



Prevalencia de AHPND en camarónicas del Golfo de Nicoya y Pacífico Central, Costa Rica*

Prevalence of ahpnd in shrimp farms of the Nicoya Gulf and Central Pacific, Costa Rica

Nelson Peña-Navarro¹, Jorengeth Abad Rodríguez-Rodríguez², Rodolfo Umaña Castro³, Carolina Sancho-Blanco³, Karen Oviedo Bolaños³, Cesar Marcial Escobedo-Bonilla⁴

* Recepción: 18 de marzo, 2024. Aceptación: 21 de mayo, 2024. El proyecto forma parte de un proyecto de investigación titulado Determinación de la calidad del agua y la presencia de bacterias patógenos oportunistas que afectan la productividad de sistemas acuícolas en Costa Rica.

¹ Universidad Técnica Nacional, Laboratorio de Patología Acuicola (LAPA), Sede del Pacífico, Puntarenas, Costa Rica. npena@utn.ac.cr (autor para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0002-8916-812X>).

² Universidad Nacional (UNA), Escuela de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Campus Omar Dengo, Heredia, Costa Rica. jorengeth.rodriguez.rodriguez@una.cr (<https://orcid.org/0000-0001-8452-8256>).

³ Universidad Nacional (UNA), Escuela de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Análisis Genómico (LAGen), Campus Omar Dengo, Heredia, Costa Rica. rodolfo.umana.castro@una.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0003-0041-2788>), carolina.sancho.blanco@una.cr (<https://orcid.org/0000-0003-3905-7699>), vane.oviedo21@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0002-0378-001X>).

⁴ Instituto Politécnico Nacional - Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Sinaloa. Blvd Juan de Dios Batiz Paredes 250, Colonia San Joachin, Guasave Sinaloa, México. cescobe@ipn.mx (<https://orcid.org/0000-0001-8115-2476>).

Resumen

Introducción. La enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés) es producida por bacterias *Vibrio parahaemolyticus* que poseen un plásmido con genes que codifican las toxinas *pirA* y *pirB*. La enfermedad se caracteriza por descamación masiva de las células epiteliales del hepatopáncreas, la atrofia y decoloración de ese órgano. Los camarones enfermos presentan anorexia, y muestran un intestino vacío, debilidad, decoloración del cuerpo y altas mortalidades. **Objetivo.** Determinar la prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND en fincas que cultivan camarones en la zona del Pacífico de Costa Rica. **Material y métodos.** Durante los años 2019 y 2020, se recolectaron camarones (*P. vannamei*) y agua de estanques de 32 fincas localizadas en la costa occidental del Golfo de Nicoya (Noroeste de Costa Rica) y la costa del Pacífico Central Puntarenas-Parrita), Costa Rica. Los camarones recolectados en los muestreos tenían un peso entre 7 y 15 g. El diagnóstico de la presencia de la enfermedad se analizó a nivel molecular con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final, y diferentes protocolos e iniciadores para detectar los genes de las toxinas *pirA* y *pirB*. Se hizo además una correlación lineal entre la presencia de AHPND y la calidad del agua con el programa estadístico R. **Resultados.** La presencia de *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND ocurrió en 93,75 % (30/32) de los estanques muestreados en ambas zonas de cultivo. **Conclusiones.** Este trabajo confirma la presencia y amplia distribución de AHPND en agua y camarones en treinta fincas camarónicas en el Pacífico de Costa Rica.

Palabras claves: camarón blanco, *Penaeus vannamei*, PCR, *pirA/pirB*.



Abstract

Introduction. The Acute hepatopancreas necrosis disease (AHPND) is caused by bacteria *Vibrio parahaemolyticus* containing a plasmid encoding the toxin genes *pirA* and *pirB*. The disease is characterized by massive sloughing of epithelial cells in hepatopáncreas, also showing atrophy and discoloration of that organ. Diseased shrimp display anorexia with empty gut, weakness, body discoloration and high mortalities. **Objective.** To determine the prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* causing AHPND in farms that grow shrimp in the Pacific zone of Costa Rica. **Material and methods.** During the years 2019 and 2020, water and shrimp (*P. vannamei*) samples were obtained from 32 farms located in the western coast of the Gulf of Nicoya (Northwest of Costa Rica) and the Central Pacific coast (Puntarenas-Parrita) The samples were analyzed by the endpoint Polymerase Chain Reaction (PCR) using different protocols and primers to detect the toxins *pirA* and *pirB*. Further, a linear correlation between the presence of AHPND and water quality was done using the R statistical program. **Results.** The presence of *Vibrio parahaemolyticus* causing AHPND occurred in 93.75 % (30/32) of sampled ponds in both farming areas. **Conclusion.** This work confirms the presence and wide distribution of AHPND in water and shrimp from thirty shrimp farms in the Costa Rican Pacific.

Keywords: White shrimp, *Penaeus vannamei*, PCR, *pirA/pirB*.

Introducción

La acuicultura es uno de los sectores de producción alimentaria que ha tenido un crecimiento acelerado a nivel mundial. Esta actividad representa 51,7 millones de toneladas de la producción pesquera mundial que es utilizada como fuente de alimento para los humanos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022). Para el 2030, los productos pesqueros entrarán en un periodo de baja productividad, mientras que los obtenidos de la acuicultura (especies de agua dulce y salobre) aumentarán (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022).

En Costa Rica, la acuicultura se ha incrementado desde el 2019, debido a la demanda nacional y al aumento de las exportaciones hacia Estados Unidos y Europa (Peña Navarro & Chacón Guzmán, 2019); mientras que la producción pesquera ha disminuido, y los especialistas concuerdan en que la acuicultura será la actividad que termine por sustituir la actividad pesquera (Peña Navarro & Chacón Guzmán, 2019). La producción acuícola en Costa Rica tiene al camarón (*Penaeus vannamei*) como la segunda especie más cultivada después de la tilapia (*Oreochromis niloticus*), por el volumen producido, pero el camarón tiene el mayor valor comercial, y alcanza en el mercado mayorista un valor por kilogramo pelado hasta diez dólares (Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura, 2023).

A nivel mundial, en los últimos quince años, el cultivo de camarón ha estado amenazado por distintas enfermedades infecciosas, lo cual ha producido pérdidas económicas estimadas en más de 15 billones de dólares (Lightner et al. 2011; Peña-Navarro et al., 2020). Ejemplos de estas enfermedades incluyen el virus del síndrome de la mancha blanca, el virus de la cabeza amarilla y el virus del síndrome de Taura (Aguirre-Guzmán et al., 2004; Morales-Covarrubias, 2004; Peña-Navarro et al., 2013; Tinwongger et al., 2014). Se ha reportado la emergencia de enfermedades bacterianas causadas por *V. parahaemolyticus* en Costa Rica (Varela & Peña, 2014) y México (Escobedo-Bonilla, 2016).

