

# Nodavirus de la mortalidad encubierta (CMNV) en camarones marinos de cultivo

AGR. IND. ALEXANDER VARELA MEJÍAS

Laboratorio de Patologías y Parasitología de Crustáceos. Egresado Agroindustria, UNED. Escuela de Ciencias Exactas y Naturales. Est. Maestría en Enfermedades Tropicales. Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Universidad Nacional, Costa Rica; alexander.varela@gmail.com

Recibido 3 febrero 2016

Aceptado 8 marzo 2016

## RESUMEN

La introducción de nuevas patologías a los sistemas productivos es un riesgo constante generado por la movilización de animales, sus productos o sub productos entre países y regiones. Se presenta a continuación la descripción clínico-lesional de un nuevo tipo de virus, llamado el nodavirus de la mortalidad encubierta, el cual ha sido reportado en camarones *Litopenaeus vannamei*. Así como las técnicas de observación usadas. Esto ante el riesgo de ingreso del agente a la región de Centroamérica, tal como ha ocurrido en el pasado con otras enfermedades.

**Palabras clave:** clínica, lesión, hallazgos, CMNV, patógenos.

## ABSTRACT

The introduction of new diseases to the production systems is a constant risk generated by the mobilization of animals, their products or sub products between countries and regions. Below the clinical-lesional description of a new viral disease, called Covert mortality nodavirus, reported in shrimp *Litopenaeus vannamei*, of culture. As well as its observation techniques used. This faced the risk of entry of this pathogen to the region from Central America, such as it has happened on past whit others pathogens.

**Key words:** Clinical, lesions, observations, CMNV; pathogens.

El aporte realizado por los productos de la acuicultura a la alimentación mundial ha presentado un importante crecimiento, debido principalmente a la tecnificación y la intensificación de los sistemas productivos, esta tendencia es

aplicable también a la camaronicultura. A pesar de ello, la última década se ha caracterizado por altas incidencias de enfermedades de origen infeccioso impactando a los organismos de cultivo.

El abordaje para la estudio de este fenómeno implica comprender que los ecosistemas acuáticos son sumamente complejos y sensibles a los cambios abruptos de sus condiciones. Los brotes de las enfermedades que se presentan en la acuicultura, no suelen darse como consecuencia de un evento único y generalmente son el resultado de una serie de factores entrelazados, en los cuales interactúan los hospedadores, el ambiente y los patógenos (Bondad-Reantaso *et al.* 2001), adicionalmente, no es extraño que se presentan coinfecciones por patógenos múltiples en forma simultánea o secuencial.

Estos eventos, en muchas ocasiones son provocados por las fluctuaciones de los parámetros físico-químicos de las aguas de cultivo, incrementando las cargas de estrés para los animales cultivados. Entre ellos destacan la temperatura, salinidad, oxígeno y pH (Morales-Covarrubias *et al.*, 2015; Varela y Peña, 2015).

Durante los últimos años los camaronicultores de Centro América han experimentado una mayor incidencia y prevalencia de enfermedades en sus cultivos, probablemente detonadas o potenciadas por las condiciones atípicas de la mayoría de las granjas, las cuales a su vez, han sido generadas por temperaturas y salinidades en las aguas de cultivo superiores a las normales (Morales-Covarrubias *et al.*, 2015; Varela y Peña, 2015).

Dicho aumento de brotes infecciosos se ha visto acompañado de mayores índices de morbilidad, mortalidad y letalidad de los cultivos, así como un menor crecimiento de los animales, gastos de producción adicionales y disminución de las utilidades generadas (Registros de fincas, datos no mostrados).

Esta situación no es exclusiva de nuestra región, ya que un incremento significativo de incidencia de infecciones, principalmente bacteriales ha sido reportado también por otros países del área, tal como lo indican Morales-Covarrubias y colaboradores (2015); México ha sido afectado por infecciones bacteriales en hepatopáncreas desde el año 2013, generando disminuciones muy severas en las producciones. Estas han sido atribuidas a la necrosis aguda del hepatopáncreas, AHPND, por sus siglas en inglés (Han<sup>1</sup> *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014, Pantoja y Lightner, 2013, Thitamadee *et al.* 2015; Varela y Peña, 2014).

