



## 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-Navarro<sup>1</sup>, Jorengeth Abad Rodríguez-Rodríguez<sup>2</sup>, Rodolfo Umaña-Castro<sup>3</sup>,  
Carolina Sancho-Blanco<sup>3</sup>, Karen Oviedo-Bolaños<sup>3</sup>, Cesar Marcial Escobedo-Bonilla<sup>4</sup>

\* Recepción: 18 de marzo, 2024. Aceptación: 21 de mayo, 2024. La investigación se deriva 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”, financiado por la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica.

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

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

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

<sup>4</sup> 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](mailto: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, así como 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 de camarones en la zona del Pacífico de Costa Rica. **Materiales y métodos.** Durante los años 2019 y 2020, se recolectaron camarones (*Penaeus vannamei*) y agua de estanques de 32 fincas localizadas en la costa occidental del golfo de Nicoya (noroeste del país) y la costa del Pacífico Central (Puntarenas-Parrita). Los camarones recolectados en los muestreos tenían un peso de 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*. Además, se hizo 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 camaroneras 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 the hepatopancreas, also showing atrophy and discoloration of that organ. Diseased shrimp display anorexia with empty guts, weakness, body discoloration and high mortality. **Objective.** To determine the prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* causing AHPND in farms that grow shrimp in the Pacific zone of Costa Rica. **Materials and methods.** During the years 2019 and 2020, water and shrimp (*Penaeus vannamei*) samples were obtained from 32 farms located on the western coast of the Nicoya Gulf (Northwest Costa Rica) and the Central Pacific coast (Puntarenas-Parrita). The samples were analyzed by 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 anualmente 51,7 millones de toneladas de la producción pesquera global que es utilizada como fuente de alimento para los humanos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 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 (FAO, 2022).

En Costa Rica, la acuicultura 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). En cambio, 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). En la producción acuícola de Costa Rica, el camarón (*Penaeus vannamei*) es la segunda especie más cultivada después de la tilapia (*Oreochromis niloticus*), en cuanto al volumen producido. Sin embargo, el camarón tiene el mayor valor comercial y alcanza en el mercado mayorista un valor por kilogramo pelado de hasta diez dólares (Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura, s.f.).

A nivel mundial, en los últimos quince años, el cultivo de camarón ha estado amenazado por distintas enfermedades infecciosas, lo cual ha provocado pérdidas económicas estimadas en más de 15 billones de dólares (Lightner, 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). La emergencia de enfermedades bacterianas causadas por *V. parahaemolyticus* se ha reportado en Costa Rica (Varela Mejías & Peña Navarro, 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 (Aguirre-Guzmán et al., 2004; Morales-Covarrubias, 2004; Peña-Navarro et al., 2013; Tinwongger et al., 2014; Varela-Mejías y Peña-Navarro, 2016). Una enfermedad bacteriana conocida como el síndrome de la mortalidad temprana (EMS, por sus siglas en 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, cutícula áspera y anorexia, la cual puede presentarse de manera interrumpida. Además, se observa atrofia y palidez del hepatopáncreas, a causa de 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, ocasionando su muerte y su desprendimiento masivo hacia el lumen del túbulo (Pantoja y Lightner, 2014; Tran et al., 2013).

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). La bacteria se dispersó hacia Centroamérica y fue reportada en 2015 en varios países por 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

