

Detección molecular de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas en muestras de langostinos de la región de tumbes

Rodolfo Zenaido Velazco Peña

rodolfo.velazco@sanipes.gob.pe

Laboratorio de Sanidad Acuícola del Callao –SANIPES
Lima, Perú

María Elena Rodrigo Rojas

mrodrigo@unfv.edu.pe

<https://orcid.org/0000-0002-1555-4036>

Laboratorio de Biotecnología.
Universidad Nacional Federico Villarreal
Lima, Perú

Luis Alberto Salcedo Mejía

587-spp@sanipes.gob.pe

Laboratorio de Sanidad Acuícola de Tumbes – SANIPES
Tumbes, Perú

Ítalo Daniel Lazábara Huamán

2015231287@unfv.edu.pe

Laboratorio de Biotecnología.
Universidad Nacional Federico Villarreal
Lima, Perú

Leslie Giovana Delgado Olivares

2015003409@unfv.edu.pe

Laboratorio de Biotecnología.
Universidad Nacional Federico Villarreal
Lima, Perú

Ramsés Salas-Asencios

rsalas@unfv.edu.pe

<https://orcid.org/0000-0002-4075-1736>

Laboratorio de Biotecnología.
Universidad Nacional Federico Villarreal
Grupo de Investigación Bienestar y Salud Global
Lima, Perú

RESUMEN

El cultivo de langostinos es una actividad productiva muy importante en el norte del Perú y que puede verse afectada por diversos tipos de enfermedades, dentro de las cuales se tiene la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND), producida por la toxina PirA-B presente en bacterias del género *Vibrio* y que puede generar hasta la

pérdida total de la producción en otros países. En el presente artículo, se muestra la metodología de detección de la AHPND, utilizando un sistema de Nested-PCR para amplificar los genes para la toxina PirA-B tanto a partir de muestras de hepatopáncreas como de cepas de *Vibrio* aisladas a partir de animales enfermos. Los resultados muestran la presencia de los genes para la toxina PirA-B en un 45.16% de las cepas bacterianas aisladas, discutiendo las posibles causas que detienen una mayor propagación.

Palabras clave: *Vibrio*; langostinos; AHPND; Nested-PCR.

Molecular detection of acute hepatopancreas necrotic disease in shrimp samples of tumbes

ABSTRACT

Shrimp farming is a very important productive activity in the north of Peru, affected by several diseases, such as acute hepatopancreas necrotic disease (AHPND), due to the PirA-B toxin from bacterias of the *Vibrio* genus and it could generate a total loss of the production in several countries. In this paper, the method to detect AHPND is showed, using a Nested-PCR system in order to amplify the PirA-B toxin genes both from hepatopancreas samples or *Vibrio* strains isolated from ill shrimps. Results indicate a presence of PirA-B toxin genes in 45.16% of the isolated strains, allowing a discussion about the possible causes about why the disease is not spread.

Key words: *vibrio*; shrimps; AHPND; nested-PCR.

Artículo recibido: 30 noviembre. 2021

Aceptado para publicación: 29 diciembre 2021

Correspondencia: rsalas@unfv.edu.pe

Conflictos de Interés: Ninguna que declarar

1.- INTRODUCCIÓN

El cultivo de langostinos es una actividad económica muy importante en el mundo y especialmente en Latinoamérica, región que contribuye aproximadamente al 15% de la producción mundial (Morales-Covarrubias et al., 2019). En el Perú, se han registrado 8 especies de langostinos peneidos con potencial productivo, 5 del género *Penaeus* y una especie para los géneros *Protrachypene*, *Rimapenaeus* y *Xiphopenaeus*, respectivamente (Santamaría et al., 2018). Esta actividad se puede ver afectada por diversos factores, como por ejemplo el fenómeno de El Niño (Valverde-Moya y Varela-Mejías, 2018), temporada en donde el área de influencia en nuestro país se extiende más al sur de los manglares y esteros de Tumbes (Pretell-Monzón et al., 2019), o infecciones, principalmente de origen viral o bacteriano, que pueden afectar a los diferentes estadios de desarrollo del langostino (Tabla 1).