Otras regiones del mundo de gran importancia productiva como Asia, han presentado también mortalidades y disminuciones severas en las producciones, así como crecimientos reducidos, cuya causa se debe a la participación de múltiples patógenos, entre los que se incluyen especies bacteriales como algunas cepas de *Vibrio parahaemolyticus* y más recientemente el *V. harveyi* causantes de la necrosis aguda del hepatopáncreas; virus como el de la mortalidad encubierta y el virus del síndrome de las manchas blancas; y parásitos como el microsporidio del hepatopáncreas *Enterocytosoon hepatopenaei* (Flegel, 2015; Huang, 2012; NACA, 2012; Tang *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

Uno de los principales riesgos de estas enfermedades, radica en que posterior a los brotes iniciales, con frecuencia son detectadas nuevos brotes en otras zonas o países, siendo consideradas por tanto, como enfermedades transfronterizas (Thitamadee *et al.*, 2015).

Por ejemplo, Asia ha sido afectada por múltiples patologías de gran impacto, las cuales han sido luego detectadas en otras regiones, como el virus del síndrome de las manchas blancas, que fue reportado en 1992, fue posteriormente detectado en los Estados Unidos de América en el año

1995 (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996; Lightner y Pantoja, 2001; Varela y Peña, 2013); el virus de la cabeza amarilla detectado en Asia en 1991, fue detectado en América en el 2006 sin causar mayor impacto en producciones (de la Rosa-Vélez, 2006); el AHPND que fue inicialmente reportado en Asia en el año 2009, fue posteriormente detectado en Latinoamérica en el año 2013 (Han<sup>2</sup> *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014, Pantoja y Lightner, 2013; Varela y Peña, 2014).

Del mismo modo, el tránsito de patógenos en sentido inverso se han presentado con enfermedades originarias de América, como el virus de la mionecrosis infecciosa y el virus del síndrome de Taura, que han sido reportadas en algunas regiones del continente asiático (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Chang *et al.* 2004; Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983; Saksmerprome *et al.*, 2011; Senapin *et al.*, 2011; Thitamadee *et al.* 2015).

Basado en estos antecedentes, es altamente probable que continúe la transfronterización de patógenos, a pesar de los controles zoonosanitarios existentes y los sistemas de bioseguridad diseñados e implementados.

Ante ello y con la finalidad de disponer de información reciente sobre las diferentes patologías exóticas que puedan, eventualmente, afectar a nuestra región, se describe a continuación una de ellas, la cual se ha observado en coinfecciones con al AHPND en Asia: El nodavirus de la mortalidad encubierta, o CMNV por sus siglas en inglés.

### **Nodavirus de la mortalidad encubierta (CMNV)**

Este virus también ha sido llamado “*Virus de la Mortalidad del Fondo de los Estanques*”, ya que las mortalidades que provoca pueden pasar desapercibidas y en muchas ocasiones son detectadas hasta la realización de la cosecha final.

Reportada en cultivos del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* en China, (Zhang *et al.*, 2014) y Tailandia (Thitamadee *et al.* 2015), su signología clínica es inespecífica y comparte similitudes con otros patógenos, la

aparición del músculo recuerda a la reportada para el virus de la mionecrosis infecciosa y el nodavirus de *Litopenaeus vannamei* (Cuellar-Anjel, 2015; Tang *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2007); atrofia y palidez de hepatopáncreas, estómago e intestino vacíos, cutícula suave y lento crecimiento, son similares a los causados por el AHPND (Tran *et al.*, 2013; Pantoja y Lightner, 2013; Varela y Peña, 2016), o hepatopancreatitis necrotizante (Morales-Covarrubias *et al.*, 2006; Vincent y Lotz, 2005).

Los camarones moribundos se hunden y acumulan en el fondo de los estanques. Es posible detectar animales moribundos y/o muertos diariamente en los estanques afectados. Generalmente, la mortalidad inicia posterior al primer mes de cultivo y aumenta a los 60 u 80 días, la mortalidad acumulada puede llegar al 80% de la población afectada (Thitamadee *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014).

### **Etiología del CMNV**

CMNV ha sido clasificado como miembro del género Alphanodavirus, su genoma es ssRNA positivo. Sus viriones no poseen envoltura, esféricos y presentan un diámetro aproximado de 25nm. Sus primeros reportes datan del año 2002 en China (Huang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014).

