

## CAPÍTULO 2.2.1.

# ENFERMEDAD DE LA NECROSIS HEPATOPANCREÁTICA AGUDA

---

### 1. Ámbito de aplicación

La necrosis hepatopancreática aguda (NHPA) es una infección por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* ( $Vp_{NHPA}$ ) que contienen un plásmido de ~70 kpb con genes que codifican homólogos de toxinas relacionadas con el insecto *Photobacterium* (Pir), concretamente, PirA y PirB.

### 2. Información sobre la enfermedad

#### 2.1. Factores del agente

##### 2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

La NHPA tiene una etiología bacteriana (Kondo *et al.*, 2015; Kwai *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2013a; 2013b). Está causada por cepas virulentas específicas de *V. parahaemolyticus* ( $Vp_{AHPND}$ ), que contienen un plásmido de ~70-kpb con genes que codifican homólogos de la toxina binaria relacionada con el insecto *Photobacterium*, concretamente, PirA y PirB (Gomez-Gil *et al.*, 2014; Gomez-Jimenez *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015a; Kondo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). El plásmido de  $Vp_{AHPND}$  se ha denominado pVA1, y su tamaño puede variar ligeramente. La eliminación (o “curación”) de pVA1 termina con la capacidad de las cepas de  $Vp_{AHPND}$  de causar NHPA.

Dentro de una población de bacterias  $Vp_{AHPND}$ , puede tener lugar una supresión natural del operón Pir<sup>VP</sup> en unos pocos individuos (Lee *et al.*, 2015; Tinwongger *et al.*, 2014). Esta supresión se debe a la inestabilidad causada por las secuencias repetidas de transposasa que flanquean el operón de la toxina Pir. Cuando se produce una supresión, la cepa de  $Vp_{AHPND}$  perderá su capacidad de inducir NHPA. No obstante, si la secuencia de la toxina Pir se utiliza como diana para la detección, las colonias con tal supresión darán un resultado negativo por más que deriven de una cepa de  $Vp_{AHPND}$  causante de NHPA. Un informe reciente describe un mutante de delección natural de  $Vp_{AHPND}$  que no causa una manifestación clínica de NHPA (Aranguren *et al.*, 2020a).

El plásmido pVA1 también es portador de un conjunto de genes relacionados con la transferencia conjugativa, lo cual significa que este plásmido puede llegar a transferirse a otras bacterias.

##### 2.1.2. Supervivencia y estabilidad en muestras procesadas o conservadas

La NHPA no se puede transmitir desde muestras infectadas que se hayan conservado por congelación (Tran *et al.*, 2013). Algunas especies de *Vibrio* son sensibles a la congelación (Muntada-Garriga *et al.*, 1995; Thomson y Thacker, 1973).

##### 2.1.3. Supervivencia y estabilidad fuera del hospedador

Se considera que  $Vp_{AHPND}$  tiene propiedades similares a las de otras cepas de *V. parahaemolyticus* halladas en productos alimentarios marinos que se ha comprobado que sobreviven hasta 9 a 18 días en agua filtrada de estuarios y en agua de mar filtrada a una temperatura ambiente de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (Karunasagar *et al.*, 1987).

En la sección 2.4.5 se pueden consultar los métodos de inactivación.

## 2.2. Factores del hospedador

### 2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Las especies que cumplen los criterios para su inclusión en la lista de especies susceptibles a la NHPA según el Capítulo 1.5 del *Código Acuático* son las siguientes: el langostino jumbo (*Penaeus monodon*) y el camarón patiblanco (*P. vannamei*).

### 2.2.2. Especies con pruebas insuficientes de susceptibilidad

Las especies en las que no se dispone de pruebas suficientes de susceptibilidad a la NHPA según el Capítulo 1.5 del *Código Acuático* son las siguientes: langostino carnoso (*Penaeus chinensis*).

Además, se han hallado resultados positivos en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica del agente patógeno en el camarón tigre (*Penaeus japonicus*), aunque no se ha demostrado su infección activa.

### 2.2.3. Probabilidad de infección por especie, estadio de vida del hospedador, población o subpoblaciones

Aparece mortalidad a los 30–35 días, e incluso apenas 10 días después de repoblar los estanques de cría de camarones con postlarvas (PL) o juveniles (Joshi *et al.*, 2014b; Leño y Mohan, 2012; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b). De la Pena *et al.* (2015) indicaron brotes de enfermedad en Filipinas incluso 46–96 días después de repoblar los estanques.

### 2.2.4. Distribución del agente patógeno en el hospedador

Intestino, incluido el estómago, y hepatopáncreas.

### 2.2.5. Animales acuáticos reservorios de la infección

Ninguno conocido.

