+	-	-	+
9	-	+	-	+	+	-	-	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	+	-	-	-	-	-	+
13	+	+	-	+	-	-	-	+
14	+	+	-	-	-	-	-	-
15	+	-	+	+	+	+	-	+

H1: hepatopáncreas de camarones al inicio del estanque, E1: estómago de camarones al inicio del estanque, H2: hepatopáncreas de camarones a la mitad del estanque, E2: estómagos de camarones a la mitad del estanque, H3: hepatopáncreas de camarones al final del estanque, E3: estómagos de camarones al final del estanque,

+= Muestras enviadas para secuenciación

Cuadro 3. Cuadro comparativo de los resultados obtenidos utilizando el protocolo que detecta todas las variantes de IHHNV y el protocolo que detecta los linajes patógenos de IHHNV de 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya y Pacífico Central de Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.

		PCR que detecta todas las variantes de IHHNV		Total
		+	-	
PCR que detecta exclusivamente los linajes patógenos	+	58	0	58
	-	8	54	62
Total		66	54	120

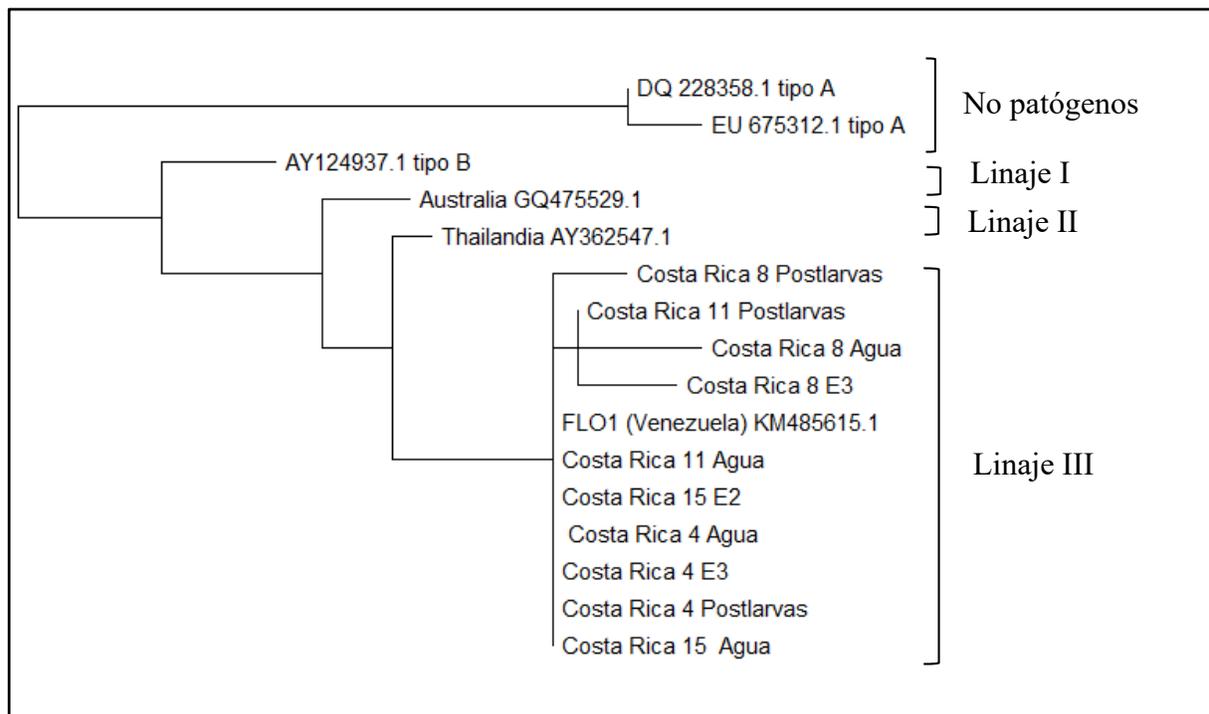


Figura 6. Cladograma de la secuenciación de las muestras positivas seleccionadas de los productos del PCR que detecta exclusivamente los linajes patógenos de IHHNV de 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya y Pacífico Central de Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.

La distribución de fincas positivas y negativas se muestra en la Figura 7. Se observa que las dos fincas negativas se encontraban situadas espacialmente muy distantes una de otra (finca 3 en Guanacaste y finca 6 en Puntarenas), sin embargo se encontraban muy cerca de fincas que resultaron positivas a las muestras de agua, postlarvas y juveniles.

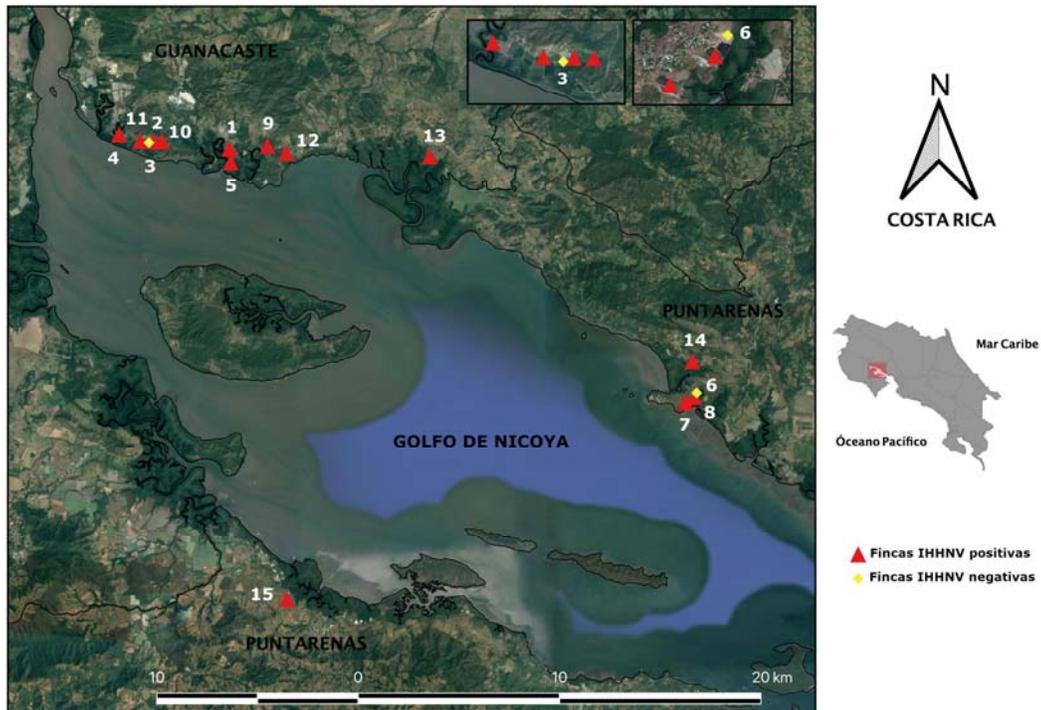


Figura 7. Distribución geográfica de las fincas productivas de camarón positivas y negativas a IHHNV en Costa Rica, durante el periodo 2017-2018 (Recuadros indican zonas ampliadas de fincas negativas).