Las bacterias del género *Vibrio* han sido asociadas con diversas enfermedades en cultivos camaronícolas, lo que causa altas mortalidades (Morales-Covarrubias, 2004; Aguirre-Guzmán et al., 2004; Peña-Navarro et al., 2013; Tinwongger et al., 2014; Varela y Peña, 2016). Una enfermedad bacteriana conocida como el síndrome de

la mortalidad temprana (EMS, por sus siglas inglés), y luego denominada como enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés), ha sido el objeto de varios estudios, ya que ha causado grandes afectaciones a los cultivos de camarón (Pantoja & Lightner, 2014; Tran et al., 2013; Varela Mejías & Peña Navarro, 2015).

Los signos clínicos asociados a AHPND incluyen ataxia, nado errático, textura blanda, reducción en crecimiento, y áspera de la cutícula, anorexia, el cual puede presentarse interrumpido. Además, se observa atrofia y palidez del hepatopáncreas, causada por la pérdida de los pigmentos de la cápsula (Hong et al., 2016; Pantoja & Lightner, 2014; Varela Mejías & Peña Navarro, 2014).

La enfermedad (AHPND) inicia cuando las bacterias colonizan el tracto digestivo de los camarones, donde se libera una toxina binaria llamada Pir A/B. Esta toxina afecta las células epiteliales del hepatopáncreas, ocasiona su muerte y su desprendimiento masivo hacia el lumen del túbulo (Tran et al., 2013; Pantoja y Lightner, 2014).

En América, la enfermedad inició en México en 2013, causó mortalidades de hasta el 90 % en los estanques y redujo la producción camaronícola en los estados de Sonora, Nayarit y Sinaloa hasta un 70 % (Nunan et al., 2014; Pantoja & Lightner, 2014; [Sirikharin et al., 2015](#)). Luego, la bacteria se dispersó hacia Centroamérica y fue reportada en 2015 (Han et al., 2015). Luego, se identificó en Belice en los cultivos de camarón ([Shrimp News International, 2015](#)). Debido a que AHPND ha sido registrada en varios países latinoamericanos, el objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND en fincas de camarones en la zona del Pacífico de Costa Rica.

Materiales y métodos

Área de estudio y tamaño de muestra

El área de estudio comprendió la costa occidental del Golfo de Nicoya (Noroeste de Costa Rica) y la costa del Pacífico Central (Puntarenas-Parrita): Golfo de Nicoya y Parrita. durante el año 2019 y 2020, estas localidades se encuentran distribuidas entre la Región Chorotega y la Región Pacífico Central, respectivamente (Figura 1). En estas zonas se seleccionaron 32 fincas camaroneras de un total de 42 activas, se eligió un estanque con historial de presencia de enfermedades según las bitácoras de campo de cada establecimiento. De estas, dieciocho se ubicaron en la Región Pacífico Central y catorce más se encontraron en la Región Chorotega. Estas fincas fueron seleccionadas de forma aleatoria, con estanques de tierra, sistema extensivo y semi-intensivo, sin aireación continua y con recambio de agua semanal de hasta un 15 %. Además, el peso promedio de los camarones (*P. vannamei*) en los estanques muestreados fue entre 7 y 15 g (equivalente entre 7-12 semanas).

Las coordenadas geográficas de cada una de las fincas fueron registradas mediante un equipo satelital tipo GPS. En cada estanque se tomaron quince camarones de forma aleatoria y una muestra de agua (500 mL) a una profundidad de entre 10 – 20 cm recolectada en botellas estériles. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Análisis Genómico (LAGen) y el Laboratorio de Biotecnología Microbiana (LABIMI) de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, sede Heredia. El análisis sobre la calidad de aguas se realizó para sus parámetros físico-químicos de manera *in situ* por la Universidad Técnica Nacional (UTN), sede de Puntarenas.

Determinación de la calidad del agua

El análisis de la calidad del agua en los estanques seleccionados incluyó mediciones de temperatura (°C), pH y oxígeno disuelto (mg/L), mediante el uso de multiparámetros Hanna HI9828 (USA) en mg/L. La alcalinidad, amonio, nitritos, nitratos, potasio, fosfatos, salinidad y dureza, se cuantificaron con un fotómetro portátil LoviBond

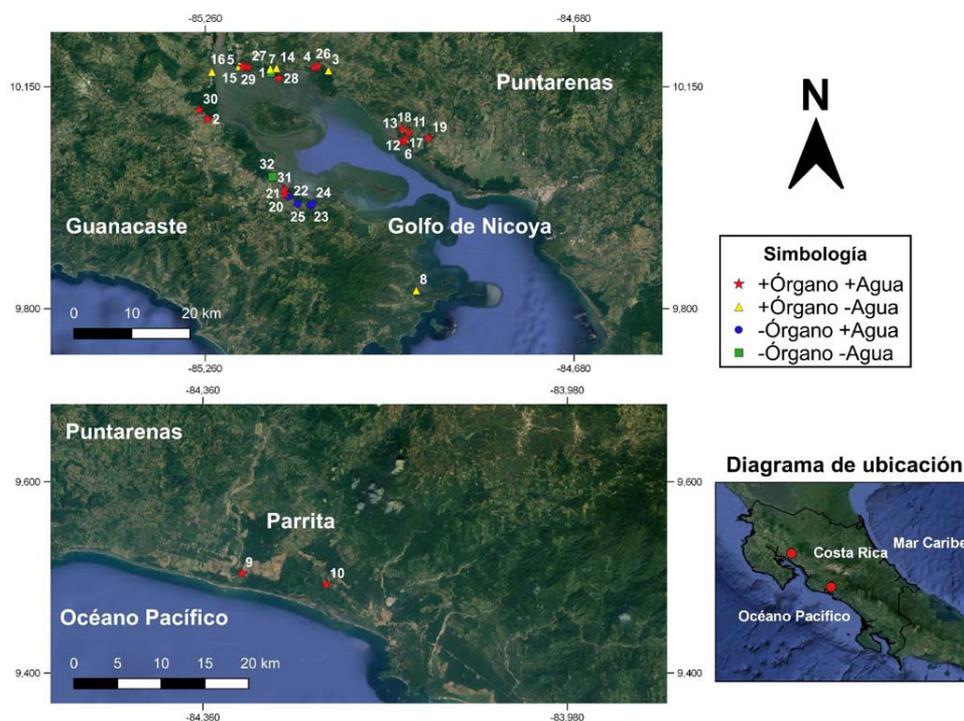


Figura 1. Distribución geográfica de las fincas productivas de camarón negativas y positivas a genes de las toxinas mediante PCR que ocasionan la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas en Costa Rica, 2019-2020. A. Fincas camaroneras ubicadas en el Golfo de Nicoya. B. Fincas camaroneras ubicadas en Puntarenas-Parrita, Costa Rica, 2019-2020.