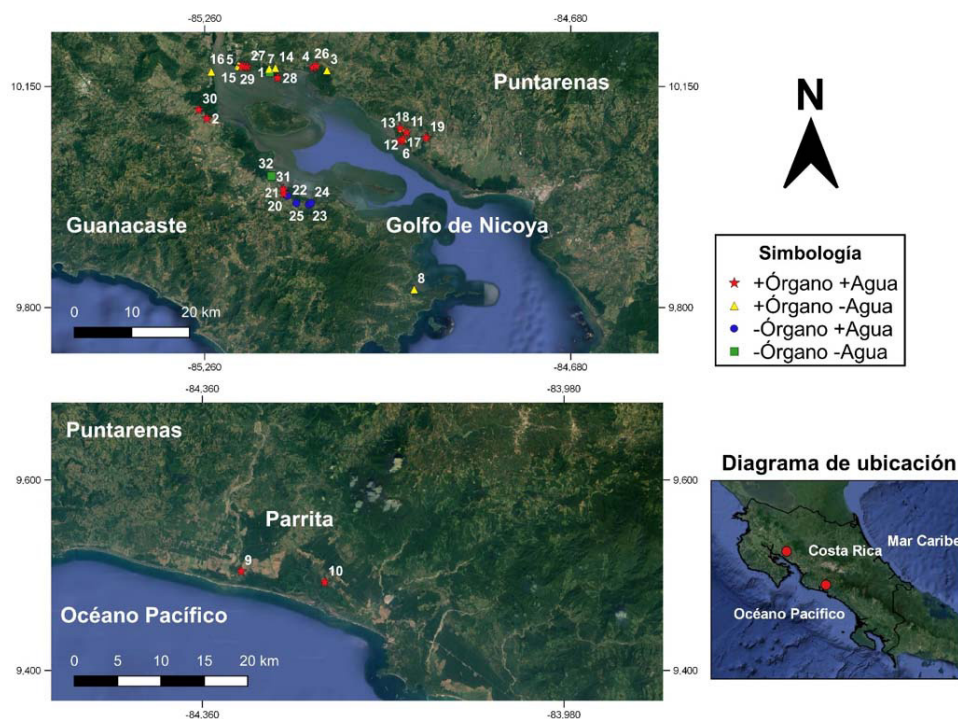
### Área de estudio y tamaño de la muestra

El área de estudio comprendió la costa occidental del golfo de Nicoya (noroeste de Costa Rica) y la costa del Pacífico Central (Puntarenas-Parrita) de Costa Rica, durante los años 2019 y 2020. Estas localidades se encuentran distribuidas en 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 y se eligió un estanque con historial de presencia de enfermedades según las bitácoras de campo de cada establecimiento. Dieciocho fincas se ubicaron en la Región Pacífico Central y las catorce restantes se encontraron en la Región Chorotega; estas 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 de 500 mL a una profundidad de entre 10-20 cm, recolectada en botellas estériles. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Análisis Genómico y el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, sede Heredia. El análisis de la calidad del agua se efectuó, para sus parámetros físico-químicos, de manera *in situ* por la Universidad Técnica Nacional, 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 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.



**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. 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 for toxin genes by PCR, causing acute hepatopancreatic necrosis disease. A. Shrimp farms located in the Nicoya Gulf. B. Shrimp farms located in Puntarenas-Parrita. Costa Rica, 2019-2020.

### Toma de muestras en tejidos

La metodología usada para la toma de muestras en tejidos fue la propuesta por Xu et al. (2014), con las siguientes modificaciones: se tomaron 15 individuos de cada estanque al azar para generar una muestra compuesta o *pool*. Luego, los camarones fueron sacrificados para extraer el hepatopáncreas y el estómago. No se consideró su edad como un factor para 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 realizaron diluciones seriadas de base 10 en solución salina (2 % de NaCl); se inocularon 100  $\mu\text{L}$  en cajas de Petri de 90 mm  $\times$  15 mm con 20 mL de agar tiosulfato citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS), y se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 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 estéril sin inocular como control negativo.

## Toma de muestras de agua para bacteriología

Se utilizaron botellas ámbar estériles para tomar muestras de agua compuestas (del centro y los extremos) de cada estanque. Se extrajo 1 L por estanque a una profundidad de 1 m, y se transportaron las muestras en hielo (~4 °C) al Laboratorio de Biotecnología Microbiana 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: 100 mL de cada muestra fueron filtrados a través de membranas de nitrato de celulosa de 5 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (Sartorius Stedim®). Las membranas se colocaron en placas Petri de 90 × 15 mm con 20 mL de agar TCBS, y se incubaron a 30 °C durante 24 h en condiciones aerobias (Kawatsu et al., 2015). Se incluyó un control positivo de *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC® 17802™) y un medio sin inocular estéril como control negativo. Se seleccionaron las colonias probables de *Vibrio parahaemolyticus* resultantes.