Las encuestas realizadas a los productores de estas fincas permitieron conocer algunas características generales de manejo, las cuales se desglosan en el Cuadro 4. En cuanto al país de adquisición de las larvas, se estableció que un 26.7% (4/15) de productores compraron las larvas en Nicaragua y un 73.3% (11/15) en Guatemala, de las cuales un 100% (4/4) se encontraron positivas a IHHNV en el caso de las postlarvas adquiridas en Nicaragua y un 45.5% (5/11) en el caso de las adquiridas en Guatemala. Un 80% (9/15) de los productores indicaron realizar el análisis de la calidad de las larvas, el cual consistió en revisar que las larvas vengan vivas y tengan un nado sincronizado. Así mismo, 40% (6/15) de los productores realizaron dos ciclos por año, mientras que un 60% tres o más.

Cuadro 4. Características generales de manejo de 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya y Pacífico Central de Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.

Finca	País de origen de las larvas	Revisión de la calidad de las larvas	Ciclos productivos por año	Longitud del ciclo productivo
F1	Guatemala	No	3 o más	3-4 meses
F2	Guatemala	Si	2	3-4 meses
F3	Guatemala	Si	2	Menos de 3 meses
F4	Guatemala*	Si	2	3-4 meses
F5	Nicaragua*	Si	2	3-4 meses
F6	Guatemala	Si	3 o más	Menos de 3 meses
F7	Guatemala	Si	3 o más	Menos de 3 meses
F8	Guatemala*	Si	3 o más	Menos de 3 meses
F9	Nicaragua*	No	3 o más	Menos de 3 meses
F10	Nicaragua*	Si	2	3-4 meses
F11	Nicaragua*	No	2	3-4 meses
F12	Guatemala*	Si	3 o más	3-4 meses
F13	Guatemala*	Si	3 o más	3-4 meses
F14	Guatemala*	Si	3 o más	3-4 meses
F15	Guatemala	Si	3 o más	3-4 meses

*= Postlarvas IHHNV positivas

Si bien el 93.3% (14/15) de las fincas realizaban el vacío sanitario y secado, un 33.3% (5/15) indicó realizar el secado menos de 30 días; y un 86.6% (13/15) indicó utilizar al menos un producto detergente o acidificante para el suelo durante este periodo. Así mismo, se determinó que el 93.3% (14/5) de las fincas utilizaban antibióticos de manera profiláctica, un

20% (3/15) los utilizaba más de una vez durante un ciclo productivo, mientras que un 33.3% (5/15) acostumbraba a utilizar combinaciones de dos antibióticos simultáneos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Medidas profilácticas realizadas para el control de enfermedades en 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya y Pacífico Central de Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.

Finca	Realización de vacío sanitario y secado	Duración del vacío sanitario y secado (días)	Productos utilizados para el secado	Utilización de antibióticos profilácticos	Cantidad de veces durante el ciclo productivo	Antibióticos utilizados
1	Si	8	Cal y Cloro	Si	1	TM 700
2	Si	30	Cal y Cloro	Si	1	TM 700 y Enrofloxacina
3	Si	30	Sol	Si	1	TM700
4	Si	30	Cal y Cloro	Si	1	TM 700 y Enrofloxacina
5	Si	15	Cal y Cloro	Si	1	TM 700 y Enrofloxacina
6	Si	8	Cal y Cloro	Si	1	Enroflaxacina
7	Si	60	Cal y Cloro	Si	1	Enroflaxacina
8	Si	30	Cal y Cloro	Si	1	TM700
9	Si	Mas de 60	Cal y Cloro	Si	1	TM700
10	Si	45	Cal	Si	2	TM 700 y Enrofloxacina
11	Si	45	Cal	Si	2	TM 700 y Enrofloxacina
12	Si	30	Cal	Si	1	TM700
13	Si	30	Cal y Cloro	Si	2	TM700
14	Si	45	Cal, Fertilizante y Urea	Si	1	Oxitetraciclina
15	No	No aplica	No aplica	No	No utiliza	No utiliza

TM700: premezcla no soluble a base de terramicina

La encuesta permitió también establecer, que un 53.3% (8/15) de los productores habían escuchado hablar de IHHNV y que un 46.6% (7/15) sospechaba tener el agente en su finca; sin embargo, en el estudio se determinó la presencia del agente en un 86.66% (13/15) de las fincas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Conocimiento previo, presencia y estatus sanitario actual de IHHNV de 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya y Pacífico Central de Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.

Finca	Conocimiento Previo sobre IHHNV	Sospecha de la presencia de IHHNV en la finca	Estatus Sanitario con respecto a IHHNV en este estudio
1	No	No	Positivo
2	Sí	Sí	Positivo
3	No	No	Negativo
4	Sí	Sí	Positivo
5	No	No	Positivo
6	No	No	Negativo
7	Sí	No	Positivo
8	Sí	Sí	Positivo
9	No	No	Positivo
10	Sí	Sí	Positivo
11	Sí	No	Positivo
12	Sí	Sí	Positivo
13	No	No	Positivo
14	Sí	Sí	Positivo
15	No	Sí	Positivo

Finalmente, ninguno de los estanques de las fincas analizadas presentó parámetros físico-químicos óptimos en lo que respecta a la calidad del agua. Las variables más afectadas fueron la saturación de oxígeno disuelto y la temperatura, donde el 60% (9/15) de las fincas presentó valores inferiores al óptimo; así como un 80% (12/15) de fincas presentó temperaturas fuera del rango óptimo, un 26.6% (4/15) presentó valores de pH más ácidos al rango óptimo y un 40% (6/15) valores de salinidad fuera del rango ideal (Cuadro 7).