Zhang y colaboradores (2015), mediante tamizajes realizados sobre otras especies de interés económico en Asia, como *Fenneropenaeus chinensis* y *Marsupenaeus japonicus*, han generado resultados positivos mediante histopatología y PCR, por lo que estos autores consideran al CMNV como amenaza potencial capaz de originar infecciones tanto en camarones cultivados como en poblaciones silvestres.

### **Citopatología del CMNV**

Muestras histológicas procesadas según las técnicas descritas por Bell y Lightner (1988) y Lightner (1996), revelan atrofia de los túbulos hepatopancreáticos, presencia de cariomegalia e inclusiones basofílicas dentro de las células epiteliales. Estas inclusiones intracitoplasmáticas son pequeñas y eosinofílicas en estadíos

tempranos de desarrollo, para luego ser basofílicas y de mayor tamaño. En ocasiones es posible observar las inclusiones presentes en células rodeadas de tejidos aparentemente sanos (Zhang *et al.*, 2014).

Estos autores reportan también la formación de esferoides en el órgano linfoide, afectando la estructura y disposición normal de las arteriolas. Esta lesión ya ha sido citada para otros virus, entre ellos el virus de la mionecrosis infecciosa (Pantoja y Lightner, 2014), el virus del síndrome de Taura (Hasson *et al.*, 1999) el virus de la cabeza amarilla (Duangsuwan *et al.*, 2008), el virus de la vacuolización del órgano linfoide (Bonami *et al.*, 1992) y el parvovirus linfoidal (Owens *et al.*, 1991).

El músculo esquelético de los animales infectados por CMNV, presenta una severa ruptura de las fibras y mionecrosis licuefactiva y coagulativa multifocal, la cual puede estar acompañada por una fuerte infiltración hemocítica y picnosis (Huang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Similar a las observadas para otros virus presentes en América, como el virus de la mionecrosis infecciosa, el nodavirus de *Litopenaeus vannamei* (Cuellar-Anjel, 2015; Pantoja y Lightner, 2014; Tang *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015); o el nodavirus del *Macrobrachium rosenbergii* (Zhang *et al.*, 2015).

En estudios realizados mediante hibridación *in situ* con sondas específicas usadas en animales diagnosticados para CMNV, se han observado resultados positivos en los núcleos de células epiteliales presentes en túbulos hepatopancreáticos, los cuales se encuentran aparentemente normales (Flegel, 2015; Thitamadee *et al.*, 2015), por lo que no se descarta que este virus deba actuar en sinergia con otras patologías para producir daño en los animales infectados en los cultivos.

### **Observaciones de cuadros clínico-lesionales en Centroamérica**

Durante los últimos años, en granjas de la región se han observado una signología clínica compatible a la reportada para el virus CMNV,

la cual, como se indicó, no es patognomónica de esta enfermedad, ya que se comparte con otras enfermedades presentes.

Los animales afectados presentan cuadros clínicos inespecíficos que incluyen disminución de los pigmentos en hepatopáncreas, los cuales lucen notoriamente pálidos y atrofiados, se observan intestinos vacíos o con contenido entrecortado, letargia, cutículas ásperas o suaves, opacidad muscular, se observan casos de pérdida del tono y volumen muscular. Es posible detectar animales muertos en las bandejas de alimentación y orillas de los estanques, así como la presencia de aves cazando animales letárgicos o moribundos.

Paralelamente, como parte de los controles sanitarios de rutina llevados sobre los cultivos, es normal realizar análisis histopatológicos en los animales, especialmente en los casos en los cuales se presentan sospechas de morbilidad y mortalidad. En dichos análisis es posible encontrar lesiones de patologías endémicas, permitiendo simultáneamente detectar patologías exóticas que podrían estar presentes en los cultivos, tanto en infecciones clínicas como sub clínicas.

En estos análisis, se han realizado interesantes hallazgos a nivel histológico. Estos hallazgos han sido observados tanto en animales que presentan infecciones bacteriales en hepatopáncreas como en animales aparentemente sanos, la prevalencia de dichas observaciones es variable.

Las imágenes presentadas a continuación corresponden a muestras provenientes de granjas de cultivo ubicadas en Centroamérica, sin embargo, a la fecha de su publicación, no se ha corroborado la presencia de CMNV. Otros virus que poseen algunas similitudes como el IMNV y el PvNV mediante ensayos moleculares tampoco han brindado resultados positivos.