Figure 1. Geographic distribution of shrimp farms, negative and positive to toxic genes by PCR causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in Costa Rica, 2019-2020. A. shrimp farms located at the Nicoya Gulf. B. shrimp farms located at Parrita. Costa Rica, 2019-2020.

MD 200 (Alemania), basado en Boyd & Tucker (1998). Todos los parámetros de calidad de agua se midieron en cada estanque de donde se obtuvieron muestras de camarón.

Toma de muestras en tejidos

La metodología usada fue la propuesta por Xu et al. (2014), con las siguientes modificaciones: se tomaron 15 individuos al azar de cada estanque para generar una muestra compuesta o “pool”. Luego fueron sacrificados para tomar el hepatopáncreas y el estómago. No se consideró la edad de los camarones como un factor para hacer el muestreo ya que las fincas cultivan en diferentes momentos del año y no hay homogeneidad total de tallas en el país. Los hepatopáncreas y estómagos fueron transportados en recipientes estériles y en el medio de transporte Cary-Blair en hielo ($\sim 4^{\circ}\text{C}$), al Laboratorio de Biotecnología Microbiana ubicado en la Sede Omar Dengo de la Universidad Nacional, Heredia.

De cada muestra compuesta por estanque se hicieron diluciones seriadas de base 10 en solución salina (2 % de NaCl) y se inocularon 100 μL en cajas de petri de 90 mm x 15 mm con 20 mL de agar tiosulfato citrato, sales

biliares y sacarosa (TCBS), y se incubaron a 30 °C por 24 h en condiciones aerobias. Después, se seleccionaron colonias probables de *Vibrio parahaemolyticus*. Se usó un control positivo de *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC® 17802™) y medio sin inocular estéril como control negativo.

Toma de muestras de agua para bacteriología

Fueron usadas botellas ámbar estériles para tomar muestras de agua compuestas (del centro y los extremos) de cada estanque. Se tomó 1 L por estanque a un 1m de profundidad, y fueron transportadas en hielo (~4 °C) al Laboratorio de Biotecnología Microbiana (LABIMI) de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional. La metodología utilizada fue la propuesta por Suárez et al. (2015) con las siguientes modificaciones: 100mL de cada muestra fue filtrada a través de membranas de nitrato de celulosa de 5µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (Sartorius stedim®). Las membranas fueron puestas en placas petri de 90 x 15 mm con 20 mL de agar TCBS, e incubadas a 30 °C por 24 h en condiciones aerobias (Kawatsu et al., 2015). Se incluyó un control positivo de *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC® 17802™) y medio sin inocular estéril como control negativo. Se seleccionaron las colonias probables de *Vibrio parahaemolyticus* resultantes.

Detección molecular de *Vibrio parahaemolyticus*

Se realizó una extracción del ADN de cepas aisladas a partir de muestras compuesta o “pool” de tejidos de camarón de cultivo *L. vannamei*, las cuales se identificaron a nivel morfológico como *Vibrio* sp, además de muestras de tejidos individuales de hepatopáncreas y estómago. El aislamiento de los ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante el kit comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel) con base en el protocolo recomendado por el fabricante.

La reacciones de PCR tiempo final y la secuenciación en dos direcciones se obtuvieron del fragmento parcial del gen *Photorhabdus insect related toxin A (pirA)* con base en los cebadores VpPirA-284F 5'-TGACTATTCTCACGATTGGACTG -3' y VpPirA-284R 5'-CACGACTAGCGCCATTGTTA-3', que amplificaron un segmento del gen PirA con un tamaño de 284 bp; así como los cebadores VpPirB-392F 5'-TGATGAAGTGATGGGTGCTC-3' y VpPirB-392R 5'-TGTAAGCGCCGTTTAACTCA-3', los cuales flanquean un fragmento del gen *pirB* (392 bp) (Han et al., 2015).

Como control positivo de amplificación se emplearon los mismos cebadores en ADN extraído a partir de un tejido de *L. vannamei* certificado por infección con necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND, causada por *V. parahaemolyticus*), obtenido del Laboratorio de Patología Acuícola de la Universidad de Arizona. Como control interno de reacción se amplificó el gen parcial de la B-actina de *L. vannamei*, con los cebadores Actin-F 5'-CCCAGAGCAAGAGAGGTA-3' y Actin-R3 5'-GCGTATCCTTCGTAGATGGG-3' con un tamaño de 339 bp (Dhar et al. 2001).

La PCR se diseñó con un Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific) con concentración final de 1X, 0.4 µM de cada cebador y 100-400 ng de ADN molde. Se siguieron los siguientes parámetros en el ciclo de PCR: desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C seguido de 35 ciclos a 95, 60 y 72 °C durante 30, 30 y 30 s, respectivamente. El ciclo se completó con una extensión final a 72 °C durante 7 min (Han et al., 2015). Los resultados de amplificación se documentaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %. Las muestras que amplificaron productos de tamaño aproximado a 284 bp (*pirA*) y 392 bp (*pirB*) se consideraron positivas. Se obtuvo la identidad molecular de los amplicones de *PirA* mediante secuenciación Sanger en dos direcciones (Macrogen, Korea).

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Geneious R9 (Dotmatics) y se identificaron mediante la herramienta básica de búsqueda de similitud local (BLASTn, por sus siglas en inglés) (Altschul et al.,

1990) de la base de datos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) mediante parámetros por defecto.

Se realizó un análisis de identidad molecular entre algunas secuencias parciales obtenidas de este estudio y las recuperadas de la base de datos Genbank, mediante una topología filogenética. Primero, se elaboró una matriz de las secuencias del gen *pirA* y se alinearon con el programa en línea MAFFT 7.0, con el método de refinamiento iterativo (G-INS-i) y el parámetro 200 PAM / $k = 2$ (Kato et al., 2019)). Por otro lado, se utilizó el programa Gblocks (Castresana, 2000) para seleccionar bloques conservados mediante parámetros menos estrictos de selección de bloques, obteniéndose hasta 284 bases nucleotídicas informativas.

Para determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica, las matrices individuales se analizaron con jModelTest 2.1.10 (Darriba et al., 2012) con la estrategia de selección mediante el criterio de información de Akaike (AIC) y un 95 % de intervalo de confianza. El árbol de identidad molecular se realizó con base en el algoritmo de máxima verosimilitud (ML) con el programa raxmlGUI (version 1.3; Silvestro y Michalak, 2012) con el modelo reversible en tiempo general (GTR), con un soporte de los nodos derivado del método bootstrapping (5000 réplicas). Los árboles fueron visualizados y editados con el programa FigTree 1.4 (Rambaut, 2007).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico del estudio se realizó una correlación lineal a un nivel de confianza del 95 % con el programa estadístico R (R Core Team, 2021), para determinar la relación entre los datos de presencia de *Vibrio parahaemolyticus* por estanque, obtenidos por detección molecular y los principales parámetros físico-químicos que determinan la calidad del agua. Además, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (r) para determinar la fuerza de correlación, ya que los datos no siguieron una distribución normal. Los criterios para interpretar la fuerza de la correlación fueron: 0,00-0,39 ninguna correlación a correlación débil; 0,40-0,70 correlación moderada; y 0,70 -1,00 correlación fuerte (Amal et al., 2015).