Cuadro 7. Parámetros físico-químicos de la calidad del agua de 15 fincas camaroneras del Golfo de Nicoya y Pacífico Central de Costa Rica, durante el periodo 2017-2018.

Finca	Oxígeno (mg/L)	Temperatura (°C)	pH	Salinidad (ppt)
Valor Óptimo	≥ 4.0	27-30	7.5 - 8.5	15-30
1	2,28	31,25	7,72	28,81
2	0,13	34,03	7,67	21,57
3	0,60	33,17	7,75	22,01
4	3,51	33,1	7,73	30,47
5	3,00	34,53	8,24	22,39
6	6,50	27,2	7,88	26,73
7	3,80	29,38	6,75	37,82
8	3,40	32,16	7,90	43,47
9	5,13	32,17	7,65	29,12
10	4,50	31,50	8,09	23,20
11	2,96	31,16	7,54	25,44
12	4,10	30,09	4,51	42,32
13	4,60	31,46	7,90	26,80
14	4,30	29,34	7,31	63,03
15	3,50	31,40	7,18	57,60

Debido a la gran cantidad de fincas positivas, no se encontraron diferencias significativas entre la presencia de IHHNV en las diferentes fincas y las variables de producción o parámetros de calidad del agua.

4 DISCUSIÓN

En el presente trabajó se logró determinar una amplia distribución de IHHNV (86.7%) en las fincas analizadas en el Golfo de Nicoya y el Pacífico Central de Costa Rica, lo cual no concuerda con el único reporte que existe sobre la presencia del agente y que reporta una prevalencia sugerida de 2.2% en el Golfo de Nicoya, analizando tres fincas en el estudio (Peña and Varela 2016). Tampoco concuerda con resultados obtenidos en países vecinos como Guatemala, Honduras, Belice, Nicaragua, México, Brasil y Venezuela donde se reportan prevalencias promedio de 13.4% de IHHNV en *L. vannamei* (Morales et. al 2011).

Se desconocen los factores que influyen para que estos países tengan prevalencias más bajas que Costa Rica, pero podría deberse a que realizan un mejor control sanitario (por ejemplo, utilizar semilla libre de patógenos), que aplican mejores prácticas de manejo (como mantener parámetros óptimos del agua o manejar densidades adecuadas de siembra) o aplican mayor bioseguridad en las fincas (evitar el ingreso de vectores al sistema) (Morales et. al 2011; OIE 2017). En contraste, el uso de larvas IHHNV positivas, la proximidad con proyectos acuícolas vecinos IHHNV positivos, contacto con camarones silvestres (en donde la infección ocurre de forma natural), el ingreso de vectores al sistema productivo y la mala calidad de parámetros del agua que generan estrés en la población de camarones del estanque, pueden ocasionar altas prevalencias de IHHNV (Puente 2009).

La investigación logró además identificar por primera vez el linaje de IHHNV presente en Costa Rica, determinando la presencia del Linaje III, una cepa patógena para la especie *L. vannamei* (Silva et al. 2014). No se logró determinar la presencia de otros linajes (patógenos y no patógenos); sin embargo, debido a que se conoce que la infección por cepas no patógenas

ocurre de manera natural en camarones silvestres, se recomienda analizar en futuras investigaciones la presencia de IHHNV en estos individuos. Esto ya que las cepas no patógenas tienen un alto grado de similitud con los linajes patógenos (86-92% de igualdad nucleotídica), y si bien antes se reportaba que la sustitución nucleotídica era muy baja (Tang and Lightner 2002), estudios más recientes reportan una alta variabilidad genética de este virus, debido a una alta tasa de sustitución nucleotídica en la ORF 3, la cual resulta inesperadamente alta para un virus ADN monocatenario (Tang et al. 2007), pero reportado en otros parvovirus de mamíferos (Robles et al. 2010).

La presencia del virus se logró detectar tanto en las muestras de agua, postlarvas, estómagos y hepatopáncreas de los animales; lo que indica, que el virus está presente en las fincas desde el inicio del ciclo productivo; ya sea ingresando con las larvas o estando presente en el agua. Futuras investigaciones deben establecer, si las postlarvas ingresan con el virus a nuestro país o si éstas se infectan durante el periodo de maduración y aclimatación previo a la siembra. Así mismo, el haber detectado el virus en las muestras de agua indica que se encuentra presente en las fincas previo al ingreso de los animales a los estanques. Este hecho representa uno de los desafíos más grandes para los productores que deseen erradicar el virus de sus fincas ya que es un virus altamente resistente a los métodos comunes de desinfección tales como cloro, cal y formalina (FAO 2005b).

La presencia del virus en las muestras de estómagos y hepatopáncreas de los animales también denota un grado severo de infección, ya que estos no constituyen los tejidos en los que se inicia la infección viral, los cuales serían la hemolinfa y los pleópodos en los que se recomienda realizar el diagnóstico temprano (OIE 2017).

No se encontró ninguna finca en la cual las muestras de agua o postlarvas, o ambas, fueran positivas y los camarones juveniles resultaran negativos, indicando, que la adquisición de la infección de los camarones juveniles se debe a la introducción de post larvas infectadas o a la presencia del virus en los estanques previo a la siembra (Cuéllar 2013). En la finca 7 se determinó las larvas y el agua del día de la cosecha IHHNV negativos, pero los camarones juveniles positivos, lo cual puede indicar, que el virus se encontrara en bajas cantidades al inicio de la cosecha, por lo que no se pudo detectar (OIE 2003).

En contraste, también es posible, que las postlarvas se encontraran libres de IHHNV, y en el transcurso del tiempo, el virus (en el sedimento, agua, vectores) infectara a los animales (Puente 2009). Con respecto a las fincas IHHNV negativas, no se podría descartar incluso un falso negativo debido a que la prevalencia del virus fuese menor a un 10% (OIE 2003).