### 2.2.6. Vectores

No se conoce ninguno, aunque dado que *Vibrio* spp. es ubicuário en el medio marino, no se descarta la posibilidad de que existan especies que actúen como vectores.

## 2.3. Patrón de la enfermedad

### 2.3.1. Mortalidad, morbilidad y prevalencia

La NHPA se caracteriza por mortalidades súbitas y masivas (de hasta el 100%) normalmente en un plazo máximo de 30-35 días tras la repoblación de estanques de engorde con PL o juveniles (Hong *et al.*, 2016). También puede estar afectados los juveniles de más edad (de la Pena *et al.*, 2015).

En las regiones en las que la NHPA es enzoótica en camarones de piscifactoría, los datos indican cerca de un 100% de prevalencia (Tran *et al.*, 2014).

### 2.3.2. Signos clínicos, incluidas alteraciones conductuales

La aparición de signos de enfermedad y mortalidad puede comenzar apenas 10 días después de la repoblación. Los signos de enfermedad en langostinos moribundos pueden incluir hepatopáncreas (HP) pálido a blanco debido a la pérdida de pigmento en la cápsula de tejido conjuntivo (NACA, 2014). También pueden observarse alteraciones conductuales, como el hundimiento frecuente en el fondo de los tanques.

### 2.3.3. Lesiones macroscópicas

Las lesiones macroscópicas incluyen un hepatopáncreas de pálido a blanco, atrofia significativa del hepatopáncreas, caparazones blandos, vísceras con contenido discontinuo o sin contenido y manchas o rayas negras visibles dentro del hepatopáncreas (debido a túbulos melanizados).

Además, el hepatopáncreas no se aplasta fácilmente entre el pulgar y el índice (probablemente debido al aumento del tejido conjuntivo fibroso y de hemocitos) (NACA, 2014).

#### 2.3.4. Mecanismos de transmisión y ciclo de vida

El VNHPA se ha transmitido experimentalmente por inmersión, ingesta (vía oral) y alimentación forzada inversa (Dabu *et al.*, 2017; Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013), simulando la transmisión horizontal natural por vía oral y la cohabitación.

#### 2.3.5. Factores ambientales

Las fuentes de agua con baja salinidad (<20 ppt) parecen reducir la incidencia de la enfermedad. El pico de incidencia parece producirse durante la estación cálida y seca, de abril a julio. La sobrealimentación, la mala calidad de los inóculos, la mala calidad del agua, la mala calidad de los piensos, las floraciones de algas o los choques también son factores que pueden provocar la aparición de NHPA en zonas endémicas (NACA, 2014).

#### 2.3.6. Distribución geográfica

La enfermedad se notificó inicialmente en Asia en 2010. Desde entonces, se ha notificado en América (2013) y en África (2017).

Véase la plataforma WAHIS de la OMSA (<https://wahis.woah.org/#/home>) para información reciente sobre la distribución a nivel nacional.

### 2.4. Estrategias de bioseguridad y de control de la enfermedad

#### 2.4.1. Vacunación

No se dispone de ninguna.

#### 2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas incluidos agentes bloqueantes

Ninguno disponible.

#### 2.4.3. Inmunoestimulación

No se conoce ninguna efectiva.

#### 2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se realiza.

#### 2.4.5. Métodos de inactivación

Estudios experimentales mostraron que  $Vp_{\text{AHPND}}$  no podía transmitirse a través de camarones infectados congelados (Tran *et al.*, 2013). Del mismo modo, se sabe que otras cepas de *V. parahaemolyticus* son sensibles a la congelación, la refrigeración, el calentamiento y desinfectantes comunes (Muntada-Garriga *et al.*, 1995; Thomson y Thacker, 1973).

#### 2.4.6. Desinfección de huevos y larvas

Ninguna conocida.

#### 2.4.7. Prácticas generales de manejo

Como ocurre con otras enfermedades infecciosas de los camarones, es probable que resulte ventajoso establecer buenas prácticas sanitarias y de bioseguridad, como la mejora de las condiciones sanitarias del vivero y el cribado de las PL; un buen manejo de los reproductores, el uso de post-larvas de calidad y un buen manejo de la piscifactoría de camarones, incluido un estricto control de la tasa de alimentación, una densidad de población adecuada, etc. son estrategias que se sabe reducen el impacto de las enfermedades, incluida la NHPA. Recientemente, se ha descrito una

línea de *P. vannamei* tolerante a la NHPA, pero en la actualidad (2022) no se comercializan líneas mejoradas genéticamente (Aranguren et al., 2020b).

### **3. Elección del tipo de muestra y obtención, transporte y manipulación de las muestras**

Esta sección se basa en la información de las secciones 2.2, 2.3 y 2.4 para identificar las poblaciones, los individuos y las muestras que tienen más probabilidades de estar infectados.