Resultados

Durante los muestreos, se observaron algunas mortalidades de camarones en los bordes de los 32 estanques. Los signos clínicos incluyeron nado errático, hepatopáncreas con coloración blanquecina e intestino con presencia no continua de alimento. A partir de estos aislados, tejidos y muestras de agua se obtuvo ADN en concentraciones que variaron entre 10,9 a 465,4 ng/ μ L. La electroforesis del ADN genómico mostró bandas de alto peso molecular que representan ADN íntegro y de elevada concentración, además, las reacciones PCR del control interno del gen parcial de la B-actina de *P. vannamei* mostró bandas de 339 bp como se esperaba, lo que indica que los ensayos moleculares no presentaron inhibición enzimática ni artefactos de la PCR.

Detección molecular de fragmentos parciales de los genes *pirA* y *pirB*

Se obtuvieron productos de PCR para *pirA* y *pirB* de un tamaño aproximado de 284 pb y 392 pb, respectivamente (Figura 2). Del total de 32 fincas muestreadas, el 80,00 % (24/32) resultaron con aislamientos positivos a partir de los órganos digestivos, y el 76,66 % aislados de agua (23/32), fueron positivos para los genes *pirA* y *pirB* (Cuadro 1). Un total de 56,66 % (17/32) fincas fueron positivas tanto en los aislamientos de órganos como de agua; el 21,87 % (7/32) fueron positivas en órganos, pero negativas en agua y el 18,75 % (6/32) fueron positivas en agua, pero negativas en los órganos.

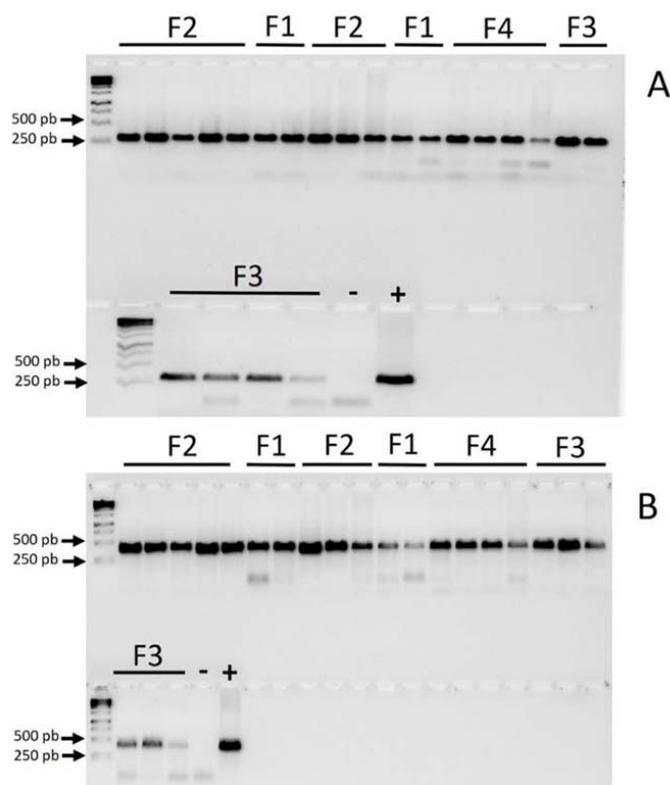


Figura 2. PCR en tiempo final con productos de amplificación de 284 pb para *pirA* (A) y 392 pb para *pirB* (B) para la detección de *V. parahaemolyticus* en muestras obtenidas de estanques de fincas de camarones del Golfo de Nicoya y Puntarenas-Parrita. Los carriles muestran los resultados de F1 (Finca Pochote), F2 (Finca Puerto Jesús), F3 (Finca El Trébol) y F4 (Finca La Reina). Golfo de Nicoya, Costa Rica, 2019-2020.

Figure 2. PCR endpoint with amplification products of 284 bp for *pirA* (A) and 392 bp for *pirB* (B) for the detection of *V. parahaemolyticus* in samples obtained from ponds of shrimp farms from the Gulf of Nicoya and Puntarenas-Parrita. Lanes show the results of F1 (Finca Pochote), F2 (Finca Puerto Jesus), F3 (Finca El Trebol) and F4 (Finca La Reina). Nicoya Gulf, Costa Rica, 2019-2020.

Cuadro 1. Evaluación por PCR punto final de la presencia/ausencia de los genes *pirA* y *pirB* mediante los cebadores VpPirA-284F/R y VpPirB-392F/R, en muestras de aislamientos de órganos y agua de camarón (*P. vannamei*). Golfo de Nicoya, Costa Rica, 2019-2020.

Table 1. Evaluation by endpoint PCR of the presence/absence of genes *pirA*/*pirB* through primers VpPirA-283F/R and VpPirB-392F/R, in samples of isolated organs and water of shrimp (*P. vannamei*). Nicoya Gulf, Costa Rica, 2019-2020.

Finca	Tejido		Agua	
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
F1, F32	-	+	-	+
F2, F4, F6, F7, F9, F10, F11, F12, F13, F18, F19, F20, F26, F28, F29, F30, F31	+	-	+	-
F3, F5, F8, F14, F15, F16, F27	+	-	-	+
F17, F21, F22, F23, F24, F25	-	+	+	-

Solo dos fincas (F29 y F32) fueron negativas a la presencia de los genes analizados tanto en órganos como en agua, lo que representa un 6,25 % (2/32) de fincas negativas a AHPND.

Al analizar la información por región, se obtuvo que, en la Región Pacífico Central, de un total de 18 fincas, 55,56 % presentaron casos positivos tanto en tejido como en agua, mientras que 33,34 % fueron positivas solo para el agua, en menor proporción (5,56 %), las muestras fueron positivas solo en tejido o existió ausencia total de presencia de la enfermedad. En la Región Chorotega, de un total de catorce fincas, 50 % presentaron casos positivos tanto en tejido como en agua, 42,86 % fueron positivas solo para el tejido, el resto de fincas no presentó presencia de enfermedad (Cuadro 2).

Cuadro 2. Prevalencia por región de los genes *pirA* y *pirB* mediante los cebadores VpPirA-284F/R y VpPirB-392F/R, en muestras de aislamientos de órganos y agua de camarón (*P. vannamei*). Golfo de Nicoya, Costa Rica, 2019-2020.