En este estudio ambas pruebas moleculares utilizadas mostraron la misma especificidad, pero el PCR que detectó todos los linajes (patógenos y no patógenos), de IHHNV, determinó más casos positivos (mayor sensibilidad). Estos casos se establecieron como cepas patógenas del linaje III, por lo que se recomienda utilizar ese PCR en programas de vigilancia, tal y como recomienda la OIE (OIE 2019).

La distribución geográfica de las fincas positivas y negativas muestra a las fincas negativas muy distantes entre sí, pero muy cerca de fincas positivas, lo cual sugiere, que si bien existe un alto riesgo de diseminación del agente por contacto con agua contaminada de fincas vecinas o mediante vectores como las aves; los factores como manejo de las fincas y bioseguridad podrían jugar un papel más importante en la presencia del agente en un sistema productivo (Glover et al. 1995).

El país donde se compran las post larvas parece no ser importante para la presencia de IHHNV en las fincas, ya que las dos fincas negativas adquirieron sus post larvas de Guatemala en fechas similares a las obtenidas por fincas positivas. Esto coincide con estudios previos (2008-2009), que reportan prevalencias de IHHNV de 0.04% en laboratorios de producción de larva de Guatemala (Moreira 2010). Evitar el ingreso del agente a las fincas negativas debería ser considerado uno de los principales puntos críticos de control, por lo que se debe estudiar si las postlarvas ingresan libre de patógenos a nuestro país, o si la infección de IHHNV ocurre durante el proceso de maduración y acondicionamiento en nuestro país (Moreira 2010).

Aunque algunos justifican la interferencia viral con el virus de la mancha blanca para tolerar la presencia de IHHNV en las fincas productivas (Vielka and Cuéllar 2008) otros autores advierten el latente peligro de aparición de cepas más virulentas, que puedan ocasionar mortalidades tan altas como las ocasionadas durante los años 80s cuando apareció el primer brote de IHHNV en Hawái (Robles et al. 2010). Además, otros autores demostraron que no existía interferencia viral, por tanto no debería ser justificante para permitir la presencia de IHHNV en los estanques o las larvas de importación (Escobedo-Bonilla 2014). Así mismo, sería recomendable determinar las pérdidas económicas que ocasiona IHHNV en la finca. En los Estados Unidos de Norte América se estimaron pérdidas económicas por IHHNV entre 0.5-1 billón de dólares en el periodo comprendido entre 1981-2001 (Lightner 2003).

Si bien el 93.3% de las fincas realizaron vacío sanitario y secado, tan solo un 33.3% realizó el secado más de 30 días; lo cual es lo recomendado por la OIE para la prevención de la propagación de agentes infecciosos (OIE 2017). Un aspecto alarmante que arrojaron las encuestas es el uso indiscriminado de antibióticos, ya que el 93.3% de las fincas utilizaron

antibióticos de manera profiláctica, sin que existiera justificación para su utilización, ya que su aplicación está restringida al tratamiento de enfermedades bacterianas (FAO 2002).

El tema de uso de antibióticos de manera profiláctica genera una alarma, debido al impacto negativo que esta práctica puede generar en la salud humana, ya que puede ocasionar problemas directos como anemia aplásica o desarrollo de resistencia en bacterias patógenas para los seres humanos, lo cual se considera actualmente uno de los riesgos más graves para la salud humana a nivel mundial (FAO 2002).

Con la finalidad de prevenir o amortiguar el impacto negativo que ha tenido el manejo irresponsable de los antibióticos en la acuicultura a nivel mundial, la FAO plantea el establecimiento de dos estrategias para conseguir niveles aceptables de residuos de antibióticos en los productos acuáticos: 1. limitar el empleo de antibióticos en las empresas de acuicultura, y 2. establecer y aplicar obligatoriamente límites máximos para residuos de medicamentos veterinarios (LMRMV). Así mismo, establece que la compra y utilización de los antibióticos aprobados debe realizarse únicamente mediante prescripción y bajo la dirección de un profesional calificado, el cual asume la responsabilidad de cualquier violación de los límites para residuos de medicamentos (FAO 2002). Se considera importante la realización de futuras investigaciones en las cuales se determine la situación actual de las fincas camaroneras de Costa Rica con respecto al tema de resistencia antimicrobiana (Le et al. 2005).

La encuesta evidenció un gran desconocimiento acerca del agente, ya que tan solo un 53.3% de los productores habían escuchado hablar de IHHNV. Así mismo, se determinó que un 46.6% de los productores sospechaba tener el agente en su finca; sin embargo en el estudio se comprobó la presencia del agente en la mayoría (13/15) de las fincas; lo cual implica que la presencia de IHHNV ha pasado desapercibida en algunas de las fincas y en otras simplemente

se acepta como un mal necesario con el que se debe convivir, sin considerar el posible impacto económico que podría estar ocasionando en la finca (Lightner 2003, CARPROCAM 2019).

Únicamente una de las fincas analizadas (Finca 3) presentó parámetros físico-químicos óptimos en lo que respecta a calidad de agua, siendo esta una de las fincas negativas del estudio. Los parámetros más alterados en las fincas fueron la saturación de oxígeno y la temperatura, los cuales se consideran los parámetros más importantes para la producción de camarones, ya que el incremento en la temperatura implica un mayor consumo de oxígeno disuelto por parte de los camarones, lo cual conlleva a que en las fincas donde no se realiza un buen manejo de parámetros; se encuentren niveles bajos de oxígeno disuelto; desencadenando un factor estresante en los camarones que se refleja en disminución del consumo, y muerte de los animales (Puente 2009).

Los parámetros físico-químicos del agua de las fincas, así como las prácticas de manejo, reflejan la necesidad imperativa de la colaboración multidisciplinaria para desarrollar protocolos análogos a los protocolos de Salud de Hato implementados en otros sistemas productivos; con la finalidad de crear los lineamientos necesarios que permitan no solo prevenir y combatir la presencia de agentes infecciosos en las fincas, sino también de mejorar los parámetros productivos de la finca mediante la estandarización de protocolos de bioseguridad que permitan identificar los problemas correspondientes en cada sistema productivo, y de esta manera poder tomar medidas correctivas al respecto (FDA 2017)

En conclusión, a pesar de que se determinó la presencia del linaje patógeno III de IHHNV, no se encontraron factores predisponentes de la presencia del virus en las fincas ni se pudo determinar si el virus está provocando pérdidas económicas. Sin embargo, el denominador común en todas las fincas positivas a IHHNV fueron las malas prácticas de manejo; tales como

el mal control de los parámetros del agua y el uso indiscriminado de antibióticos, lo cual podría estar provocando un impacto negativo en la salud de animales, y por ende repercutiendo de manera directa en la baja productividad de los sistemas (Rojas 2005).