Es importante, aclarar que estas “*anomalías tisulares*” no se han correlacionado aun con casos de morbilidad o mortalidad de cultivos. Y ante la ausencia de diagnósticos confirmatorios, se catalogan como idiopatías y requieren de seguimiento y mayores investigaciones.

## Técnicas confirmatorias

Dado que la signología clínica y algunas de las lesiones histopatológicas de este virus no son específicos, su valor diagnóstico es muy limitado, su uso se aplica a dar señales de aviso para detección basada en otras técnicas, y se requieren sistemas de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad para su confirmación, evitando incurrir en diagnósticos errados o falsos positivos.

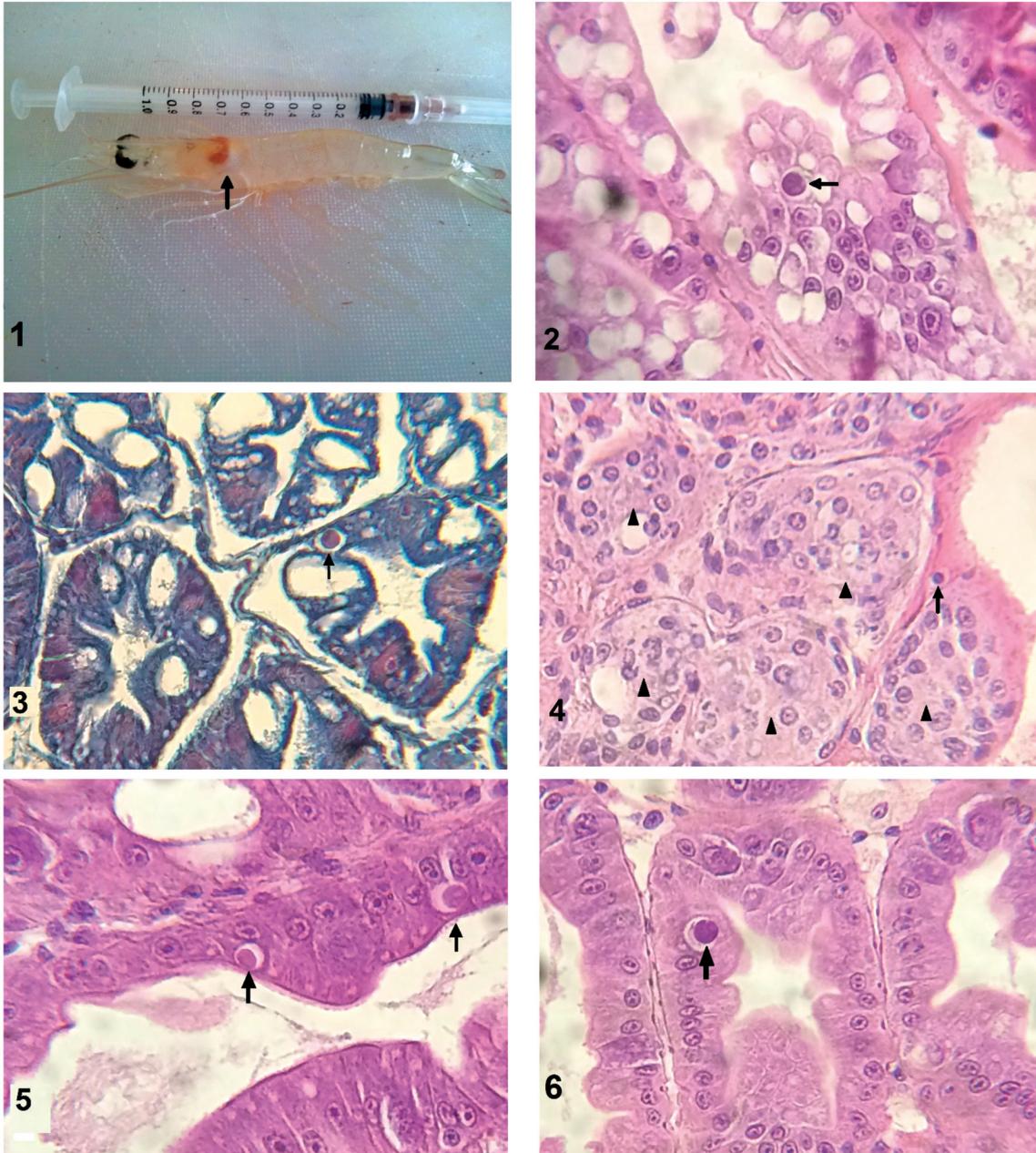
Por ello, recientemente se han desarrollado métodos para la detección mediante análisis moleculares basándose en el reconocimiento de las secuencias conservadas de ARN del genoma del virus. Así, mediante el uso de la reacción en cadena de polimerasa o PCR aplicada sobre muestras sospechosas de estar infectadas por CMNV, es posible confirmar la presencia del patógeno, incluso en ausencia de lesiones detectables.