Tabla 1.

Distintos tipos de infecciones bacterianas según los estadios de desarrollo del langostino (género Penaeus). Se adjuntan las referencias de las enfermedades registradas en el Perú

Larva	Post-larva	Adultos
Vibriosis luminiscente	“Black splinter”	Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética infecciosa (VNHHI, Pretell-Monzón et al., 2019)
Bolitas blancas	Manchas marrones	Necrosis bacteriana del hepatopáncreas (NHPB, Alfaro et al., 2010)
Síndrome Zoea II	Vibriosis sistémica	Síndrome de la mancha blanca (WSSV, Alfaro et al., 2010)
Epibiontes bacterianos	Vibriosis luminiscente	“Black splinter”
Baculovirus penaei (BP, Alfaro et al., 2010)	Síndrome gaviota	Vibriosis sistémica
	Epibiontes bacterianos	<i>Hepatobacter penaei</i> (Pretell-Monzón et al., 2019)
	Hepatopancreatitis necrotizante	
	Baculovirus penaei (BP, Alfaro et al., 2010)	

Dentro de las infecciones bacterianas, sobresalen aquellas producidas o relacionadas a la presencia del género *Vibrio*, microorganismos que viven principalmente en ambientes

marinos pero que contienen especies patógenas para los langostinos e incluso para el ser humano (Tabla 2).

Tabla 2.

Especies del género Vibrio asociadas a las principales patologías en langostinos.

Patología	Especie	huésped	Referencia
Vibriosis luminescente	<i>V. campbellii</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. splendidus</i>	<i>P. vannamei</i> , <i>P. monodon</i> , <i>P. indicus</i>	Zhang et al., 2020
Enfermedad del caparazón	<i>V. penaeicida</i>	<i>P. stylirostris</i>	Rubio et al., 2012
Vibriosis sistémica	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>P. vannamei</i> , <i>P. monodon</i>	De Souza & Wan, 2021
“Black splinter”	<i>V. alginolyticus</i>	<i>P. monodon</i>	Selvin y Lipton, 2003
Síndrome gaviota	<i>V. campbellii</i>	<i>P. vannamei</i>	Morales-Covarrubias et al., 2019

Una de las enfermedades generadas por este género microbiano y de gran importancia debido a su impacto en la industria langostinera, es el síndrome de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND por sus siglas en inglés), que apareció en el sur de China el año 2009, propagándose rápidamente hacia Vietnam el 2010, Malasia el 2011 y finalmente Tailandia el año 2012. Esta enfermedad infecciosa llegó a generar en estos países pérdidas de cultivos tempranos de langostinos de las especies *Penaeus monodon* y *Penaeus vannamei* (Varela-Mejías et al., 2017). En China, por ejemplo, en el año 2011 la AHPND produjo una pérdida del 80% de la producción en las 4 provincias dedicadas al cultivo de langostinos. En Malasia, se ha calculado que las pérdidas económicas en ese año fueron de 100 millones de dólares americanos (de la Peña et al., 2015). La AHPND fue reportada por primera vez en América el año 2013 en México, afectando 13000 hectáreas de espejo de agua y generando una disminución de la productividad de hasta un 65% (Varela-Mejías y Peña-Navarro, 2014). Desde esa fecha, se ha reportado la presencia de esta enfermedad en Costa Rica (De Guía et al., 2020), Ecuador (Saavedra-Olivos et al., 2018) y Perú (Ramirez et al., 2020).