Table 2. Prevalence by region of genes *pirA/pirB* through primers VpPirA-283F/R and VpPirB-392F/R, in samples of isolated organs and water of shrimp (*P. vannamei*). Nicoya Gulf, Costa Rica, 2019-2020.

Región	Finca	Cantidad	Tejido	Agua	Prevalencia (%)
Región Pacífico Central		1	-	-	5,56
	F6,F8,F9,F10,F11,F12,F13,F17,F18,F19,	10	+	+	55,56
	F20,F21,F22,F23,F24,F25,F31,F32	1	+	-	5,56
		6	-	+	33,34
Total		18			100
Región Chorotega		1	-	-	7,14
	F1,F2,F3,F4,F5,F7,F14,F15,F16,F26,	7	+	+	50,00
	F27,F28,F29,F30	6	+	-	42,86
		0	-	+	0,00
Total		14			100

Secuenciación y análisis de identidad molecular

El análisis de identidad de las secuencias, mediante la herramienta BLASTn, reveló alta similitud con el gen *PirA* de *Vibrio parahaemolyticus* (número de accesoión del GenBank MH388411.1 y KU145399.1).

El análisis de posicionamiento filogenético de las secuencias parciales del gen codificante para la toxina *pirA* obtenidas y las extraídas del Genbank confirmaron la identidad de las muestras en estudio. La topología mostró que las cepas analizadas para *pirA* (Costa Rica) están localizadas en el cluster que contiene las secuencias de *Vibrio parahaemolyticus*, con un valor de soporte de la rama de un 100 % (Figura 3).

Distribución geográfica de AHPND en fincas camaroneras de Costa Rica

La distribución geográfica de las fincas negativas y positivas a AHPND se muestra en la Figura 1. Se encontró alrededor de todo el Golfo de Nicoya y en la zona del Pacífico Central Sur, presencia de fincas positivas a los genes que causan AHPND, tanto en tejido como en el agua.

Solo dos fincas (Finca 1 y 32) fueron negativas, mismas que se ubicaron en el cantón de Lepanto en Puntarenas y el cantón de Abangares en Guanacaste. Otras fincas fueron positivas en hepatopáncreas, pero negativas en muestras de agua (Fincas 3, 5, 8, 14, 15, 16 y 27), mientras otras fincas fueron positivas en el agua, pero negativas

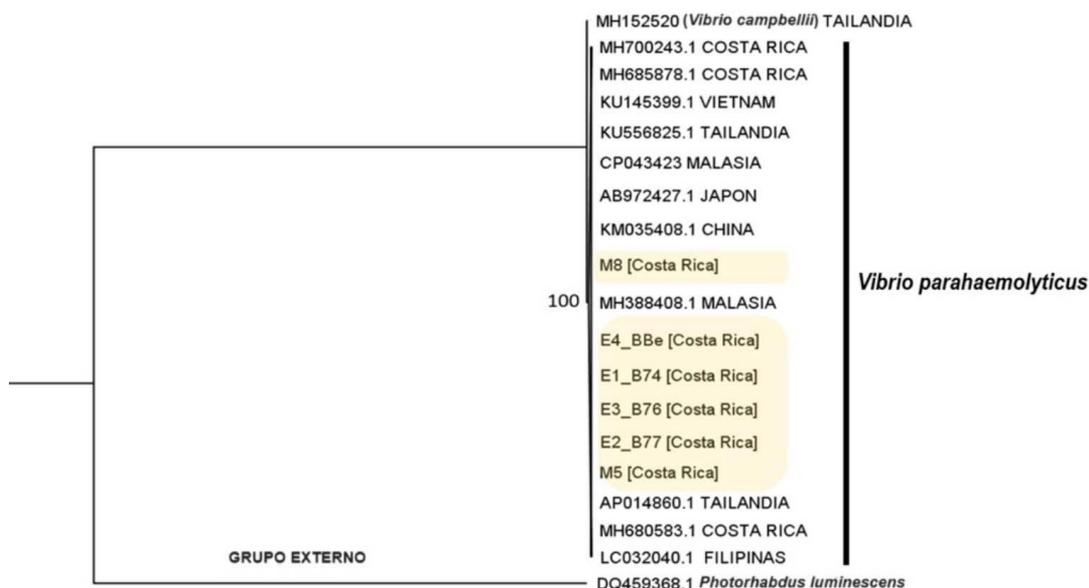


Figura 3. Topología de identificación molecular mediante máxima verosimilitud (ML), basado en secuencias parciales del gen de la toxina *pirA* de *Vibrio parahaemolyticus* (M5, M8, B74, B76, B77, BBe) y obtenidas del Genbank. El número en los nodos indica el valor de soporte bootstrap (porcentaje derivado de 5000 repeticiones). *Photorhabdus luminescens* está posicionado como Grupo externo en el árbol filogenético. Golfo de Nicoya, Costa Rica, 2019-2020.

Figure 3. Topology of molecular identification through maximum likelihood (ML) based on partial sequences of the *V. parahaemolyticus* toxin *pirA* gene (M5, M8, B74, B76, B77, BBe) obtained from GenBank. The node number indicates the bootstrap support value (percentage derived from 5000 repetitions). *Photorhabdus luminescens* is positioned as outgroup in the phylogenetic tree. Nicoya Gulf, Costa Rica, 2019-2020.

en hepatopáncreas (Fincas 17, 21, 22, 23, 24 y 25). La prevalencia de la enfermedad fue de 93,75 % del total de fincas muestreadas y de un 71,14 % del total de fincas activas durante el periodo de muestreo.

Calidad de agua

En los valores promedio de todas las fincas analizadas existió una correlación débil y no significativa entre la presencia de *V. parahaemolyticus* y los parámetros de temperatura ($r=0,1050$, $n=31$, $P>0,05$), amonio ($r=-0,1434$, $n=31$, $P>0,05$), fosfato ($r=0,1672$, $n=31$, $P>0,05$) y nitrato ($r=0,2243$, $n=31$, $P>0,05$); así como débil y significativa con la variable salinidad ($r=-0,3104$, $n=31$, $P<0,05$) (Cuadro 3). No se encontró ninguna correlación entre los datos de presencia de la bacteria con los parámetros restantes (pH y oxígeno).

Se realizó un análisis de correlación de los componentes principales entre las variables físico-químicas y presencia de *V. parahaemolyticus*. Se encontró correlación significativa entre amonio y salinidad ($r=0,7485$, $n=31$, $P<0,05$); oxígeno disuelto y pH ($r=0,3832$, $n=31$, $P<0,05$).

Cuadro 3. Valores de la media y desviación estándar (SD) para los parámetros de la calidad del agua analizados para todas las 32 fincas camaroneras y su correlación con la presencia de *V. parahaemolyticus*. Golfo de Nicoya, Costa Rica, 2019-2020.