#### **3.1. Elección de la población y de los ejemplares**

Para el diagnóstico de la NHPA deben escogerse camarones moribundos o camarones que presenten signos clínicos (véase la Sección 2.3.2). Se considera que los adultos (reproductores) pueden ser portadores de cepas de *Vp<sub>AHPND</sub>* (Lee et al., 2015; Nunan et al., 2014; Soto-Rodríguez et al., 2015; Tran et al., 2013). Por lo tanto, para las pruebas de diagnóstico también pueden escogerse reproductores sin signos clínicos.

#### **3.2. Elección de órganos o tejidos**

Pueden tomarse muestras de tejidos y órganos asociados al intestino, como el hepatopáncreas, el estómago, el intestino medio o el intestino posterior.

#### **3.3. Muestras o tejidos que no son adecuados para detectar el agente patógeno**

Toda muestra distinta de los tejidos y órganos asociados al intestino será inadecuada (NACA, 2014; Nunan et al., 2014; Soto-Rodríguez et al., 2015; Tran et al., 2013).

#### **3.4. Muestreo no letal**

Se puede recoger materia fecal de valiosos reproductores para el diagnóstico de la NHPA. Sin embargo, en comparación con el muestreo de tejidos, no se ha evaluado la utilidad comparativa de las muestras fecales para detectar bacterias causantes de NHPA.

Si los tipos de muestras de tejidos cuyo muestreo no letal difieren de los tejidos recomendados (véase la sección 3.2.), o de las muestras de tejidos utilizadas en los estudios de validación, deberá tenerse en cuenta el efecto sobre el rendimiento del diagnóstico.

#### **3.5. Conservación de muestras para el envío**

Para más información sobre los métodos de conservación de las muestras para cada método analítico, consúltese el Capítulo 2.2.0.

##### **3.5.1. Muestras para el aislamiento del agente patógeno**

Para el éxito del aislamiento de agentes patógenos y el bioensayo es fundamental disponer de muestras de calidad. La calidad de las muestras depende principalmente del tiempo transcurrido desde su recogida y del tiempo de almacenamiento. Las muestras frescas deben conservarse en hielo y, preferiblemente, enviarse al laboratorio en las 24 horas siguientes a su recogida. Para evitar la degradación de las muestras, pueden usarse métodos de almacenamiento alternativos sólo tras consultar con el laboratorio receptor.

##### **3.5.2. Conservación de muestras para la detección molecular**

Las muestras de tejido para la PCR deben conservarse en etanol de grado analítico/regenerativo (no desnaturalizado) al 90% (v/v). La proporción recomendada de etanol respecto a tejido es de 10:1 según estudios en animales terrestres y de salud humana. No se recomienda el uso de etanol de grado inferior (de laboratorio o industrial). Como alternativa, las muestras pueden conservarse en un conservante de ADN para PCR. Si el material no puede fijarse, puede congelarse, pero debe evitarse la congelación y descongelación repetidas de las muestras.

Los métodos normalizados de recogida, conservación y procesamiento de muestras para técnicas moleculares figuran en la Sección B.5.5. del Capítulo 2.2.0 *Información general* (enfermedades de los crustáceos).

### 3.5.3. Muestras para histopatología, inmunohistoquímica o hibridación *in-situ*

Las muestras de tejido para histopatología, inmunohistoquímica o hibridación *in situ* pueden conservarse en el fijador AFA de Davidson para histología (Joshi *et al.*, 2014a; 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Sirikharin *et al.*, 2015; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013).

### 3.5.4. Muestras para otras pruebas

No es aplicable.

## 3.6. Combinación de varias muestras

La combinación de muestras de más de un animal para una finalidad definida sólo debe recomendarse cuando se hayan evaluado datos de respaldo sólidos sobre la sensibilidad y la especificidad diagnósticas y se hayan considerado adecuados. No se ha evaluado a fondo el efecto de la combinación en la sensibilidad diagnóstica, por lo que las muestras de mayor tamaño deben procesarse y analizarse individualmente. Los estadios de vida pequeños pueden combinarse para obtener la cantidad mínima necesaria de material para el aislamiento bacteriano o la detección molecular.

## 4. Métodos de diagnóstico

Los métodos actualmente disponibles para la detección de agentes patógenos que pueden utilizarse en i) la vigilancia de animales aparentemente sanos, ii) el diagnóstico preliminar en animales afectados clínicamente y iii) con fines de diagnóstico confirmativo se enumeran en la Tabla 4.1. por estadio de vida del animal.