Lightner et al. (2012) observaron que la AHPND generaba una disfunción progresiva del hepatopáncreas por degeneración de las células epiteliales de los túbulos, iniciándose en la parte proximal hasta progresar a la parte distal. El primer signo es la pérdida de reservas de grasa, luego se produce un gran desprendimiento de las células a la luz de los túbulos

y una respuesta inflamatoria debido a infiltración por hemocitos. Estos autores interpretaron correctamente que los hallazgos descritos podrían asociarse a una patología de etiología tóxica. Casi al mismo tiempo, Zhang et al. (2012) aislaron en agar TCBS bacterias del género *Vibrio* provenientes del hepatopáncreas de especímenes enfermos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, identificando a la especie *Vibrio parahaemolyticus*. Al año siguiente Tran et al. (2013) aislaron el potencial agente infeccioso, identificando no sólo cepas de esta especie sino también de *Vibrio harveyi*. Han et al. (2015) identificaron un plásmido de 69 kb en cepas de *V. parahaemolyticus* que causaban AHPND. El secuenciamiento del plásmido mostró la presencia de 92 marcos de lectura (ORF por sus siglas en inglés), que codificaban además de proteínas de movilidad, enzimas de replicación, transposasas y algunas proteínas de virulencia, genes para una toxina binaria similar a la que produce la bacteria *Photorhabdus*, un comensal de nemátodos entomopatógenos, por lo que la toxina fue llamada Pir y los dos genes asociados, pirA y pirB.

Los genes pirA y pirB codifican una toxina binaria Pir formada por las proteínas correspondientes PirA^{vp} y PirB^{vp}. Esta toxina fue descrita primeramente en bacterias de la especie *Photorhabdus luminescens*, que viven en forma simbiótica con nemátodos entomopatógenos de la familia Heterorhabditidae (Han et al., 2015; Lee et al., 2015). La proteína relacionada con PirA tiene 111 aminoácidos, mientras que la proteína PirB tiene 438 aminoácidos. La región media de PirB de *Vibrio parahaemolyticus* es altamente similar a PirB de *Photorhabdus luminescens*. La bioquímica de la toxicidad de la proteína binaria se puede resumir en tres pasos: unión al receptor, oligomerización y formación de poro en la membrana celular. Estos tres procesos bioquímicos inducen la muerte celular. Saavedra-Olivos et al. (2018) detectaron una proteína asociada a la enfermedad AHPND en cultivos semi-intensivos de camarón en Ecuador. Dicha proteína presentó un alto porcentaje de similitud con la proteína pirB, lo que permite concluir que el diagnóstico confirmativo de la enfermedad AHPND está relacionado con la detección de los fragmentos genéticos para las proteínas PirA y PirB.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la presencia del síndrome de la necrosis aguda del hepatopáncreas mediante la detección de los genes asociados a la toxina PirA-B.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras y aislamiento de ADN

Mediante el uso de una cartilla sintomatológica (Figura 4), se analizaron muestras de estadios juveniles de camarones provenientes de pozos de mantenimiento de diferentes centros de cultivo del departamento de Tumbes, a fin de identificar posibles ejemplares afectados por necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND).

Figura 1.

Cartilla sintomatológica para identificación de langostinos afectados por el síndrome de necrosis aguda del hepatopáncreas

REGISTRO DE CARACTERÍSTICAS DE LOS ESPECIMENES	
Centro Acuicola:	
Fecha:	Lugar:
Estadio:	Talla: Peso:
CARACTERÍSTICAS	OBSERVACIONES
1. PRESENCIA DE ACTIVIDAD	Ausencia de actividad o nado errático
2. COLOR DEL ESPECIMEN	Blanquecino
3. TEXTURA	Flacidez
4. INJURIAS EXTERNAS	No presenta
5. MALFORMACIONES	No presenta
6. FALTA DE EXTREMIDADES	No presenta
7. ASPECTO DEL HEPATOPANCREAS	No se visualiza
8. COLOR DEL HEPATOPANCREAS	Blanco
9. PRESENCIA DE HECES	Ausencia
OBSERVACIONES GENERALES:	
.....	
.....	
.....	
.....	