Table 3. Average and standard deviation (SD) values for the parameters of water quality analyzed for all 32 farms and their correlation with the presence of *V. parahaemolyticus*. Nicoya Gulf, Costa Rica, 2019-2020.

Parámetro	Lectura (media \pm SD)	Coefficiente de correlación de Spearman	Fuerza de la correlación	P-value
Temperatura	31,73 \pm 1,30	0,1050	Débil	0,5740
pH	7,87 \pm 0,42	0,0685	Ninguna	0,7143
Oxígeno	5,50 \pm 1,87	0	Ninguna	1
Amonio	0,13 \pm 0,19	-0,1434	Débil	0,4414
Alcalinidad	111,84 \pm 48,00	-0,1233	Débil	0,5086
Fosfato	1,26 \pm 2,34	0,1672	Débil	0,3685
Nitrato	1,69 \pm 1,13	0,2243	Débil	0,2249
Salinidad	30,50 \pm 11,24	-0,3104	Débil	0,0892

Discusión

Los camarones de las fincas muestreadas presentaron signos compatibles con las enfermedades de la necrosis aguda del hepatopáncreas, independiente del estado de recolección de las muestras, como lo fueron hepatopáncreas de coloración pálida y músculo abdominal opaco, tal y como lo describió Morales-Covarrubias y Gómez-Gil (2014). Además, las fincas analizadas presentaron aves pescando camarones, lo cual es un indicador de mortalidad en camarones (Nguyen et al., 2021). Estos mismos autores indicaron mortalidades del 60-80 % en camarones juveniles, en granjas de cultivo semi-intensivo e intensivo en México, mientras que Kumar et al. (2014) describieron mortalidades masivas en la India asociadas a AHPND.

El uso de técnicas bacteriológicas en conjunto con técnicas moleculares como PCR en este trabajo para la detección de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en fincas de la costa Pacífico de Costa Rica, permitió obtener la identidad del patógeno, así como ha sido reportado en otros lugares (Lai et al., 2015; Han et al., 2015; Dong et al., 2017). La pureza y calidad del ADN extraído de camarón y bacterias permitió la amplificación del gen endógeno de camarón (β -actina) (Dhar et al., 2001) como control de integridad, lo que demuestra que no hubo inhibición del PCR debido a impurezas, lo que indica que los resultados positivos a la bacteria son confiables.

El análisis de secuencias por medio de BLASTn indica que el agente asociado a la mortalidad en estanques es *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND (Phiwsaiya et al., 2017; Theethakaew et al., 2017). Las secuencias obtenidas de este estudio tienen una similitud del 100 % con secuencias provenientes de cepas tipo Asia, mismos resultados obtenidos por Peña-Navarro et al. (2020), quienes determinaron en cinco fincas del Golfo de Nicoya la presencia de AHPND. Lo anterior difiere de los resultados obtenidos en la región, que han indicado que las muestras han concordado con las cepas tipo mexicana (Kumar et al. 2021). Esto podría indicar que en la región ya se encuentran las dos variantes de las cepas bacterianas que se han estudiado y Costa Rica presenta resultados distintos que el resto de América (Nunan et al., 2014). Estudios como los realizados por Han et al. (2015) han desarrollado métodos de PCR para caracterizar AHPND de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de cepas tipo mexicano o de tipo asiático basados en la presencia de un transposón de tipo Tn3, por lo que este tipo de análisis deben aplicarse en búsqueda del origen del agente infeccioso.

Este estudio determinó la ubicación de las fincas positivas a AHPND mediante el diagnóstico de los genes *pirA* y *pirB*. La presencia de AHPND es importante a lo largo de la costa del Pacífico, que incluye

este párrafo
venía cortado
así, algo falta

pes el Golfo de Nicoya y la zona del Pacífico Central. Este estudio incluyó el 76,19 % de todas las fincas activas en esta región en 2019 y 2020, y mostró una presencia significativa del agente infeccioso (71,42 %); por región, la Región Pacífico Central (95 %) presentó mayor cantidad de casos positivos tanto en tejido como en agua que en la Región Chorotega (93 %), siendo que en las fincas ubicadas en la Región Pacífico Central, la presencia del agente infeccioso fue mayor en muestras obtenidas del agua, lo que podría estar asociado a una mayor cantidad de desembocadura de ríos que descargan sedimentos y contaminación (Escobar, 2002). Estas áreas son de relevancia comercial asociada al cultivo de camarón, resultados similares a los expuestos en otros países donde se estudió la situación de AHPND de acuerdo con las diferentes regiones (Nunan et al., 2014; Eshik et al., 2018). Estudios realizados durante el 2016 y 2017 en México para determinar la prevalencia de AHPND alcanzaron intervalos de 53,30 y 60,60 %, respectivamente (Morales-Covarrubias et al. 2019), al aplicar técnicas moleculares, microbiológicas e histológicas.

En Costa Rica, la presencia de la enfermedad fue importante después del 2015 y su impacto negativo en la producción de camarón ocasionó serios problemas económicos en la industria, debido a las altas mortalidades de los camarones. El INCOPECA presentó estadísticas productivas donde se demuestra que desde el 2015, la producción de camarón se vio reducida y esto estaría vinculado a la presencia de enfermedades como AHPND (Ramírez et al., 2023). Una encuesta realizada por los mismos autores a 30 productores de Costa Rica durante el 2021, indicó que AHPND estuvo presente en el 90 % de los casos, lo que sería concordante con los resultados de este estudio. Durante el 2017-2018 se reportaron resultados de hasta 33 % de casos positivos en una muestra de quince fincas camaroneras en la misma región (Peña-Navarro et al., 2020).

Las muestras de agua y de órganos fueron positivas a AHPND, lo que sugiere que las bacterias causantes de dicha patología se encuentran presentes tanto en el ambiente acuático como en los camarones, afectaron a los organismos y causaron mortalidades, con una clara relación entre aguas con presencia de bacterias patogénicas y camarones enfermos, resultados que complementan otros estudios asociados a AHPND en Costa Rica (Peña-Navarro et al., 2020).

Una inadecuada calidad del agua es uno de los factores que más contribuyen a la presencia de patógenos, las bacterias son una de las causas más importantes (Chumpol et al., 2017), esto en combinación con otros factores como deficientes nutrimentos, al crecimiento y estrés, pueden provocar alta mortalidad. Ante esto, es necesario una mejor gestión de la calidad del agua y de las buenas prácticas de manejo en estanques, lo cual se puede lograr mediante el monitoreo de los parámetros de la calidad del agua, que se hace necesario reducir la descomposición de residuos orgánicos vinculados con altas concentraciones de nitrógeno y fósforo, factores que promueven la proliferación de patógenos (Nimrat et al., 2012). Los sitios donde las muestras de órganos positivas a AHPND, pero negativas en el agua, ocurrieron en baja proporción. Este resultado sugiere que el estanque podría estar en las etapas finales de una epizootia.