Se evidenciaron muchas necesidades en esta área, por lo que resulta imperativo invertir en capacitaciones a los productores, así como incentivar el trabajo interdisciplinario, que involucre más médicos veterinarios que puedan apoyar junto al SENASA el área clínica y la generación de programas de salud de estanque.

5 CONCLUSIONES

- 5.1** Se validaron dos técnicas moleculares para el diagnóstico de IHHNV que fueron efectivos para determinar diferentes genotipos de IHHNV en las fincas productivas de camarón.
- 5.2** Se determinó la presencia del Linaje III de IHHNV en 13/15 (86.7%) de las fincas analizadas, mediante PCR y secuenciación, siendo este el primer reporte sobre los genotipos presentes en Costa Rica, y el primer reporte válido ante la OIE.
- 5.3** No se determinaron factores de riesgo, asociados a la presencia de IHHNV en las fincas del estudio, por el alto número de fincas positivas, sin embargo, la encuesta aplicada a los productores determinó un uso indiscriminado y sin regulación de antibióticos en el área de producción de camarones y con prácticas de manejo deficientes, sobre todo parámetros físico-químicos del agua, que en conjunto con la presencia de IHHNV podrían estar causando una baja producción
- 5.4** Se realizaron participaciones en el Encuentro Anual 2018 y 2019 de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional y en el Congreso Mundial de Medicina Veterinaria 2019, donde se expuso la problemática y se incentivó una mayor participación del gremio veterinario en la acuicultura.
- 5.5** Se realizaron reuniones con la Dra. Carolina Elizondo del SENASA, con la finalidad de discutir los resultados obtenidos y ayudar a encontrar soluciones para los productores.
- 5.6** Se realizó una actividad en conjunto con la UTN, para discutir y entregar mediante panfletos informativos los resultados obtenidos en el trabajo, así como concientizar a los productores sobre la importancia de realizar previo a la siembra de la postlarvas, controles mediante PCR para evitar el ingreso de agentes infecciosos al estanque. Las

inquietudes de los productores se discutieron en una mesa redonda en conjunto con la Dra. Carolina Elizondo y los colaboradores de este proyecto.

5.7 Se estableció la necesidad de involucrar a los médicos veterinarios en trabajo interdisciplinario para mejorar la producción y regular el uso de antibióticos en dichos sistemas.

5.8 Se determinó la necesidad de capacitar más a los productores, acerca de la importancia de la salud del estanque en la prevención de la aparición de enfermedades; así como en la concientización de que deben invertir dinero para obtener mejores resultados; en lugar de esperar que el Estado les resuelva todos sus problemas.

6 RECOMENDACIONES

- Se recomienda a las universidades realizar un futuro estudio, que incluya una muestra más grande de fincas, para determinar la prevalencia nacional de IHHNV. Se debe establecer, en conjunto con el SENASA, normativas y lineamientos claros que regulen esta actividad; con la finalidad de aumentar la productividad del sistema y asegurar la inocuidad del producto final.
- Se recomienda a la Escuela de Medicina Veterinaria seguir estudiando camarones de cultivo y silvestres para determinar la presencia de otros linajes de IHHNV, y cuantificar la cosecha final de fincas IHHNV positivas e IHHNV negativas para de esta manera estimar las pérdidas económicas que está ocasionando el agente en las fincas de producción de camarones de Costa Rica.
- Se recomienda al SENASA y a los productores evitar el ingreso del patógeno vía postlarvas, realizando análisis moleculares previos a la siembra.
- Se recomienda a los médicos veterinarios involucrarse más en la rama de la camaronicultura, ya que es inherente a estos el tema clínico correspondiente a la prevención y manejo de enfermedades de los animales; así como lo es velar por la Salud Pública y garantizar la seguridad alimentaria.
- Se recomienda a las universidades realizar estudios acerca del impacto que puede conllevar el uso indiscriminado de antibióticos en la aparición de genes de resistencia en animales de vida silvestre pertenecientes a los estuarios aledaños a las fincas camaroneras; así como el impacto que puede tener en la aparición de resistencia antimicrobiana en los consumidores que adquieren producto final.

- Se recomienda al SENASA generar y facilitar vías de comunicación efectivas entre los productores, las autoridades políticas involucrados en esta área, con la finalidad de buscar soluciones factibles y efectivas para solucionar los desafíos que enfrenta la producción de camarones nacional.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bell TA, Lightner DV. 1984. IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* [Internet]. [cited 2017 Sept 17];38 (3): 185–194. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004484868490142X?via%3Dihub>.
- Bonami JR, Trumper B, Mari J, Brehelin M, Lightner DV.1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J Gen Virol* [Internet]. [cited 2017 Sept 17]; 71(1): 2657–2664. Available from: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-71-11-2657>
- CARPROCAM. 2019: Entrevista personal con los productores camaroneros asociados a la Cámara de Productores de Camarones, en conjuntos con la Universidad Técnica Nacional y representantes del Servicio Nacional de Salud Animal. Realizada el 10 de Mayo del 2019.
- Chai C, Liu Y, Xia X, Wang H, Pan Y, Yan S, Wang Y. 2016. Prevalence and genomic analysis of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* shrimp farmed in Shanghai, China. *Arch Virol* [Internet]. [cited 2017 Sept 18];161(11): 3189-3021. Available from:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-016-3022-5> doi: 10.1007/s00705-016-3022-5.

Cowley J, Rao M, Coman G. 2018. Real-time PCR tests to specifically detect IHHNV lineages and an IHHNV EVE integrated in the genome of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 129: 145–158. doi: 10.1007/s00705-016-3022-5

Cuéllar J. 2013. Necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (HHNV) [Internet]. [cited 2017 Sept 13]; Iowa (IA): Center for Food Security and Public Health. Available from: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/infectious_hypodermal_and_hematopoietic_necrosis-es.pdf.