Luego de una desinfección externa con alcohol al 75% antes de iniciar la disección in situ de los animales potencialmente infectados a fin de extraer de ellos el hepatopáncreas. Estas muestras fueron procesados de dos maneras. Un grupo de muestras fue colocado en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL que contenían solución salina al 2%. Luego de un tiempo de macerado, se sembraron 20 mL de cada muestra en placas que contenían agar tiosulfato citrato bilis sucrosa (TCBS). Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Se usaron las colonias de color verde (no fermentadoras de sacarosa) para proceder

al aislamiento de ADN. Por otro lado, otras muestras de hepatopáncreas fueron colocadas en una solución de alcohol al 50% como preservante. En el laboratorio, estas muestras fueron centrifugadas, eliminándose el sobrenadante y dejando evaporar el alcohol residual.

La extracción del ADN en ambos tipos de muestra se realizó siguiendo estrictamente los pasos del protocolo del sistema PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen). Se tomaron muestras de 25 mg de hepatopáncreas o una suspensión de colonias verdes en el agar TCBS, agregando luego el buffer de digestión del kit, se incubaron estas muestras toda la noche, homogenizando periódicamente para facilitar la digestión. Se centrifugaron las muestras al día siguiente y se agregó el buffer de lisis y buffer de unión, para luego homogenizar utilizando un vórtex. Se agregó etanol absoluto, se homogenizó por inversión y el lisado fue transferido a una columna de sílica con un tubo colector. Se centrifugó la columna por 1 minuto y se retiró el tubo colector, colocando uno nuevo. Se repitió 3 veces para luego agregar el buffer de elución. Se incubó a temperatura ambiente y se centrifugó. El ADN fue almacenado a -50° C hasta su utilización.

Amplificación de los genes *pirA* y *pirB*

A partir de las muestras de ADN purificadas, se procedió a realizar la amplificación de los genes para la toxina *pirA-B* mediante la técnica de Nested-PCR (Dangtip et al., 2015), empleando los cebadores específicos mostrados en la Tabla 3. El protocolo de amplificación para la técnica del Nested-PCR, siguió la preparación y el procedimiento mostrados en la Tabla 4 y, una vez terminada la amplificación, los productos fueron revisados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, a un voltaje de 100 voltios por 60 minutos.

Tabla 3.

Características de los cebadores específicos diseñados para la amplificación de los genes para la toxina *pirA-B* mediante la técnica de Nested-PCR.

Oligos	Secuencia (5' a 3')	Amplicón (pb)
AP4-F1	ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC	1269
AP4-R1	ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA	
AP4-F2	TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG	230
AP4-R2	GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC	

Tabla 4.

Preparación de la mezcla de reacción y el programa de amplificación para el Desarrollo del Nested-PCR para amplificación de los genes de la toxina pirA-B.

Primera reacción			
Componentes	Vol. (uL)	Concentración	Programa de PCR
10x PCR mix (Invitrogen)	2,5	1x	Desnaturalización: 94°C, 2 min Desnaturalización: 94°C, 30 seg. Hibridación: 55 °C, 30 seg. Polimerización: 72°C, 90 seg., 30 ciclos Polimerización final: 72°C, 2 min. Conservación: 4°C
50 mM MgCl ₂	1,5	3 mM	
10 mM dNTPs	0,5	0,2 mM	
10 µM AP4-F1 ¹	0,5	0,2 µM	
10 µM AP4-R1 ²	0,5	0,2 µM	
5U/µl Taq DNA polymerase	0,3	1,5 U	
ADN Muestra	2	100 ng/µl	
Agua	17,2		
Total	25		
Segunda reacción			
Componentes	Vol. (µL)	Concentración	Programa de PCR
10x PCR mix (Invitrogen)	2,5	1x	Desnaturalización inicial: 94°C, 2 min Desnaturalización: 94°C, 20 seg. Hibridación: 55 °C, 20 seg. Polimerización: 72°C, 20 seg., 25 ciclos Polimerización final: 72°C, 2 min
50 mM MgCl ₂	1,5	3 mM	
10 mM dNTPs	0,5	0,2 mM	
10 µM AP4-F2	0,375	0,15 µM	
10 µM AP4-R1	0,375	0,15 µM	
5U/µl Taq DNA polymerase	0,3	1,5 U	
ADN de la Muestra	2		
Agua	17,45		
Total	25		

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de cartillas sintomatológicas permitió identificar ejemplares posiblemente afectados por AHPND en diferentes zonas langostineras de Tumbes, considerando principalmente el color y la apariencia necrótica del hepatopáncreas (Tabla 5).