## Detección molecular de *Vibrio parahaemolyticus*

Se efectuó 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 morfológicamente como *Vibrio* sp., así como de muestras de tejidos individuales de hepatopáncreas y estómago. El aislamiento de los ácidos nucleicos se llevó a cabo utilizando el kit comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Las reacciones de PCR en 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* de 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 β-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, seguida de 35 ciclos a 95, 60 y 72 °C durante 30 s cada uno. 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 tamaños aproximados a 284 bp (*pirA*) y 392 bp (*pirB*) se consideraron positivas. La identidad molecular de los amplicones de *pirA* se determinó por medio de secuenciación Sanger en dos direcciones (Macrogen, Korea).

Las secuencias obtenidas se editaron 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, utilizando los parámetros por defecto.

Se realizó un análisis de identidad molecular entre algunas secuencias parciales obtenidas en este estudio y las recuperadas de la base de datos GenBank, por medio de 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 (Katoh et al., 2019)). Además, se utilizó el programa Gblocks

(Castresana, 2000) para seleccionar bloques conservados, empleando parámetros menos estrictos de selección de bloques, lo que permitió obtener 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) utilizando 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 (versión 1.3; Silvestro & Michalak, 2012) y 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 1.4.4 (Rambaut, 2007).

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico del estudio, se llevó a cabo una correlación lineal a un nivel de confianza del 95 % con el programa estadístico R (R Core Team, 2021), a fin de determinar la relación entre los datos de presencia de *Vibrio parahaemolyticus* por estanque, obtenidos mediante 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 identificar la fuerza de correlación, ya que los datos no siguieron una distribución normal. Los criterios para interpretar la fuerza de la correlación fueron los siguientes: 0,00-0,39, sin correlación a correlación débil; 0,40-0,70, correlación moderada, y 0,70 -1,00, correlación fuerte (Amal et al., 2015).

## **Resultados**

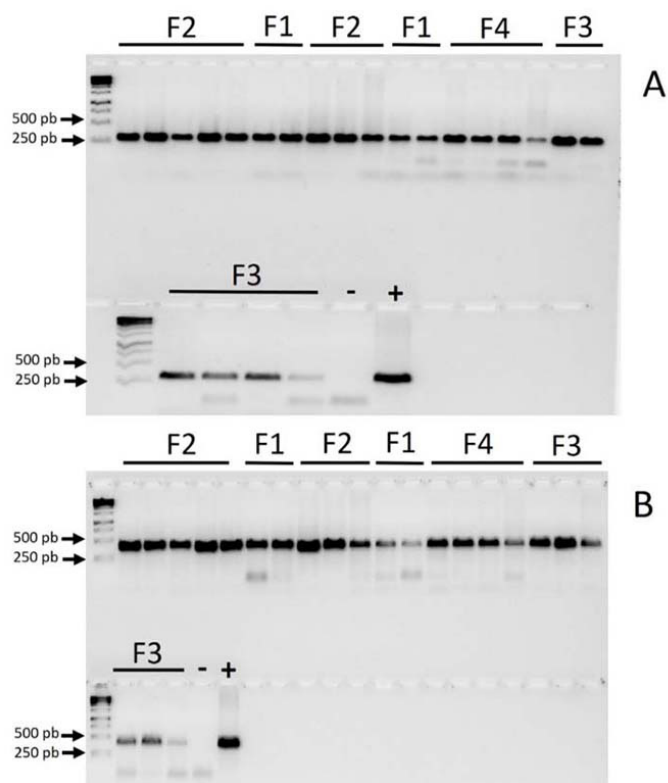
Durante los muestreos, se observaron algunas mortalidades de camarones en los bordes de los 32 estanques. Los signos clínicos incluyeron nado errático, hepatopáncreas con coloración blanquecina e intestino con presencia no continua de alimento. A partir de estos aislados, tejidos y muestras de agua, se obtuvo ADN en concentraciones que variaron entre 10,9 y 465,4 ng/ $\mu$ 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  $\beta$ -actina de *P. vannamei* mostraron 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* con tamaños aproximados a 284 pb y 392 pb, respectivamente (Figura 2). Del total de 32 fincas muestreadas, el 80,00 % (24/32) resultó con aislamientos positivos a partir de los órganos digestivos, y el 76,66 % de los aislados de agua (23/32) fueron positivos para los genes *pirA* y *pirB* (Cuadro 1). Un total de 56,66 % (17/32) de las 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.