Dhar A, Roux M, Klimpel K. 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using realtime quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J Clin Microbiol* 39(8): 2835–2845.

Escobedo-Bonilla CM, Rangel JLI. 2014. Susceptibility to an inoculum of infectious hypodermal and haematopietic necrosis virus (IHHNV) in three batches of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). In: Wehrtmann IS, Bauer RT, editors. *Proceedings of the Summer Meeting of the Crustacean Society and the Latin American Association of Carcinology*. Costa Rica. *ZooKeys* 457. p. 355–365.

Elizondo C. 2019. Entrevista personal acerca de las fincas camaroneras existentes en la actualidad en Costa Rica y baja productividad de las fincas camaroneras. SENASA. Realizada el 19 de Febrero del 2019.

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2002. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Available from: <file:///C:/Users/Dell/Desktop/Pesca%20y%20Acuicultura%20ATB.pdf> 6

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2004. Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina. Available from: <http://www.fao.org/3/a-y5040s.pdf>.

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2005a. *National Aquaculture Sector Overview Costa Rica*. Available from: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_costarica/en

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2005b. Introducciones y movimiento de dos especies de camarones peneidos en Asia y el Pacífico. FAO DOCUMENTO TÉCNICO DE PESCA 476. Available from: <http://www.fao.org/3/a0086s/A0086S00.htm#TOC>

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (8 de enero de 2016). Costa Rica iniciará el proceso para ordenar, fortalecer y dar sostenibilidad a

su acuicultura. FAO-Noticias. Available from:
<http://www.fao.org/costarica/noticias/detail-events/es/c/413848/>

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2011. Orientaciones Técnicas para una Pesca Responsable. Available from:
<http://www.fao.org/docrep/014/i1750s/i1750s.pdf>

[FDA] Food & Drug Administration. 2014. Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). Available from: <https://www.fda.gov/food/guidance-regulation-food-and-dietary-supplements/hazard-analysis-critical-control-point-haccp>

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4):783-791. Available from:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x/abstract;jsessionid=3E44E1F7FBFA6B9E5BE2EFA7CD4F1FD>
 F.f02t04.doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x

Flegel TW. 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(4): 433–442.

Glover KL, Nunan LM, Lightner DV. 1995. Measurement using polymerase chain reaction (PCR) of the survival of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) subjected to shrimp culture disinfection techniques. In: Browdy CL, Hopkins

- JS (eds) Swimming through troubled water. Proc Spec Sess Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society. LA: Baton Rouge. p. 239.
- Hall TA. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series.41: 95-98.
- Kalagayan G, Godin D, Kanna R, Hagino G, Sweeney J, Wyban, J, Brock J. 1991. IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. Journal of the World Aquaculture Society, 22(4): 235–243.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.
- Le TX, Munekage. 2005. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. Sci Total Environ, 349(1-3):95-105.
- Lightner DV, Redman RM, Bell TA. 1983a. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. Journal of Invertebrate Pathology, 42(1): 62-70.
- Lightner DV, Redman RM, Bell TA. 1983b. Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. Journal of the World Mariculture Society.14(1): 212–225.

Lightner DV, Redman RM, Bell TA. 1985. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*.45(1): 47-53.

Lightner DV, Mohny LL, Williams RR, Redman RM. 1987. Glycerol tolerance of IHVN virus of penaeid shrimp. *Journal of The World Aquaculture Society*.18(3): 196–197.

Lightner DV, editor.2001. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Louisiana (LA): World Aquaculture Society. 256 p.

Lightner DV and Redman RM. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*[Internet]. [cited 2017 Sept 17];164(1-4): 201– 220. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848698001872?via%3Dihubdoi> : 10.1016/S0044-8486(98)00187-2

Lightner DV. 2003. Exclusion of specific pathogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program. In: Lee CS, O'Bryen PJ, editors. *Biosecurity in aquaculture production systems: exclusion of pathogens and other undesirables*. World Aquaculture Society. LA: Baton Rouge. p 81–116

Lightner DV, Redman RM, Arce S, Moss SM. 2009. Specific Pathogen-Free (SPF) shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. In: Shumway Sand Rodrick G, editors. *Shellfish Safety and Quality*. Elsevier. p. 384-424.

- Lotz JM. 1997. Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol*, 13 (4): 405-413.
- Montgomery BD, Tacon AG, Poulos B, Lightner DV. 2007. Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture*, 265(1-4): 41-48.
- Morales M, Ruiz A, Pererira A, Solis V, Conroy G. 2011. Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. *Revista* , 21(5): 434-446.
- Morales MS, Nunan LM, Lightner DV, Mota JC, Garza MC, Chavez MC. 1999. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in wild adult blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the northern gulf of California, Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*. 11(3): 296–301.
- Morales MS, Ruiz A, Pereira A, Solís VT, Conroy G. 2001. Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivados en ocho regiones de Latinoamérica. *FCV-LUZ*. 21(5): 434-446.
- Nunan LM, Poulos BT, Lightner DV. 2000. Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Marine Biotechnology*. 2(4): 319–328.

[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. [Internet]. 2003. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. [updated 2003; cited 2019 Jun 29]. Available from: <http://www.oie.int/doc/ged/D6505.pdf>

[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. [Internet]. 20. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. [updated 2019; cited 2019 Jun 29]. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_ihnh.pdf

[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. [Internet]. 2015. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. [updated 2016; cited 2017 Sept 22]. Available from: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-acuatico/acceso-en-linea/>

[OIE] World Organisation for Animal Health.[Internet]. 2017. Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. [updated 2016; cited 2017 Sept 22]. Available from: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-acuatico/acceso-en-linea/>

[OIE] World Organisation for Animal Health.[Internet].2019. Sistema Mundial de Información Zoonositaria. [updated 2019; cited 2019 Jan 8]. Available from: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation

Peña N and Varela A. 2016. Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas en el camarón blanco *Penaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 51(3): 553-564.

Peña N and Chacón J. 2019. Acuicultura en Costa Rica. World Aquaculture. 50(1): 23-28.

[PFPAS-MAG]Procedimiento para el otorgamiento de apoyos financieros a las iniciativas de proyectos de asistencia del Ministerio de Agricultura y Ganadería.[Internet].2007. *Plan estratégico de la cadena productiva de acuicultura*: Período: 2008-2010.[updated 2007; cited 2017 Aug 28]. Available from:<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00038.pdf>

Primavera JH and Quinitio ET. 2000. Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Journal of Crustacean Biology.20(4): 796–802.