Calificaciones según las finalidades de uso. Para cada ensayo recomendado se proporciona una clasificación cualitativa para la finalidad definida de uso. Las calificaciones se determinan según múltiples factores de rendimiento y operacionales relevantes para la aplicación de un ensayo para una finalidad definida. Estos factores son: si el ensayo tiene las características apropiadas de rendimiento diagnóstico, el nivel de validación del ensayo, el coste de la disponibilidad, la puntualidad, y el rendimiento y operatividad de la muestra. Para una finalidad de uso definida, cada ensayo se clasifica como:

+++ =	Métodos son más adecuados con un rendimiento y unas características operativas deseables.
++ =	Métodos adecuados con un rendimiento y unas características operativas aceptables en la mayoría de las circunstancias.
+ =	Métodos adecuados, pero el rendimiento o las características operativas pueden limitar su aplicación en algunas circunstancias.

Recuadros sombreados = Métodos no adecuados para esta finalidad.

Etapa de validación. La etapa de validación corresponde al proceso de desarrollo y validación del ensayo, como se explica en el capítulo 1.1.2. La etapa de validación es específica para cada finalidad de uso. Cuando se dispone de ella, en la sección 6.3 se ofrece información sobre el rendimiento diagnóstico de los ensayos recomendados.

Los Laboratorios de Referencia de la OMSA agradecen todo comentario sobre el rendimiento diagnóstico de los ensayos recomendados, en particular las PCR. Son de especial interés los factores que afectan a la sensibilidad esperada (por ejemplo, componentes tisulares que inhiben la amplificación) o a la especificidad esperada (por ejemplo, no detección de genotipos particulares, detección de secuencias homólogas dentro del genoma del hospedador) del ensayo. Estas cuestiones deberán comunicarse a los Laboratorios de Referencia de la OMSA para que se pueda asesorar a los laboratorios de diagnóstico y modificar las normas en caso necesario.

**Tabla 4.1. Métodos de diagnóstico recomendados por la OMSA y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y para la investigación de animales con signos clínicos**

Método	A. Vigilancia de animales aparentemente sanos				B. Diagnóstico preliminar de animales con signos clínicos				C. Diagnóstico confirmativo <sup>1</sup> de un resultado sospechoso en la vigilancia o del diagnóstico preliminar			
	Estadios de vida tempranos <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adultos	NV	Estadios de vida tempranos <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adultos	NV	Estadios de vida tempranos <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adultos	NV
Preparaciones húmedas												
Histopatología		+	+	NA		+	+	NA				
Aislamiento					+	+	+	NA				
PCR en tiempo real	++	++	++	1	++	++	++	1	++	++	++	1
PCR convencional	++	++	++	2	++	++	++	2				
PCR convencional seguida de secuenciación del amplicón									+++	+++	+++	2
Hibridación <i>in-situ</i>												
Bioensayo					+	+	+	NA				
LAMP		++	++	1								
ELISA -Ac												
ELISA-Ag		+	++	1		+	++	1		+	++	1
Otros métodos de detección de antígeno <sup>3</sup>												
Otros métodos												

NV = nivel de validación, hace referencia al estadio de vida en el proceso de la OMSA (Capítulo 1.1.2); PCR = reacción en cadena de la polimerasa; LAMP = amplificación isotérmica mediada por bucle; ELISA-Ac= enzimoimmunoanálisis de detección de anticuerpo; ELISA-Ag = enzimoimmunoanálisis de detección de antígeno; NA = No disponible.

<sup>1</sup>Para el diagnóstico confirmativo, deben aplicarse varios métodos combinados (véase la Sección 6). <sup>2</sup>La susceptibilidad de los estadios de vida temprano y juvenil se describe en la Sección 2.2.3. El sombreado indica que la prueba no es adecuada o no debe utilizarse para esta finalidad.

#### 4.1. Preparaciones húmedas

No es aplicable.

#### 4.2. Histopatología y citopatología

El examen histológico de los camarones infectados por HPNA revela que las lesiones se limitan al hepatopáncreas (HP). La enfermedad tiene tres fases distintas:

- i) La fase aguda se caracteriza por una degeneración masiva y progresiva de los túbulos del HP de proximal a distal, con un redondeo significativo y desprendimiento de las células epiteliales de los túbulos del HP hacia el interior de los túbulos del HP, los conductos colectores del HP y el estómago posterior. No se observan células B, F ni R en el túbulo hepatopancreático y algunos núcleos de las células epiteliales del túbulo están agrandados (cariogénesis). Durante esta fase no aparece una participación bacteriana significativa (Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).
- ii) La fase terminal se caracteriza por una marcada inflamación hemocítica intratubular e infecciones bacterianas secundarias masivas que se producen en asociación con las células tubulares del HP necróticas y desprendidas (NACA, 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).
- iii) En las líneas de *Penaeus vannamei* tolerantes a la HPNA se observa una fase crónica. La fase crónica se caracteriza por unos pocos túbulos con necrosis epitelial acompañada de bacterias e inflamación. Esta fase se asemeja a una necrosis hepatopancreática séptica (NHPS) (Aranguren *et al.*, 2020b).