Con respecto a las fincas que no presentaron AHPND, es posible que se debiera a una situación causal, por lo que no se puede confirmar su ausencia en estos sitios, ya que el estudio solo abarcó un ciclo de cultivo durante el año, además, el manejo entre las fincas puede variar, al igual que la capacidad de recambio del agua. No se observó una correlación significativa entre la presencia de *V. parahaemolyticus* con los parámetros físico-químicos del agua, solo hubo una correlación débil significativa entre la presencia de la bacteria y la salinidad. Esto sugiere hacer estudios más extensos para confirmar una posible relación entre estos factores. Niveles menores a 4 mg/L de oxígeno disuelto, acidificación del agua y fluctuaciones de la salinidad y la temperatura, afectan la capacidad del camarón para realizar sus funciones vitales, genera estrés y afecta al sistema de defensa, lo que dificulta al camarón combatir a patógenos presentes en el estanque (Tendencia, 2010), donde el género *Vibrio* sp., es conocido por ser el mayor patógeno bacteriano causante de mortalidad en los cultivos de camarón en el mundo (Ananda Raja et al., 2017).

Conclusiones

Este trabajo registró por bacteriología y PCR la presencia de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas en estanques muestreados en las principales zonas camaronícolas de Costa Rica, con una prevalencia del 93,75 %. Esto confirma la presencia de la necrosis aguda del hepatopáncreas tanto en camarones (*P. vannamei*) (hepatopáncreas y estómago) y en agua, en estanques de la mayoría de las fincas muestreadas. Se encontró correlación significativa entre amonio, salinidad, oxígeno disuelto y pH, y la presencia de *V. parahaemolyticus* en las muestras de agua analizadas, por lo que estudios amplios y periódicos en fincas camaronícolas, son necesarios para confirmar una posible relación entre estos factores y la enfermedad AHPND.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica por el financiamiento mediante el proyecto F33-17: Determinación de la calidad del agua y la presencia de bacterias patógenos oportunistas que afectan la productividad de sistemas acuícolas en Costa Rica.

Conflicto de intereses

Los autores no presentan conflictos de intereses

Referencias

revisar orden alfabético,
varias citas mal acomodadas

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 25(22), 4692–4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Ananda Raja, R., Sridhar R., Balachandran, C., Palanisammi, A., Ramesh, S., & Nagarajan, K. (2017). Pathogenicity profile of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 67, 368–381. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.020>
- Amal, M. N. A., Zamri-Saad, M., Siti-Zahrah, S., & Zulkafli, A. R. (2015). Water quality influences the presence of *Streptococcus agalactiae* in cage cultured red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture Research*, 46(2), 313–323.
- Aguirre-Guzmán, G., Mejía, H., & Ascencio, F. (2004). A review of extracellular virulence products of *Vibrio* species important diseases of cultivated shrimp. *Aquaculture Research*, 35(15), 1395–1404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01165.x>
- Boyd, C. E., & Tucker, C. S. (1998). *Pond aquaculture water quality management*. Chapman and Hall
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 540–552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>

- Chumpol, S., Kantachote, D., Nitoda, T., & Kanzaki, H. (2017). The roles of probiotic purple nonsulfur bacteria to control water quality and prevent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) for enhancement growth with higher survival in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during cultivation. *Aquaculture*, 473, 327-336. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.033>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Dhar, A. K., Roux, M. M., & Klimpel, K. R. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR Green chemistry. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2835–2845. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2835-2845.2001>
- Dong, X., Hailiang, V., Xie, G., Peizhuo, Z., Chengcheng, G., Yan, L., & Huang, J. (2017). An isolate of *Vibrio campbelli* carrying the pir^{VP} gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease. *Emerging Microbes & Infections*, 6, 1-3. <https://doi.org/10.1038/em.2016.131>
- Escobar, J. (2002). *La contaminación en los ríos y sus efectos en las áreas marinas y costeras*. CEPAL.
- Escobedo-Bonilla, C.M. (2016). Emerging Infectious Diseases Affecting Farmed Shrimp in Mexico. *Austin Journal Biotechnology & Bioengineering*, 3(2), Article 1062. <https://austinpublishinggroup.com/biotechnology-bioengineering/fulltext/ajbte-v3-id1062.php>
- Eshik, M. M., Abedin, M. M., Punom, N., Begum, M. K., & Rahman, M. S. (2018). Molecular Identification of AHPND Positive *Vibrio Parahaemolyticus* causing an outbreak in South-West Shrimp Farming Regions of Bangladesh. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 41(2), 127-135. <https://doi.org/10.3329/JBAS.V41I2.35492>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul*. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Han, J., Tang, K., & Lightner, D.V. (2015a). Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Disease Aquatic Organisms*, 115, 245–251. <http://dx.doi.org/10.3354/dao02906>
- Hong, X., Lu, L. & Xu, D. (2016). Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture International*, 24, 577–593. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9948-x>
- Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. T., Chen, I. T., Chuang, J. C., Mavichak, R., Chang, S. H., Yeh, M. D., Chiang, Y. A., Takeyama, H., Hamaguchi, H. O., Lo, C. F., Aoki, T., & Wang, H. C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 47(2), 1006–1014. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.008>
- Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura. (2023). *Precios y volúmenes de productos pesqueros y acuícolas ofrecidos en mercado mayorista de CENADA*. <https://bpm.pima.go.cr/CM.aspx?id=32>
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kawatsu, K., Sakata, J., Yonekita, T., & Kumeda, Y. (2015). Evaluation of an immunochromatographic assay for direct identification of thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* colonies on selective agar plates. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 4-6. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.020>