Puente E. 2009. Respuestas Fisiológicas De Juveniles de Camarñon Blanco *Litopenaeus vannamei*, a Condiciones Oscilantes de Oxígeno Disuelto y Temperatura. Tesis para obtener el grado de doctorado en ciencias marinas. CICIMAR-IPN. La Paz, Bolivia.

Rai P, Safeena M, Krabsetve PK, La Fauce K, Owens L, Karunasagar I. 2012. Genomics, Molecular Epidemiology and Diagnostics of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. Indian Journal of Virology.23(2): 203-214.

Red Biobancos. 2011. PNT: Extracción de ácidos nucleicos. [updated 2011; cited 2018 Jun 5].

Available from: http://redbiobancos.es/Pages/Docs/PNT_Acidos_Nucleicos.pdf

Robles R, Bohonak AJ, McClenaghan LR Jr, Dhar AK. 2010. Genetic Signature of Rapid IHHNV (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus) expansion in wild Penaeus shrimp populations. PLoS ONE 5(7): e11799. doi:10.1371/journal.pone.0011799

Rojas A, Haws M, Cabanillas J. editors. 2005. Buenas Prácticas de Manejo Para el Cultivo de Camarón. The David and Lucile Packard Foundation. United States Agency for International Development (Cooperative Agreement No. PCE-A-00-950030-05).

Silva D, Nunes A, Teixeira D, Lima JP, Lanza D. 2014. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus from Brazil: Sequencing, comparative analysis and PCR detection. Virus Research. 189:136-46

Shike H, Dhar AK, Burns JC, Shimizu C, Jousset FX, Klimple KR, Bergoin M. 2000. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses. Virology. [Internet]. [cited 2017 Sept 03];277(1): 167–177. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682200905890?via%3Dihubdoi>: 10.1006/viro.2000.0589

Sindermann CS and Lightner DV. 1988. Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. Netherlands (NL): Elsevier Ltd. 431 p.

[SENASA] Servicio Nacional de Seguridad Animal. 2005. Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en Acuicultura.

[SENASA]Servicio Nacional de Seguridad Animal.[Internet].2010. Protocolo de Vigilancia Epidemiológica para La Enfermedad de las Manchas Blancas: Programa nacional sanidad acuícola. [updated 2010; cited 2017 Aug 12]. Available from:www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/141211080925.doc

[SENASA] Servicio Nacional de Seguridad Animal.[Internet].2013. *Decreto DG-R052-2013 sobre AHPNS /EMS, SENASA*. [updated 2011; cited 2017 Aug 12]. Available from: <https://www.sfe.go.cr/MSF2013/G-SPS-N-CRI->

Tang K, and Lightner DV.2002. Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Diseases of Aquatic Organisms Journal*.49(2): 93–97.

Tang K, Poulos B, Wang J,Redman R, Shih H, Lightner DV. 2003. Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Diseases of Aquatic Organisms Journal*, 53(2): 91–99.

- Tang K, Navarro S, Lightner, DV. 2007. PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus related sequence in the genome of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms Journal*.74(2): 165-170.
- Tattersall P, Bergoin ME, Boom ME, Brown KE, Linden RM, Muzyczka N. 2005. Family Parvoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Elsevier.p. 353-369.
- Wyban JA, Swingle JS, Sweeney JN, Pruder GD. 1992. Development and commercial performance of high health shrimp using specific pathogen free (SPF) broodstock *Penaeus vannamei*. In: Wyban JA, editor. *Proceedings of the specific session on shrimp farming*. Louisiana: World Aquaculture Society. P. 254–259.
- Tang K and Lightner DV. 2006. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.* (118): 185– 191.
- Tang K, Navarro SA, Lightner DV. 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.

Vanpatten K, Nunan, Lightner DV. 2004. Seabirds as potencial vectors of penaid shrimps viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture.*, 241 (2004), 31-46.

Vielka M and Cuéllar J, editors. 2008. *Guía Técnica: Patología e Inmunología de Camarones Peneidos*. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 p.

8 ANEXOS

8.1 Encuesta

Encuesta
Universidad Nacional
Programa Regional de Ciencias Veterinarias Tropicales

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

Encuesta diagnóstica

Estimado productor de camarón:

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

Encuesta N°: _____
Nombre del encuestador: _____
Fecha de aplicación de encuesta: _____

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

		2. Puntarenas		1. Puntarenas		1. Chomes 2. Lepanto
5. Coordenadas geográficas (grados, minutos y segundos)	1. Latitud: _____					
	2. Longitud: _____					
6. Código Sistema Informático de Registro de Establecimiento Agropecuario (SIREA)						
7. Área de cultivo	1. Menor a dos hectáreas					
	2. De dos a tres hectáreas					
	3. De tres a cuatro hectáreas					
	4. Más de cuatro hectáreas					
8. Área del estanque (m²)						
9. Sistema de producción	1. Intensivo					
	2. Semi-intensivo					
	3. Extensivo					
10. Estructura para la producción acuícola	1. Familiar (Negocio familiar)					
	2. Asociados (Negocio con terceros)					
	3. Venta como carnada					
11. Cantidad de empleados con que cuenta la finca						
12. ¿Para la producción de la finca, es necesario la contratación de empleados externos a su familia?	1. Si					
	2. No					
	3. No aplica					
13. ¿Cuál es la distancia con respecto la finca camaronera más cercana?	1. Menos de 1 kilómetro					
	2. De 1 a 2 kilómetros					
	3. De 2 a 3 kilómetros					
	4. Más de 3 kilómetros					
14. ¿El estanque de cultivo con respecto a las coordenadas geográficas con qué colinda?	1. Norte: Montaña					
	2. Este: Manglar					
	3. Oeste: Fincas camaroneras					
	4. Sur: Fincas camaroneras					
15. ¿De dónde proviene el agua que utiliza para llenar el estanque o realizar los recambios?	1. Directamente del mar					
	2. Del estuario					
	3. De otras fincas					
	4. Otros, especifique: _____					