#### 4.3. Aislamiento

##### 4.3.1. Enriquecimiento de las muestras antes de la extracción del ADN

El cultivo de enriquecimiento preliminar para la detección de  $Vp_{\text{AHPND}}$  puede realizarse utilizando cualquier medio bacteriológico adecuado (por ejemplo, caldo de soja-tríptico o agua de peptona alcalina con un suplemento de NaCl al 2,5%) incubado durante 4 horas a 30°C con agitación. A continuación, después de dejar sedimentar los detritus, las bacterias presentes en el caldo de cultivo precipitan por centrifugación. Una vez desechado el sobrenadante, se puede extraer ADN del sedimento bacteriano para prepararlo para el análisis por PCR.

##### 4.3.2. Aislamiento del agente

$Vp_{\text{AHPND}}$  puede aislarse de camarones enfermos utilizando medios microbiológicos estándar para el aislamiento de especies de *Vibrio* de tales fuentes (Lightner, 1996; Tran *et al.*, 2013). La confirmación de la identificación de  $Vp_{\text{AHPND}}$  puede llevarse a cabo mediante PCR.

#### 4.4. Amplificación de ácido nucleico

Las PCR deberán realizarse siempre con los controles especificados en la Sección 5.5 *Uso de técnicas moleculares y basadas en anticuerpos para pruebas de confirmación y diagnóstico* del Capítulo 2.2.0 *Información general* (enfermedades de los crustáceos). Cada muestra deberá analizarse por duplicado.

##### *Extracción de ácidos nucleicos*

Se pueden utilizar diferentes kits y procedimientos para la extracción de ácidos nucleicos. La calidad y la concentración del ácido nucleico extraído son importantes y pueden comprobarse mediante un método adecuado a las circunstancias.

Se han desarrollado PCR dirigidas a los genes de la toxina de  $Vp_{\text{AHPND}}$ . El método AP3 es una PCR de un solo paso dirigida al gen PirAvp, de 12,7 kDa (Sirikharin *et al.*, 2015). Se validó para cepas de  $Vp_{\text{AHPND}}$  y bacterias no patógenas (incluidas otras especies de *Vibrio* y no de *Vibrio*) que se habían analizado previamente mediante bioensayo (Sirikharin *et al.*, 2015). Posteriormente, Soto-Rodríguez *et al.* (2015), utilizando 9  $Vp_{\text{AHPND}}$  y 11 cepas no patógenas de *V. parahaemolyticus* informaron de que el método AP3 arrojó los valores predictivos positivos (90%) y negativos (100%) más altos de los cinco métodos de PCR probados.

Las PCR de un solo paso, como el método AP3 y otros, por ejemplo, VpPirA-284, VpPirB-392 (Han *et al.*, 2015a) y TUMSAT-Vp3 (Tinwongger *et al.*, 2014), tienen una sensibilidad relativamente baja cuando se utilizan para la detección de *Vp<sub>AHPND</sub>* a niveles bajos (por ejemplo, infecciones subclínicas). Para tales muestras, se recomienda un paso de enriquecimiento preliminar (véase la sección 4.3.1. *Enriquecimiento de las muestras antes de la extracción de ADN*)

Como alternativa, se ha desarrollado un método de PCR anidada, AP4, con un valor predictivo positivo del 100% para *Vp<sub>AHPND</sub>* utilizando las mismas 104 cepas bacterianas aisladas que se utilizaron para validar el método AP3 anteriormente (Dangtip *et al.*, 2015), y tiene una mayor sensibilidad (1 fg de ADN extraído de *Vp<sub>AHPND</sub>*), lo que permite utilizarlo directamente con tejido sin enriquecimiento.

Además, las PCR en tiempo real, por ejemplo, la PCR en tiempo real TaqMan específica de *Vp<sub>AHPND</sub>* desarrollada por Han *et al.* (2015b), y un protocolo de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) desarrollado por Koiwai *et al.* (2016) también tienen una sensibilidad alta y pueden utilizarse directamente con tejido sin enriquecimiento.