- King-Smith, C., Vagnozzi, R. J., Fischer, N. E., Gannon, P., & Gunnam, S. (2014).** Orientation of actin filaments in teleost retinal pigment epithelial cells, and the effect of the lectin, Concanavalin A, on melanosome motility. *Visual Neuroscience*, 31, 1-10. <https://doi.org/10.1017/s0952523813000618>
- Kumar, B. K., Deekshit, V. K., Rai, P., Shekar, M., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2014). Presence of T3SS2 β genes in trh+ *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along Mangalore coast India. *Letter Applied Microbiology*, 58, 440–446. <https://doi.org/10.1111/lam.12210>
- Kumar, V, Roy S, Behera, B. K, Bossier, P., & Das, B. K. (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture. *Toxins*, 13(8), Article 524. <https://doi.org/10.3390/toxins13080524>.
- Luo, K., Yuan, H., Zhang, W., & Xu, Q. (2018).** Two rapid methods to identify three species of pathogenic vibrio in *Penaeus vannamei*. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgah*, 70, 1-7. <http://dx.doi.org/10.46989/001c.20945>
- Morales-Covarrubias, M. S. (2004). *Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología*. Editorial Trillas.
- Morales-Covarrubias, M. S., & Gómez-Gil, B. (2014). *Enfermedades bacterianas*. OIRSA.
- Morales-Covarrubias, M. S., García-Aguilar, N., Bolan-Mejía, M., & Guillermo Zamora, O. (2019). Prevalence of the major diseases in *Penaeus vannamei* farmed of México. *Revista Científica*, 29(3), 198-206. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/32298/33713>
- Nguyen, H. T., Van, T. N., Ngoc, T. T., Boonyawiwat, V., Rukkamsuk, T., & Yawongsa A. (2021). Risk factors associated with acute hepatopancreatic necrosis disease at shrimp farm level in Bac Lieu Province, Vietnam. *Veterinary World*, 14(4), 1050-1058. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1050-1058>.
- Nunan, L., Lightner, D. V., Pantoja, C., & Gómez-Jiménez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Disease Aquatic Organisms*, 111, 81-86. <https://doi.org/10.3354/dao02776>
- Nimrat S., Suksawat S., Boonthai T., & Vuthiphandchai V. (2012). Potential Bacilluprobiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, 159, 443-450. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.029>
- Pantoja, C., & Lightner D. V. (2014). *EMS/AHPND descripción de la enfermedad en Asia y América*. OIRSA.
- Phiwsaiya, K., Charoensapri, W., Taengphu, S., Dong, H. T., Sangsuriya, P., Nguyen, G.T.T., Pham, H. Q., Amparyup, P., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Sithigorngul, P., & Senapin, S. (2017). A natural *Vibrio parahaemolyticus* Δ pirA Vp pirB Vp+ mutant kills shrimp but produces neither Pir Vp toxins nor acute hepatopancreatic necrosis disease lesions. *Applied Environmental Microbiology*, 83(16), Article e00680-1. <https://doi.org/10.1128/aem.00680-17>
- Peña-Navarro, N., Vargas-Cordero, R., & Varela-Mejías, A. (2013). Productos naturales como estimuladores del sistema inmunológico de *Litopenaeus vannamei*, infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agronomía Mesoamericana*, 24(1), 133-147. <https://doi.org/10.15517/am.v24i1.9790>
- Peña-Navarro, N., Castro-Vásquez, R., Vargas-Leitón, B., & Dolz, G. (2020). Molecular detection and risk factors associated with acute hepatopancreas necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* cultivated in Costa Rica. *Aquaculture*, 523, Article 735190. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735190>

- Peña Navarro, N., & Chacón Guzmán, J. (2019). Acuicultura en Costa Rica. *World Aquaculture*, 50(2), 23-28. <https://www.was.org/Magazine/Vol/50/2>
- R Core Team (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rambaut, A. (2007). *FigTree* (Version 1.4.4) [Computer software]. GitHub. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Ramírez Flores, S., Sánchez Godínez, C., Villalobos Rojas, F., Jiménez Ramón, J.A., Josephy Hernández, I. L., Barrantes Nuñez, M., & Salas Moya, C. (2023). *Antecedentes y situación actual de la maricultura en Costa Rica, con énfasis en el cultivo de camarón en el Golfo de Nicoya*. Fundación MarViva.
- Silvestro, D., & Michalak, I. (2012). raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution*, 12(4), 335-337. <http://dx.doi.org/10.1007/s13127-011-0056-0>
- Stoknes, I. S., Økland, H. M. W., Falch, E., & Synnes, M. (2004).** Fatty acid and lipid class composition in eyes and brain from teleosts and elasmobranchs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 138, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.03.009>
- Suárez, M. G., Medina, Z., Montiel, M., Ibarra, J., & Salcedo, A. (2015). Distribucion de *Vibrio* spp. en agua y sedimento de estanques productores de camarón *Litopenaeus vannamei* cultivados con agua del lago de Maracaibo (Venezuela). *Revista Científica*, 25(4), 293-299.
- Suárez, M. G., Medina, Z., Montiel, M., Ibarra, J., & Salcedo, A. (2015). Distribución de *Vibrio* spp. En agua y sedimento de estanques productores de camarón *Litopenaeus vannamei* cultivados con agua del lago de Maracaibo (Venezuela). *Revista Científica*, 25(4), 293-299.
- Tendencia, E. A., Bosma, R. H., & Verreth, J. A. J. (2010). WSSV risk factors related to water physico-chemical properties and microflora in semi-intensive *Penaeus monodon* culture ponds in the Philippines. *Aquaculture*, 302, 164-168. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.008>
- Tinwongger, S., Proespraiwong, P., Thawonsuwan, J., Sriwanayos, P., Kongkumnerd, J., Chaweepeak, T., Mavichak, R., Unajak, S., Reiko, N., Hidehiro, K., & Ikuo, H. (2014). Development of PCR Diagnosis for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) Strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathology*, 49(4), 159-164. <https://doi.org/10.3147/jsfp.49.159>
- Theethakaew, C., Nakamura, S., Motooka, D., Matsuda, S., Kodama, T., Chonsin, K., Suthienkul, O., & Iida, T. (2017). Plasmid dynamics in *Vibrio parahaemolyticus* strains related to shrimp acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS). *Infectious Evolution*, 51, 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.007>
- Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005).** A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246, 37-61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.002>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R., Mohney, L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K., & Lightner, D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Disease Aquatic Organisms*, 105, 45-55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>
- Varela Mejías, A., & Peña Navarro, N. (2014). Síndrome de la mortalidad temprana (EMS/AHPNS) en camarones cultivados: Una revisión. *Repertorio Científico*, 17(1), 25–30. <https://revistas.uned.ac.cr/index.php/repertorio/article/view/2563>

- Varela Mejías, A., & Peña Navarro, N. (2015). Hepatopancreatitis necrotizante asociada al fenómeno del Niño, en cultivos de camarones del Golfo de Nicoya. *Repertorio Científico*, 18(1), 29–34. <https://revistas.uned.ac.cr/index.php/repertorio/article/view/2553>
- Varela, A., & Peña, N. (2016). Histopatología diferencial de tres enfermedades bacterianas que afectan el hepatopáncreas de camarones peneidos. *Agronomía Mesoamericana*, 27(1), 73-80. <https://doi.org/10.15517/am.v27i1.21887>
- Xu, X., Wu, Q., Zhang, J., Cheng, J., Zhang, S., & Wu, K. (2014). Prevalence, pathogenicity, and serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp from Chinese retail markets. *Food Control*, 46, 81-85. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.042>
- Yabar, C. (2003).** *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Serie de normas técnicas.* Instituto Nacional de Salud.

Manuscrito aceptado