Zhang y colaboradores (2015) han publicado el desarrollo de un sistema de diagnóstico basado en la reacción en cadena en tiempo real, mediante un sistema de amplificación por transcripción reversa isotermal (RT-LAMP).

Adicionalmente, tal como se mencionó, también se han desarrollado y utilizado sondas específicas con las cuales se pueden realizar ensayos de hibridación *in situ* (Flegel, 2015; Thitamadee *et al.* 2015), permitiendo de este modo determinar el tropismo celular del virus. Por lo que la combinación de técnicas histológicas de rutina con técnicas moleculares permitirá profundizar los estudios y sobre el efecto real del virus en el hospedador.

Las investigaciones sobre el nodavirus de la mortalidad encubierta continúan, así como la determinación de sus secuencias genómicas y los estudios sobre sus raíces y relaciones filogenéticas.

Ya se han publicado algunas de las secuencias genéticas pertenecientes al virus, entre ellas la secuencia que codifica para la RNA polimerasa; dicha secuencia se encuentra disponible en línea y puede ser consultada en la página del Genbank, del National Center of Biology Investigations ([ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)). A partir de



**Figura 1.** Camarón juvenil *Litopenaeus vannamei* presentando hepatopáncreas atrofiado y con pérdida de pigmentación (flecha), estómago e intestino vacíos. Fig. 2. Corte diagonal de túbulo hepatopancreático, se observa una inclusión basofílica (flecha), tinción H&E 400X. Fig. 3. Corte transversal de hepatopáncreas, presencia de un cuerpo de inclusión (flecha), tinción de Giemsa 400X. Fig. 4. Corte de órgano linfóide, se observa un núcleo picnótico (flecha), y múltiples esferoides vacuolizados (cabezas de flecha), tinción H&E. 450X. Fig. 5 y 6. Cortes de hepatopáncreas presentando inclusiones múltiples, no se observan lesiones adyacentes. Tinción H&E. 400X. Fotos. A. Varela.

ella, ya se han diseñado algunos *primers* para utilizarse en los diagnósticos.

## Consideraciones finales

El recurrente ingreso de patógenos exóticos entre regiones y continentes demuestra la dificultad que existe para evitar este tipo de sucesos a pesar de los sistemas de bioseguridad existentes y los controles oficiales y zoonosarios instaurados para su contención. Por tanto, es muy probable que nuevas patologías continúen penetrando a nuevas regiones, Centroamérica no es la excepción.

La región está presentando cuadros patológicos recurrentes, desde México hasta Centroamérica, con efectos variables en las sobrevivencias, estos brotes se encuentran claramente relacionados con infecciones bacteriales, sin embargo; ello no implica que se deba ignorar la posibilidad de participación viral o parasitológica, como ocurre en Asia, y es conveniente realizar monitoreos de vigilancia.

Dada la similitud existente entre los signos clínicos desarrollados por diferentes enfermedades de camarones, es de gran importancia realizar tamizajes regionales con el fin de mantener una vigilancia activa conjunta en la región y evitar el ingreso inadvertido de patógenos a la región.

Algunos países de la región presentan cuadros clínico-lesionales compatibles con algunas patologías, incluido el CMNV, lo cual no posee valor diagnóstico confirmatorio, del mismo modo, no se ha correlacionado la presencia de estas lesiones con morbilidades o mortalidades en los cultivos, por lo que se requiere de mayores investigaciones.

Se necesita avanzar en el conocimiento de este patógeno, así como determinar si se encuentran o no expandiendo su distribución geográfica, incluso se debe determinar si está presente en el continente americano.