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 observó que, en la Región Pacífico Central, de un total de 18 fincas, el 55,56 % presentó casos positivos tanto en tejido como en agua, mientras que 33,34 % solo en el agua. En menor proporción (5,56 %), las muestras fueron positivas solo en tejido o no se detectó presencia de la enfermedad. En la



**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. Costa Rica, 2019-2020.

Los carriles muestran los resultados de F1 (finca Pochote), F2 (finca Puerto Jesús), F3 (finca El Trébol) y F4 (finca La Reina).

**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 shrimp farm ponds in the Nicoya Gulf and Puntarenas-Parrita. Costa Rica, 2019-2020.

Lanes show the results from F1 (Pochote farm), F2 (Puerto Jesus farm), F3 (El Trebol farm) and F4 (La Reina farm).

**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 y Puntarenas-Parrita, Costa Rica, 2019-2020.

**Table 1.** Evaluation by endpoint PCR of the presence/absence of *pirA* and *pirB* genes through primers VpPirA-284F/R and VpPirB-392F/R, in samples of isolated organs and water of shrimp (*P. vannamei*). Nicoya Gulf and Puntarenas-Parrita, 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	-	+	+	-

Región Chorotega, de un total de 14 fincas, el 50 % tuvo casos positivos tanto en tejido como en agua, el 42,86 % solo en el tejido, y el resto de fincas no mostró 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 y Puntarenas-Parrita, Costa Rica, 2019-2020.

**Table 2.** Prevalence by region of *pirA* and *pirB* genes through primers VpPirA-284F/R and VpPirB-392F/R, in samples of isolated organs and water of shrimp (*P. vannamei*). Nicoya Gulf and Puntarenas-Parrita, 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, F20,F21,F22,F23,F24,F25,F31,F32	10	+	+	55,56
		1	+	-	5,56
		6	-	+	33,34
Total		18			100
Región Chorotega		1	-	-	7,14
	F1,F2,F3,F4,F5,F7,F14,F15,F16,F26, F27,F28,F29,F30	7	+	+	50,00
		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).

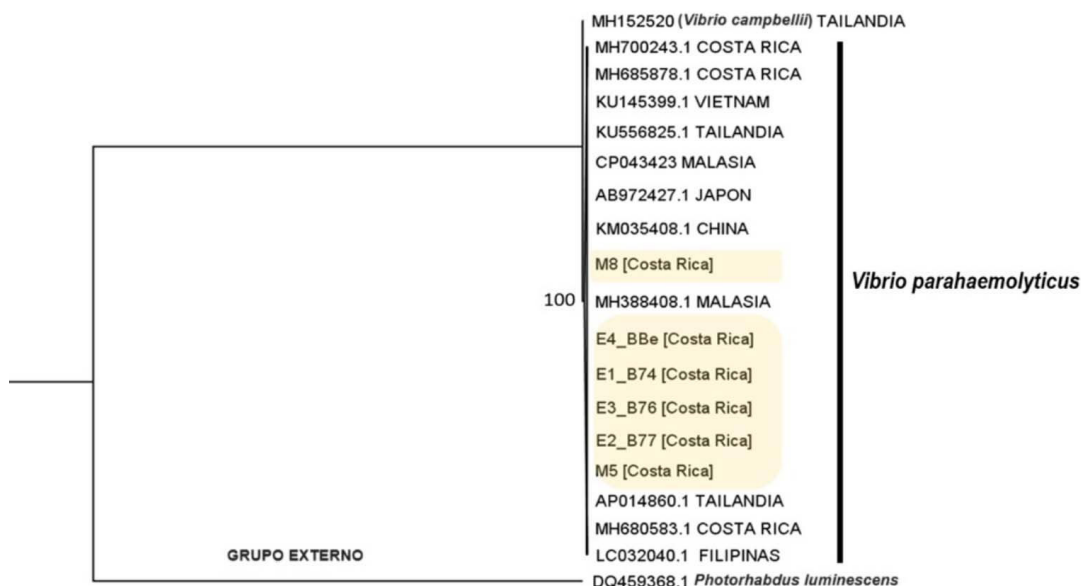
El análisis de posicionamiento filogenético de las secuencias parciales del gen codificante para la toxina *pirA* obtenidas y las extraídas del Genbank confirmaron la identidad de las muestras en estudio. La topología mostró que las cepas analizadas para *pirA* (Costa Rica) están localizadas en el clúster 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. Alrededor de todo el golfo de Nicoya y en la zona del Pacífico Central Sur, se encontró presencia de fincas positivas a los genes causantes de AHPND, tanto en tejido como en el agua.