Tabla 5.

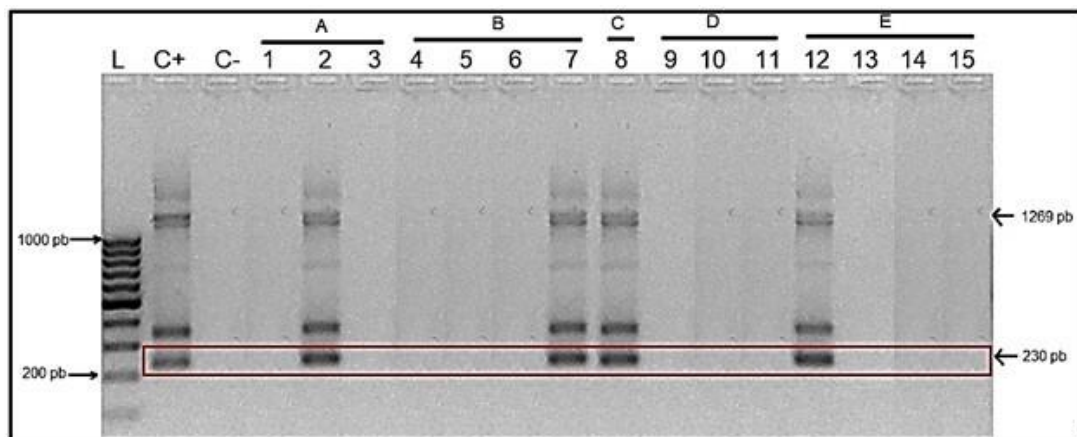
Ejemplo de Tabla resumen de evaluación sintomatológica de langostinos con AHPND.

N°	Observaciones					Estado del hepatopancreas
	Movimientos	Coloración	Malformaciones	Estómago	Hepatopáncreas	
1	No	Pálida	No	Difuso	Pálido	Necrótico
2	No	Pálida	No	Difuso	Pálido	Necrótico
3	No	Pálida	No	Difuso	Pálido	Necrótico
4	Si	Pálida	No	Difuso	Pálido	Necrótico
5	No	Pálida	No	Difuso	Pálido	Necrótico
6	Si	Rojizo	No	Difuso	Pálido	Necrótico
7	No	Pálida	No	Difuso	Pálido	Necrótico
8	No	Pálida	No	Difuso	Pálido	Necrótico
9	No	Pálida	No	Difuso	Pálido	Necrótico
10	No	Pálida	No	Difuso	Pálido	Necrótico
11	Si	Rojizo	No	Difuso	Pálido	Necrótico
12	No	Pálida	No	Difuso	Pálido	Necrótico
13	No	Pálida	No	Difuso	Pálido	Necrótico

La técnica de amplificación por Nested PCR utilizando cebadores para los genes de las proteínas pirA y pirB, permite visualizar en la electroforesis un fragmento de 230 pb, que contiene 209 pb del gen para la proteína pirA y un segmento de 21 pb que representa a la secuencia espaciadora con el gen para la proteína pirB y uno de 1269 pb, que contiene la secuencia completa del gen para la proteína pirA (921 pb) y parte del gen para la proteína pirB (que tiene un total de 1317 pb) (Figura 2).

Muchas veces, la banda de 1269 pb puede estar rodeada de bandas inespecíficas, por lo que, en la práctica, se considera muestra positiva si se observa el amplicón de 230 pb, puesto que se detecta un segmento de ADN intermedio entre los dos genes (Dangtip et al., 2015).

Figura 2. Detección de los genes para la toxina pirA-B mediante Nested PCR en lisados de hepatopáncreas de langostino provenientes de 5 granjas acuícolas (A-E).