Datos del sistema de producción
--

16. Fecha de siembra		
17. Densidad de siembra (por hectárea)		1. Menos de 100 mil
		2. De 100 a 300 mil
		3. De 300 a 500 mil
		4. De 500 a 700 mil
		5. Más de 700 mil
18. Origen de las postlarvas		1. Nicaragua
		2. Ecuador
		3. Panamá
		4. Otros, especifique:
19. Volumen aproximado de agua en el estanque de cultivo (m³)		
20. Tasa de recambio de agua en el estanque (% o m³/ día)		
21. Método de alimentación		1. Al boleó
		2. Comederos
		3. Otros, especifique:
22. ¿Utiliza usted tablas de alimentación?		1. Sí
		2. No
23. ¿Cuál es la conversión alimenticia final aproximada por ciclo?		
24. ¿Cuenta usted con bodega para el almacenamiento de alimentos concentrados?		1. Sí
		2. No
25. El sitio de almacenamiento cuenta con:		1. Sistema de ventilación
		2. Sistema de control de humedad e iluminación
		3. Espacio de almacenaje limpio, seco y ordenado
		4. Inventario u hoja de registro del ingreso y salida de producto
		5. tarimas, pilas, estibas o espacios específicos de almacenaje elevados del piso
		6. Control de plagas (insectos, roedores, etc.)
		7. Temperatura entre 20 y 30 grados
26. Tipo de alimento		1. Orgánico () : marca
		2. Convencional () : marca
27. Frecuencia de alimentación		1. Una vez al día
		2. Dos veces al día
		3. Tres veces al día o más
		1. Menos de 3 meses

28. Duración promedio del ciclo de producción		2. De 3 a 4 meses
		3. De 4 a 5 meses
		4. Más de 5 meses
29. Número de raleos por cosecha		1. No realiza
		2. Una vez
		2. Dos veces
		3. Tres o más veces
30. ¿Ciclos de cultivo por año?		1. Una vez al año
		2. Dos veces al año
		3. Tres o más veces al año
31. ¿Utiliza antibióticos en su finca?		Sí () Cuál:
		No ()
32. ¿Cuántas veces utiliza antibióticos en su finca?		1. Una vez por cosecha
		2. Dos veces por cosecha
		3. Tres o más veces por cosecha
		4. No aplica
33. ¿Aplica usted periodo de secado?		1. Sí
		2. No
34. ¿Por cuánto tiempo aplica el periodo de secado?:		Cal, carbonato, cloro granulado
35. Tipos de productos y técnicas que aplicas durante el secado		1. Calidad de aguas
		2. Calidad de la postlarva
		3. Enfermedades
		4. Depredadores
		5. Falta de apoyo de autoridades institucionales
		6. Manejo del manglar
		7. Capacitaciones
		8. Cálculo de raciones alimenticias
		9. Mortalidad (%)
		10. Otro,
36. ¿De los siguientes problemas, cuáles identifica en su finca? Enumérelos del 1 al 9, siendo que 1 es el más importante y el 9 es el menos importante, en caso de que tenga algún otro problema por considerar y no se encuentre en la lista, indíquelo.		1. Oxígeno
		2. Temperatura
		3. Salinidad
		4. Otros, especifique:
		5. Ninguno
37. ¿Qué parámetros sobre calidad de aguas mide en su estanque?		Se analiza en el laboratorio de postlarvas
38. Cuando siembra, cómo mide la calidad de las postlarvas?		1. Mancha Blanca

39. ¿Reconoce usted alguna de las siguientes enfermedades?		2. Síndrome de la mortalidad temprana
		3. Necrosis del hepatopáncreas
		4. Mortalidad encubierta
		5. Parásitos
		6. Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa
		7. Ninguna
		8. No sabe
	40. ¿Cuáles de las siguientes enfermedades, se han presentado en su finca?	
		2. Síndrome de la mortalidad temprana
		3. Necrosis del hepatopáncreas
		4. Mortalidad encubierta
		5. Parásitos
		6. Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa
		7. Ninguna
		8. No sabe
41. Indique un valor estimado de pérdidas económicas cuando se presenta una enfermedad:		1. Menos de 100 000 colones
		2. De 100 000 a 500 000 colones
		3. De 500 000 a 1 000 000 colones
		4. Más de 1 000 000 colones
42. ¿Cuántas veces se presenta la enfermedad en los camarones durante el ciclo productivo?		1. Nunca
		2. Una vez
		3. Dos veces
		4. Tres veces
43. ¿Cuáles son las medidas correctivas que realiza cuando se presenta una enfermedad?		
44. ¿Cuáles son los tipos de depredadores más comunes en su finca?		1. Aves
		2. Reptiles
		3. Seres humanos
		4. Otros, especifique:
45. ¿En su finca, se ocupan del manejo del manglar?		1. Sí
		2. No
46. ¿De qué forma se maneja el manglar?		1. Reforestación
		2. Se conserva intacto
		3. Desconoce el tema

		4. Se utiliza el recurso ocasionalmente
		5. Otros, especifique:
Medidas para mejorar los procesos de producción		
47. ¿Conoce usted sobre programas que se fomenten desde las autoridades instituciones en pesca y acuicultura para mejorar o fomentar el cultivo de camarón?		1. Sí
		2. No
48. ¿Conoce usted si las autoridades del país fomentan el cultivo de camarones en el país?		1. Sí
		2. No
49. ¿Considera usted que las instituciones y autoridades institucionales fomentan el cultivo de camarones en el país?		1. Sí
		2. No
50. ¿Ha recibido usted capacitación para mejorar el proceso de producción de camarón?		1. Sí
		2. No
51. En caso de responder afirmativamente la pregunta 51, responda la siguiente pregunta, y si no pase a la pregunta 55. La institución que brindó la capacitación fue:		1. Pública
		2. Privada
52. ¿Qué institución o ente la brindó?		
53. ¿Cuántas capacitaciones recibe al año?		1. Una vez al año
		2. Dos veces al año
		3. Tres o más veces al año
		4. No recibe ninguna
54. ¿En qué temas le gustaría o tendría interés en capacitarse?		1. Nutrición
		2. Enfermedades
		3. Calidad de aguas
		4. Administración
		5. Sostenibilidad
		6. Otros, especifique:
Observaciones		generales:

¡Muchas gracias por su tiempo!