Solo dos fincas (1 y 32), localizadas en el cantón de Lepanto en Puntarenas y el cantón de Abangares en Guanacaste, resultaron negativas. Otras fincas fueron positivas en hepatopáncreas, pero negativas en muestras de agua (fincas 3, 5, 8, 14, 15, 16 y 27), mientras que otras fueron positivas en el agua, pero negativas 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 71,14 % del total de fincas activas durante el periodo de muestreo.





**Figura 3.** Topología de identificación molecular mediante máxima verosimilitud (ML), basada en secuencias parciales del gen de la toxina *pirA* de *Vibrio parahaemolyticus* (M5, M8, B74, B76, B77, BBe), obtenidas del GenBank. Golfo de Nicoya y Puntarenas-Parrita, Costa Rica, 2019-2020.

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.

**Figure 3.** Topology of molecular identification through maximum likelihood (ML) based on partial sequences of the *V. parahaemolyticus* *pirA* toxin gene (M5, M8, B74, B76, B77, BBe), obtained from GenBank. Nicoya Gulf and Puntarenas-Parrita, Costa Rica, 2019-2020.

The node number indicates the bootstrap support value (percentage derived from 5000 repetitions). *Photorhabdus luminescens* is positioned as outgroup in the phylogenetic tree.

## Calidad de agua

En los valores promedio de todas las fincas analizadas, se observó 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 una correlación débil y significativa con la variable salinidad ( $r = -0,3104$ ,  $n = 31$ ,  $p < 0,05$ ) (Cuadro 3). No se encontró ninguna correlación entre la presencia de la bacteria y los parámetros restantes (pH y oxígeno).

Se realizó un análisis de correlación de los componentes principales entre las variables físico-químicas y la presencia de *V. parahaemolyticus*. Se encontró una correlación significativa entre amonio y salinidad ( $r = 0,7485$ ,  $n = 31$ ,  $p < 0,05$ ), y entre 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 en las 32 fincas camaroneras y su correlación con la presencia de *V. parahaemolyticus*. Golfo de Nicoya y Puntarenas-Parrita Costa Rica, 2019-2020.

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

Parámetro	Lectura (media ± SD)	Coefficiente de correlación de Spearman	Fuerza de la correlación	P-value
Temperatura	31,73 ± 1,30	0,1050	Débil	0,5740
pH	7,87 ± 0,42	0,0685	Ninguna	0,7143
Oxígeno	5,50 ± 1,87	0	Ninguna	1
Amonio	0,13 ± 0,19	-0,1434	Débil	0,4414
Alcalinidad	111,84 ± 48,00	-0,1233	Débil	0,5086
Fosfato	1,26 ± 2,34	0,1672	Débil	0,3685
Nitrato	1,69 ± 1,13	0,2243	Débil	0,2249
Salinidad	30,50 ± 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, independientemente del estado de recolección de las muestras. Entre los signos observados se incluyeron hepatopáncreas de coloración pálida y músculo abdominal opaco, tal como lo describieron Morales-Covarrubias y Gómez-Gil (2014). Además, en las fincas analizadas se identificó la presencia de aves pescando camarones, lo cual es un indicador de mortalidad en esta especie (Nguyen et al., 2021). Estos mismos autores registraron 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 asociadas a AHPND en la India.