La Tabla 6 muestra los resultados del análisis de cepas de *Vibrio sp.* aislados en diferentes zona de cultivo de langostino en el departamento de Tumbes, respecto a la presencia de los genes para la toxina PirA-B. Se puede mostrar que, en total, se han detectado 14 (45.16%) cepas positivas para esta toxina, mientras que 17 (54.84%) cepas resultaron negativas. Esta frecuencia de cepas positivas es menor a la reportada en Asia o en México, donde se reportaron masivas pérdidas de producción (en algunos casos de hasta el 100%) implicando una alta presencia de cepas toxigénicas (Varela-Mejías et al., 2017; Varela-Mejías y Peña Navarro, 2014). A diferencia de este cuadro, en Perú y Ecuador, no se ha reportado muerte masiva de langostinos, aun cuando se han identificado cepas generadoras de la enfermedad (Aranguren et al., 2020). Es importante realizar un seguimiento periódico de la incidencia de la AHPND en el Perú, a fin de poder explicar esta limitación de la presencia de cepas de *Vibrio* positivas a la toxina PirA-B, por ejemplo, considerando la posibilidad de la expresión de una patología crónica más que aguda (Aranguren et al., 2020).

Tabla 6.

Número de cepas de Vibrio sp. en función de la presencia de genes para la toxina PirA-B aisladas en diferentes zonas de cultivo de langostino en el Departamento de Tumbes.

Esteros Zona Norte	Positivos	Negativos
Algarrobos	4	1
El Bendito	3	3
Esteros zona Centro		
El Alcalde	1	4
La Ramada	2	3
Esteros Hondo	3	2
Esteros Zona sur		
Corrales	1	4
Total	14	17

4. CONSIDERACIONES FINALES

Se debe evaluar también la potencial posibilidad de transmisión horizontal del plásmido que alberga los genes para esta toxina. Lee et al. (2015) demostraron la posibilidad que este plásmido de 69-70 Kb puede transmitirse de una bacteria del género *Vibrio* productora de AHPND a otra que no genera esta enfermedad y volverla patogénica, por lo que queda

latente el riesgo que esto pueda pasar en nuestro medio, favoreciendo una mayor prevalencia de cepas toxigénicas.

5. LISTA DE REFERENCIAS

- Alfaro, R., Guevara y M., Gonzales, I. (2010). Prevalencia y distribución de los principales agentes etiológicos que afectan los langostinos silvestres en Tumbes, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 17(3), 359 – 364. <https://doi.org/10.15381/rpb.v17i3.11>.
- Aranguren, L.F., Mai, H.N., Noble, B. y Dhar, A.K. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease (VP AHPND), a chronic disease in shrimp *Penaeus vannamei* population raised in Latin America, *Journal of Invertebrate Pathology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107424>.
- Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Mavichak, R., Proespraiwong, P. y Flegel, T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, 2, 158–162. DOI: [10.1016/j.aqrep.2015.10.002](https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.10.002).
- De Guia, A.C.M., Samson, J.S. y Uy, M.R.D. (2020). *In silico* analysis of *PirA*- and *PirB*-like toxin genes of *Vibrio* spp., present in Asia and Costa Rica. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 7(2), 320-323. <http://doi.org/10.5455/javar.2020.g424>.
- de la Peña, L.D., Cabillon, N.A.R., Catedral, D.D., Amar, E.C., Usero, R.C., Monotilla, W.D., Calpe A.T., Fernandez, D.D.G. y Saloma, C.P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Diseases of Aquatic Organisms*, 116, 251–254. doi: [10.3354/dao02919](https://doi.org/10.3354/dao02919).
- De Souza, C. y Wan, A.H.L. (2021). *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 181, 107527. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107527>.
- Han, J.E., Tang K.F.J., Tran, L.H. y Lightner, D.V. (2015). *Photorhabdus* insect-related (*Pir*) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 113, 33–40. doi:[10.3354/dao02830](https://doi.org/10.3354/dao02830).