Se puede utilizar un método general de extracción de ADN para extraer ADN del estómago o del tejido hepatopancreático de camarones supuestamente infectados, de cultivos de cepas bacterianas aisladas purificadas o de pellets bacterianos de cultivos de enriquecimiento (véase la Sección 4.3). La cantidad de ADN molde en un volumen de reacción de PCR de 25 µl debe ser del orden de 0,01-1 ng de ADN cuando se extrae de cepas bacterianas aisladas (es decir, directamente de un cultivo purificado) y del orden de 10-100 ng de ADN total cuando se extrae de tejidos de camarones o de un precipitado bacteriano derivado de un cultivo de enriquecimiento.

#### 4.4.1. PCR en tiempo real

Agente patógeno/gen diana	Cebador/sonda (5'→3')	Concentración	Parámetros del ciclado
Método 1: Han <i>et al.</i> , 2015b; N.º de acceso a GenBank: KM067908			
<i>pirA</i>	Dir VpPirA-F: TTG-GAC-TGT-CGA-ACC-AAA-CG Inv VpPirA-R: GCA-CCC-CAT-TGG-TAT-TGA-ATG Sonda VpPirA: FAM-AGA-CAG-CAA-ACA-TAC-ACC-TAT-CAT-CCC-GGA-TAMRA	Dir: 0,3 µM Inv: 0,3 µM probe: 0,1 µM	95°C/20 seg; 45 ciclos 95°C/3 seg and 60°C/30 seg

#### 4.4.2. PCR convencional

Agente patógeno/gen diana	Cebador/sonda (5'→3')	Concentración	Parámetros del ciclado
Método 1 (AP3): Sirikharin <i>et al.</i> , 2015; N.º de acceso a GenBank: JALL01000066.1; tamaño del amplicón: 333 pb			
<i>pirA<sup>VP</sup></i>	Dir AP3-F: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC Inv AP3-R: GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA	Cada uno a 0,2 µM	94°C/5 min; 30 ciclos de 94°C/30 seg, 53°C/30 seg, 72°C/40 seg; paso de elongación final a 72°C/7 min; la mezcla de reacción puede conservarse a 4°C
Método 2 (TUMSAT-Vp3): Tinwongger <i>et al.</i> , 2014; N.º de acceso a GenBank: AB972427; tamaño del amplicón: 360 pb			
<i>pVA1</i>	Dir TUMSAT-Vp3 F: GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTG-CA Inv TUMSAT-Vp3 R: TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA	Cada uno a 0,6 µM	95°C/2 min; 30 ciclos de 95°C/30 seg, 56°C/30 seg, 72°C/30 seg

Agente patógeno/gen diana	Cebador/sonda (5'→3')	Concentración	Parámetros del ciclado
Método 3 (VpPirA-284): Han <i>et al.</i> , 2015a; N.º de acceso a GenBank: KM067908; tamaño del amplicón: 284 pb			
<i>pirA</i> <sup>VP</sup>	Dir VpPirA-284F: TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG Inv VpPirA-284R: CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA	Cada uno a 0,2 µM	94°C/3 min; 35 ciclos de 94°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/30 seg; extensión final 72°C/7 min
Método 4 (VpPirB-392): Han <i>et al.</i> , 2015a; N.º de acceso a GenBank: KM067908; tamaño del amplicón: 392 pb			
<i>pirB</i> <sup>VP</sup>	Dir VpPirB-392F: TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC Inv VpPirB-392R: TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA	Cada uno a 0,2 µM	94°C/3 min; 35 ciclos de 94°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/30 seg; extensión final 72°C/7 min
Método 5(AP4): Dangtip <i>et al.</i> , 2015; N.º de acceso a GenBank: JPKS01000000; tamaño del amplicón: 1269 pb			
Genes de toxinas <i>PirA</i> y <i>PirB</i>	Primaria Dir AP4-F1: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC Inv AP4-R1: ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA  Anidada Dir AP4-F2: TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG Inv AP4-R2: GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC	Cada uno a 0,2 µM	Primaria 94°C/2 min; 30 ciclos de 94°C/30 seg, 55°C/30 seg, 72°C/90 seg; paso de extensión final a 72°C/2 min; conservar a 4°C  Anidada 94°C/2 min; 25 ciclos de 94°C/20 seg, 55°C/20 seg, 72°C/20 seg; conservar a 4°C

#### 4.4.3. Protocolo de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

Agente patógeno/gen diana	Cebador/sonda (5'→3')	Concentración	Parámetros del ciclado
Método: Koiwai <i>et al.</i> , 2017; N.º de acceso a GenBank: AB972427.1			
Toxina similar a <i>PirAB</i>	F3: TGA-TAA-TGC-ATT-CTA-TCA-TCA-GC B3: ATT-TGA-AAG-ACC-AAA-TGA-AAC-C FIP-F1c: GTG-AGC-ACC-TTC-TTA-GTG-GTA-ATA FIP-F2: GTT-GTA-ATT-AAC-AAT-GGC-GCT-AG BIP-B1c: TGA-CGG-AAT-TTA-ACC-CTA-ACA-ATG-C BIP-B2: GCT-TTG-AAA-GCA-TAG-TTA-GGA-TC	F3: 5,0 pmol B3: 5,0 pmol FIP: 40 pmol BIP: 40 pmol	65°C/60 min y 80°C/5 min