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 del Pacífico de Costa Rica, permitió obtener la identidad del patógeno, tal como ha sido reportado en otros lugares (Dong et al., 2017; Han et al., 2015; Lai et al., 2015). La pureza y calidad del ADN extraído de camarones y bacterias permitió amplificar el gen endógeno de camarón ( $\beta$ -actina) (Dhar et al., 2001) como control de integridad, lo que demuestra que no hubo inhibición del PCR debido a impurezas. Esto respalda la confiabilidad de los resultados positivos a la bacteria.

El análisis de secuencias por medio de BLASTn indica que el agente asociado a la mortalidad en estanques es *Vibrio parahaemolyticus*, causante de AHPND (Phiwaiya et al., 2017; Theethakaew et al., 2017). Las secuencias obtenidas en este estudio tienen una similitud del 100 % con secuencias provenientes de cepas de tipo asiático, lo que coincide con los resultados obtenidos por Peña-Navarro et al. (2020), quienes determinaron la presencia de AHPND en cinco fincas del golfo de Nicoya. Sin embargo, esto difiere de otros hallazgos en la región, que han indicado que las muestras coinciden con cepas de tipo mexicano (Kumar et al., 2021). Esto podría indicar que en la región ya se encuentran las dos variantes de las cepas bacterianas, lo que implica que Costa Rica muestra resultados distintos a los del resto de América (Nunan et al., 2014). Estudios previos, como los realizados por Han et al. (2015), han desarrollado métodos de PCR para caracterizar AHPND de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de cepas de tipo mexicano o tipo asiático, con base en la presencia de un transposón de tipo Tn3. Por lo tanto, este tipo de análisis debería aplicarse en búsqueda del origen del agente infeccioso.

Este estudio también determinó la ubicación de las fincas positivas a AHPND mediante el diagnóstico de los genes *pirA* y *pirB*. La presencia de AHPND es relevante a lo largo de la costa del Pacífico, incluyendo el golfo de Nicoya y la zona del Pacífico Central. Este estudio abarcó 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 %) tuvo mayor cantidad de casos positivos, tanto en tejido como en agua, en comparación con la Región Chorotega (93 %). 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 importancia comercial debido al cultivo de camarón, y los resultados son similares a los expuestos en otros países en los que se estudió la prevalencia de AHPND en diferentes regiones (Eshik et al., 2018; Nunan et al., 2014). 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 AHPND adquirió relevancia a partir de 2015. Su impacto negativo en la producción de camarón ha ocasionado serios problemas económicos en la industria, debido a la alta mortalidad de los camarones. Según estadísticas productivas del Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura, la producción de camarón empezó a reducirse a partir de dicho año, lo cual estaría vinculado a la presencia de enfermedades como AHPND (Ramírez Flores et al., 2023). En una encuesta realizada por los mismos autores a treinta productores de Costa Rica durante el 2021, se indicó que el 90 % de los casos presentaron AHPND, lo que concuerda con los resultados de este estudio. Durante los años 2017 y 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, lo cual afecta a los organismos y causa 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, y las bacterias son una de las principales causas (Chumpol et al., 2017). Esto, en combinación con otros factores como deficiencias nutricionales, estrés y condiciones de crecimiento inadecuadas, puede provocar alta mortalidad. Por lo tanto, resulta fundamental implementar una mejor gestión de la calidad del agua y buenas prácticas de manejo en estanques, lo cual se puede lograr mediante el monitoreo de los parámetros de la calidad del agua, para reducir la descomposición de residuos orgánicos vinculados a altas concentraciones de nitrógeno y fósforo, factores que promueven la proliferación de patógenos (Nimrat et al., 2012).

Las muestras de órganos que resultaron positivas a AHPND, pero negativas en el agua, se encontraron 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* y los parámetros físico-químicos del agua; solamente hubo una correlación débil significativa entre la presencia de la bacteria y la salinidad. Esto sugiere la necesidad de hacer estudios más extensos para confirmar una posible relación entre estos factores.