- Lee, C.T, Chen, I.T., Yang Y.T., Ko, T.P., Huang, Y.T., Huang, J.Y., Huang, M.F., Lin, S.J., Chen, C.Y., Linh, S.S., Lightner, D.V., Wang, H.C., Wang, A.H.J., Wang, H.C., Horb, L.I. y Lo, C.F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *PNAS*, 112(34), 10798–10803. DOI:[10.1073/pnas.1503129112](https://doi.org/10.1073/pnas.1503129112)
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Noble, B.L., y Loc Tran. (2012). Early Mortality Syndrome Affects Shrimp In Asia. *Global aquaculture alliance, January/February 2012*. <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/early-mortality-syndrome-affects-shrimp-in-asia/>.
- Morales-Covarrubias, M., Cuéllar-Anjel, J., Mejias, A. y Elizondo-Ovares, C. (2019). Shrimp bacterial infections in Latin America: a review. *Asian Fisheries Science*, 31S, 76 - 87. DOI:[10.33997/j.afs.2018.31.S1.005](https://doi.org/10.33997/j.afs.2018.31.S1.005).
- Pretell-Monzón, K., Saavedra-Olivos, K., Calderón-Romero, A., Quevedo Alvarado, V., Alemán de Lama, D., Boada Mata, B., y Gómez-Sánchez, M. (2019). Vigilancia sanitaria de peneidos silvestres en los principales canales de marea de Tumbes, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(4), 1724 – 1733. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V30I4.17275>
- Ramirez, B., Guevara, M., Montoya, V. y Serna, M. (2020). Evaluación de la patogenicidad de cepas de *Vibrio* sp. que contienen los genes *pirA* Y *pirB* aislados de *Penaeus vannamei* de cultivo. *Bol Inst Mar Perú*, 35(2), 242-256.
- Rubio, M., Silveira, R., Pérez, L. y González, N. (2012). Enfermedad de la mancha del caparazón en el camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei*. *REDVET, Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(7), julio. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/636/63624404006.pdf>.
- Saavedra-Olivos, K.Y., Peralta-Ortiz, T., Ordinola-Zapata, A., Sandoval-Ramayoni, J.E., Vieyra-Peña, E.G., Zapata-Cruz, M.A., Hidalgo-Mogollón, A., Morán-Ávila, B., Mendoza-Neyra O.A., Mendoza-Dioses M.E. y Campoverde-Peña, S.Y. (2018). Detección de una proteína asociada a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en *Litopenaeus vannamei* bajo cultivo semi-intensivo en Ecuador. *Rev. investig. vet. Perú*, 29(1), 328-338. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14194>

- Santamaría J., Carbajal-Enzian P., Clemente S, Alemán S., Ordinola E. 2018. Guía ilustrada para reconocimiento de langostinos y otros crustáceos con valor comercial en el Perú. Lima, Instituto del Mar del Perú (IMARPE). 19 pp.
- Selvin, J. y Lipton, A.P. (2003). *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57, 147 – 150. doi: 10.3354/dao057147.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohny, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K. y Lightner, D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 105, 45–55. doi: 10.3354/dao02621
- Varela-Mejías, A. y Peña-Navarro, N. (2014). Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS) en camarones cultivados: Una revisión. *Repertorio Científico*, 17(1), 25-30.
- Varela-Mejías, A., Peña-Navarro, N. y Aranguren-Caro, L.F. (2017). Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 735-745. doi:10.15517/ma.v28i3.27788.
- Valverde-Moya, J. A., y Varela-Mejías, A. (2018). Cultivo comercial de camarones *Litopenaeus vannamei* en Costa Rica durante El Niño 2015: incidencia de enfermedades. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(1), 188 – 204. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14187>
- Zhang, B., Liu, F., Bian, H., Liu, J., Pan, L. y Huang, J. (2012). Isolation, identification, and pathogenicity analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 33(2), 56 – 62. DOI:[10.3969/j.issn.1000-7075.2012.02.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-7075.2012.02.009).
- Zhang, X.H., He, X. y Austin, B. (2020). *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine Life Science & Technology*, 2, 231 – 245. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00037-z>