#### 4.4.4. Otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos

Cruz-Flores *et al.* (2019) desarrollaron una PCR múltiple en tiempo real con tinción SYBR green para la detección simultánea de *pirA*, *pirB*, ARNr de 16S y ARNr de 18S, y un ensayo con sonda Taqman para PCR dúplex en tiempo real que muestra una especificidad y sensibilidad altas – el límite de detección fue de 10 copias tanto para *pirA* como para *pirB*. Mai *et al.* (2021) desarrollaron un ensayo de amplificación con recombinasa polimerasa. Este ensayo tiene un límite de detección de cinco copias del gen *pirAB* y una especificidad alta.

#### 4.5. Secuenciación del amplicón

Debe verificarse el tamaño del amplicón de la PCR, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de agarosa. Las dos cadenas de ADN del producto de la PCR deben secuenciarse y analizarse respecto a las secuencias de referencia.

#### 4.6. Hibridación *in-situ*

No disponible.

#### 4.7. Inmunohistoquímica

Kumar *et al.* desarrollaron un ensayo inmunohistoquímico para detectar la NHPA (2019). Sin embargo, este ensayo requiere una mayor validación.

#### 4.8. Bioensayo

$V_{pAHPND}$  se ha transmitido experimentalmente por inmersión y por alimentación forzada inversa (Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013), simulando la transmisión horizontal natural por vía oral y convivencia. Así, tras el aislamiento y purificación de una bacteria sospechosa de causar NHPA, se puede realizar un bioensayo para confirmar la presencia del agente causal. El procedimiento de inmersión se lleva a cabo sumergiendo 15 camarones durante 15 minutos, con aireación, en una suspensión (150 ml de agua de mar artificial limpia) de  $2 \times 10^8$  células de la bacteria cultivada por ml. Tras este período inicial de 15 minutos, los camarones y el inóculo se transfieren a un tanque más grande con un volumen de agua de mar artificial limpia suficiente como para que la concentración final de la bacteria sea de  $2 \times 10^6$  células  $ml^{-1}$ . Los camarones se controlan a intervalos de 6 a 8 horas. Los camarones muertos pueden procesarse para llevar a cabo una PCR para  $V_{pAHPND}$  y un análisis de la secuencia. Los camarones moribundos o supervivientes se procesan para histología, reaislamiento bacteriano, PCR y análisis de la secuencia. Un bioensayo positivo significa la detección de lesiones histológicas características y de  $V_{pAHPND}$  mediante PCR y análisis de la secuencia del amplicón.

#### 4.9. Métodos de detección de anticuerpo o antígeno

Un ensayo de inmunoenzimático indirecto (I-ELISA) para la detección de NHPA desarrollado por Mai *et al.* (2020) mostró una sensibilidad y especificidad altas (el límite de detección fue de 0,008  $ng \mu l^{-1}$  para PirA<sup>vp</sup> y de 0,008  $ng \mu l^{-1}$  para PirB<sup>vp</sup>).

#### 4.10. Otros métodos

Ninguno.

### 5. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia destinada a demostrar la ausencia de la enfermedad en poblaciones aparentemente sanas

Para demostrar la ausencia de NHPA en una población aparentemente sana, se recomienda la PCR en tiempo real (Han *et al.*, 2015b) y la PCR convencional (Dangtip *et al.*, 2015).

### 6. Criterios de diagnóstico confirmativo

Esta sección sólo aborda los resultados de las pruebas de diagnóstico para la detección de la infección en ausencia (Sección 6.1.) o en presencia de signos clínicos (Sección 6.2.), pero no evalúa si el agente infeccioso es la causa del episodio clínico.

Las definiciones de caso sospechoso y caso confirmado se han fijado para respaldar la toma de decisiones relacionadas con el comercio y la confirmación del estatus sanitario a nivel de país, zona o compartimento. Las definiciones de caso para la confirmación de la enfermedad en zonas endémicamente afectadas pueden ser menos estrictas. Si una Autoridad Competente no puede realizar las pruebas de diagnóstico necesarias, deberá pedir asesoramiento al Laboratorio de Referencia de la OMSA apropiado y, si es necesario, remitir muestras a dicho laboratorio para que realice pruebas de confirmación de las muestras del caso índice en un país, una zona o un compartimento que se considere libre de la enfermedad.