Muchos detalles importantes se desconocen aún, como la patogenicidad, virulencia y contagiosidad del virus. Del mismo modo, se ignora la susceptibilidad de las líneas de camarones cultivados en América, y el eventual comportamiento

del virus de ingresar a esta región del globo, con sus particularidades climáticas y de producción.

## Bibliografía consultada

- Bell, T, A; Lightner, D, V. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Bonami J, R; Lightner D, V; Redman, R; Poulos, B, T. 1992. Partial characterization of togavirus (LOVV) associated with histopathological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimps. *Dis Aquat Org* 1992; 14:145-52.
- Bondad-Reantaso, M, G; McGladdery, S, E; East, I; Subasinghe, R, P. (eds.) 2001. Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper No. 402, Supplement 2. Rome, FAO. 240 p
- Chang, Y, S; Peng, S, E; Yu, H, T; Liu, F, C; Wang, C, H; Lo, C, F; Kou, G, H. 2004. Genetic and phenotypic variations of isolates of shrimp Taura syndrome virus found in *Penaeus monodon* and *Metapenaeus ensis* in Taiwan. *J. Gen. Virol.* 85, 2963-2968.
- NACA. National Center of Biology Investigations. Covert mortality nodavirus isolate Hebei-20120627 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, partial cds. GenBank: KM112247.1. En: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/675118442>.
- Cuellar-Ánjel, J. 2015. Mionecrosis infecciosa. The Center for Food Security & Public Health, Iowa State University. USA. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. En: <http://www.cfs-ph.iastate.edu/Factsheets/es/infectious-myonecrosis-es.pdf>
- de la Rosa-Vélez, J; Cedano-Thomas, Y; Cid-Becerra, J; Méndez-Payán, J, C; Vega-Pérez, C; J Zambrano-García, J; Bonami, J, R. 2006. Presumptive detection of yellow head virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and dot-blot hybridization in *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* cultured on the Northwest coast of Mexico. *Journal of Fish Diseases* 2006, 29, 717-726.
- Duangsuwan, P; Tinikul, Y; Chotwivatthanakun, C; Vanichviriyakit, R; Sobhon, P. 2008. Changes in the histological organization and spheroid formation in lymphoid organ of *Penaeus monodon* infected with

- yellow head virus. *Fish & Shellfish Immunology* 25 (2008) 560-569.
- Flegel, T. 2015. Problems other than AHPND in EMS ponds. On: FAO TCP/INT/3502 “Reducing and managing the risk of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of Cultured Shrimp” Panamá.
- Han<sup>1</sup>, J, E; Tang, F, J; Lightner, D, V. 2015. Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Dis Aquat Org.* Vol. 105: 45–55, 2013.
- Han<sup>2</sup>, J, E; Tang, F, J; Tran, L; Lightner, D, V. 2015. *Photobacterium* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis Aquat Org* Vol. 113: 33-40.
- Hasson, K; Lightner, D, V; Mohny, L; Redman, R; White, B. 1999. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. *Dis Aquat Org.* Vol. 38: 93-105, 1999
- Huang, J. 2012. Experiences in EMS/AHPNS from China. On Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific Regional Consultation on the Emerging Shrimp Disease: Early Mortality Syndrome (EMS) / Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS). Final Report.
- Huang, J; Zhang, Q, L; Nan Bai; Xiao-Yuan Wan; Hai-Liang Wang; Guo-Si Xie; Bing Yang; Xiu-Hua Wang; Chen Li; Xiao-Ling Song. 2015. Covert mortality nodavirus (CMNV): the pathogen, epidemiology, and co-infection with EMS/AHPND. On: FAO TCP/INT/3502 “Reducing and managing the risk of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of Cultured Shrimp” Panamá.
- Lightner, D, V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. USA.
- Lightner, D, V; Redman, R, M; Bell, T, A. 1983. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.* 42, 62–70.
- Lightner, D, V; Pantoja, C. 2001. Manual para el Diagnóstico de Enfermedades del Camarón. United States Department of Agriculture - Programa de Reconstrucción Huracán Mitch. USDA/CSREES/USAID/UAZ).
- Morales-Covarrubias, M, S; Cuellar-Ánjel, J; Varela-Mejías, A; Elizondo-Ovares, C. 2015. Principales Enfermedades Bacterianas de camarones en Latinoamérica, presentado en FAO TCP/INT/3502. (2015). Taller: Reducing and managing the risk of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of Cultured Shrimp” Government, Scientist and Farmer Responses 22-24. Panama.
- Morales-Covarrubias, M, S; Osuna-Duarte, A, G; García-Gasca, A. 2006. Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. *Journal of Aquatic Animal Health* 18:019–025, 2006.
- NCBI. National Center of Biology Investigations. 2012. Regional Consultation on the Emerging Shrimp Disease: Early Mortality Syndrome (EMS) / Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS). Final Report.
- Nunan, L; Lightner, D, V; Pantoja, C; Gomez-Jimenez, S. 2014. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat Org.* Vol. 111: 81-86.
- Owens L, de Beer S, Smith, J. 1991. Lymphoidal parvovirus-like particles in Australian penaeid prawns. *Dis Aquat Org* 1991; 11:129-34.
- Pantoja, C; Lightner, D, V. 2013. EMS/AHPND Descripción de la enfermedad en Asia y América. En: Guía técnica patología e inmunología de camarones peneidos. Morales, V. y J. Cuéllar-Ánjel. Eds. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. p172.
- Pantoja, C; Lightner, D, V. 2014. Enfermedades virales. p. 99-164. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Ánjel (eds.). 2014. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Peneidos. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.
- Saksmerprom, V; Jitrakorn, S; Chayaburakul, K; Laiphrom, S; Boonsua, K; Flegel, T, W. 2011. Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Research* 160 (2011)180-190.