Niveles de oxígeno disuelto menores a 4 mg/L, acidificación del agua y fluctuaciones de la salinidad y la temperatura afectan la capacidad de los camarones para realizar sus funciones vitales, generan estrés y afectan al sistema de defensa. Esto dificulta que los camarones combatan los patógenos presentes en el estanque (Tendencia et al., 2010). En este contexto, el género *Vibrio* 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 estudio registró la presencia de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) en estanques muestreados en las principales zonas camaronícolas de Costa Rica, mediante bacteriología y PCR, con una prevalencia del 93,75 %. Los resultados confirman la presencia de la enfermedad tanto en camarones (*P. vannamei*) (hepatopáncreas y estómago) como en agua, en estanques de la mayoría de las fincas muestreadas.

Además, se encontró una correlación significativa entre el amonio, la salinidad, el oxígeno disuelto y el pH, y la presencia de *V. parahaemolyticus* en las muestras de agua analizadas. Por lo tanto, se recomienda llevar a cabo estudios amplios y periódicos en fincas camaronícolas 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 declaran no tener conflictos de intereses.

## Referencias

- Aguirre-Guzmán, G., Mejía, H., & Ascencio, F. (2004). A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquaculture Research*, 35(15), 1395–1404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01165.x>
- 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)
- 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.
- 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>
- 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), Article 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 campbellii* carrying the pir<sup>VP</sup> gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease. *Emerging Microbes & Infections*, 6, 1–3. <https://doi.org/10.1038/emfi.2016.131>
- Escobar, J. (2002). *La contaminación en los ríos y sus efectos en las áreas marinas y costeras*. Comisión Económica para América Latina y el Caribe.
- 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/ajbtbe-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>
- Han, J., Tang, K., & Lightner, D. V. (2015). 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>
- Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura. (s.f.). *Precios y volúmenes de productos pesqueros y acuícolas ofrecidos en mercado mayorista de CENADA*. Recuperado 2023 de <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>
- Kumar, B. K., Deekshit, V. K., Rai, P., Shekar, M., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2014). Presence of T3SS2 $\beta$  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>

- 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>
- Lightner, D. V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, *106*(1), 110–130. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.012>
- Morales-Covarrubias, M. S. (2004). *Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología*. Editorial Trillas.
- Morales-Covarrubias, M. S., García-Aguilar, N., Bolan-Mejía, M., & Zamora-García, O. G. (2019). Prevalence of the major diseases in *Penaeus vannamei* farmed of Sinaloa México. *Revista Científica*, *29*(3), 198–206. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/32298/33713>
- Morales-Covarrubias, M. S., & Gómez-Gil, B. (2014). *Enfermedades bacterianas*. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria.
- 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>
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2012). Potential *Bacillus* probiotics 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>
- 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>
- 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>
- Pantoja, C., & Lightner, D. V. (2014). *EMS/AHPND descripción de la enfermedad en Asia y América*. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria.
- Peña Navarro, N., & Chacón Guzmán, J. (2019). Aquaculture in Costa Rica. *World Aquaculture*, *50*(2), 23–28. <https://www.was.org/Magazine/Vol/50/2>
- Peña-Navarro, N., Castro-Vásquez, R., Vargas-Leitón, B., & Dolz, G. (2020). Molecular detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* shrimps in Costa Rica. *Aquaculture*, *523*, Article 735190. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735190>
- 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>
- Phiwsaiya, K., Charoensapsri, 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*  $\Delta$ pirA<sup>Vp</sup> pirB<sup>Vp+</sup> mutant kills shrimp but produces neither Pir<sup>Vp</sup> toxins nor

- acute hepatopancreatic necrosis disease lesions. *Applied Environmental Microbiology*, 83(16), Article e00680-1. <https://doi.org/10.1128/aem.00680-17>
- 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* [Computer software, Version 1.4.4]. 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.
- Shrimp News International. (2015). *Belize recovers from EMS*. <https://www.shrimpnews.com/FreeReportsFolder/NewsReportsFolder/MexicoAndBelizeElNinoAndEMS>
- 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>
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Nuangsaeng, B., Thitamadee, S., Flegel, T. W., & Sritunyalucksana, K. (2015) Characterization and PCR detection of binary, Pir-Like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in shrimp. *PLoS ONE*, 10(5), Article e0126987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126987>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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-Mejías, A., & Peña-Navarro, 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 *e* in shrimp from Chinese retail markets. *Food Control*, 46, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.042>