- Senapin, S; Phiwsalya, K; Gangnonngiw, W; Flegel, T, W. 2011. False rumours of disease outbreaks caused by infectious myonecrosis virus (IMNV) in the white leg shrimp in Asia. *J. Negat. Results Biomed.*, 10, 10.
- Tang, K; Pantoja, C; Poulos, B, T; Redman, R, M; Han, J, E; Tran, L; Lightner, D, V. 2005. In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Dis. Aquat. Org.* Vol. 63: 261–265, 2005
- Tang, K; Pantoja, C; Redman, R; Han, J, E; Tran, L; Lightner, D, V. 2015. Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of Enterocytozoon hepatopenaei (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. *J. of Invertebrate Pathology.* Vol. 130: 37-41.
- Tang, K; Pantoja, C; Redman, R, M; Lightner, D, V. 2007. Development of *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.* Vol. 75: 183–190. 2007
- Thitamadee, S; Prachumwat, A; Srisala, J; Jaroenlak, P; Salachan, P; Sritunyalucksana, K; Flegel, T, W; Itsathitphaisarn, O. 2015. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture* 452 (2016) 69–87
- 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. *Dis Aquat Org.* Vol. 105: 45–55, 2013
- Varela, A; Peña, N. 2013. El Virus del Síndrome de las Manchas Blancas (WSSV): una revisión y su impacto en la camaronicultura costarricense”. *Revista Ciencias Veterinarias. Escuela de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Costa Rica.* 28, N° 2, [51-69]
- Varela, A; Peña, N. 2014. Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS) en camarones cultivados: Una revisión. *Revista Repertorio Científico. Universidad Estatal a Distancia C.R.* Vol. 17, N° 1. 2014: 25-30
- Varela, A; Peña, N. 2015. Hepatopancreatitis Necrotizante asociada al Fenómeno del Niño, en cultivos de camarones del Golfo de Nicoya. *Revista Repertorio Científico. Universidad Estatal a Distancia C.R.* Vol.18. N°1. 2015:29-34
- Varela, A; Peña, N. 2016. Histopatología diferencial de tres enfermedades bacterianas que afectan el hepatopáncreas de camarones peneidos. *Agron. Mesoam.* 27(1):73-80. 2016
- Vincent, A; Lotz, J. 2005. Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP-bacterium using real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.* 67:163-169.
- Zhang, Q; Liu, S; Yang, H; Liu, S; Zhu, L; Yang, B; Jin, J; Ding, L; Wang, X; Liang, Y; Wang, Q; Huang, J . 2014. A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *Journal of General Virology,* 2014:95, 2700–2709
- Zhang, Q., Liu, S; Yang, H; Zhu, L; Wan, X; Li, X; Huang, J. 2015. , Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative assay of covert mortality nodavirus in shrimp, *Journal of Invertebrate Pathology* (2015), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.09.001>