## 6.1. Animales aparentemente sanos o animales que no se sabe si están infectados <sup>1</sup>

Las poblaciones aparentemente sanas pueden caer bajo sospecha, y por lo tanto ser objeto de muestreo, si existe algún vínculo epidemiológico con una población infectada. La proximidad hidrográfica a una población infectada o el desplazamiento de animales o productos de origen animal o equipos, etc., desde una población que se sabe que está infectada equivalen a un vínculo epidemiológico. Como alternativa, se toman muestras de poblaciones sanas en estudios cuyo objetivo es demostrar la ausencia de enfermedad.

### 6.1.1. Definición de caso sospechoso en animales aparentemente sanos

Se sospechará la presencia de infección por NHPA si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Un resultado positivo por PCR en tiempo real
- ii) Un resultado positivo por PCR convencional
- iii) Un resultado positivo por LAMP
- iv) Histopatología compatible con la enfermedad
- v) Un resultado positivo por ELISA-Ag

### 6.1.2. Definición de caso confirmado en animales aparentemente sanos

La presencia de infección por *Vibrio parahaemolyticus* ( $V_{p_{AHPND}}$ ) se considera confirmada si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Resultados positivos por PCR en tiempo real y PCR convencional seguida de análisis de la secuencia del amplicón
- ii) Resultados positivos por LAMP y PCR convencional seguida de análisis de la secuencia del amplicón
- iii) Resultados positivos por ELISA-Ag y PCR convencional seguida de análisis de la secuencia del amplicón

## 6.2 Animales con signos clínicos

Los signos clínicos no son patognomónicos de una única enfermedad; sin embargo, pueden reducir el abanico de posibles diagnósticos.

### 6.2.1. Definición de caso sospechoso en animales con signos clínicos

Se sospechará la presencia de infección por *Vibrio parahaemolyticus* ( $V_{p_{AHPND}}$ ) si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Lesión macroscópica o signos clínicos asociados a la enfermedad
- ii) Un resultado positivo por aislamiento del agente
- iii) Un resultado positivo por PCR en tiempo real
- iv) Un resultado positivo por PCR convencional
- v) Un resultado positivo por bioensayo
- vi) Un resultado positivo por LAMP
- vii) Un resultado positivo por ELISA-Ag

---

<sup>1</sup> Por ejemplo, instalaciones transfronterizas.

### 6.2.2. Definición de caso confirmado en animales con signos clínicos

La presencia de infección por *Vibrio parahaemolyticus* (VpAHPND) se considera confirmada si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Resultados positivos por PCR en tiempo real y PCR convencional seguida de análisis de la secuencia del amplicón
- ii) Resultados positivos por LAMP y PCR convencional seguida de análisis de la secuencia del amplicón
- iii) Resultados positivos por ELISA-Ag y PCR convencional seguida de análisis de la secuencia del amplicón

### 6.3. Sensibilidad y especificidad diagnóstica de las pruebas de diagnóstico

El rendimiento diagnóstico de las pruebas recomendadas para la vigilancia o el diagnóstico de la infección por *Vibrio parahaemolyticus* (VpAHPND) se proporciona en las Tablas 6.3.1. y 6.3.2 (actualmente no se dispone de datos). Esta información puede utilizarse para el diseño de estudios sobre la infección por *Vibrio parahaemolyticus* (VpAHPND), sin embargo, debe tenerse en cuenta que el rendimiento diagnóstico es específico de las circunstancias de cada estudio de la exactitud diagnóstica (incluidos la finalidad de la prueba, la población de origen, los tipos de muestras de tejido y las especies hospedadoras) y que el rendimiento diagnóstico puede variar según las condiciones. Solo se presentan datos cuando las pruebas están validadas al menos en el nivel 2 del proceso de validación descrito en el Capítulo 1.1.2. y se dispone de la información en estudios de exactitud diagnóstica publicados.

#### 6.3.1. Para el diagnóstico preliminar de animales con signos clínicos

Tipo de prueba	Finalidad de la prueba	Poblaciones de origen	Tipos de tejidos o muestras	Especie	DSe (n)	DSp (n)	Prueba de referencia	Cita bibliográfica
PCR convencional	Diagnóstico	Camarones con signos clínicos y camarones aparentemente sanos	Cepas bacterianas aisladas causantes de NHPA y no causantes de NHPA	<i>Penaeus vannamei</i>	100	100	Bioensayo	Sirikharin et al., 2015
PCR convencional	Diagnóstico	Camarones con signos clínicos y camarones aparentemente sanos	Cepas bacterianas aisladas causantes de NHPA y no causantes de NHPA	NA	100 <sup>1</sup>	100	Bioensayo	Tinwongger et al., 2014

DSe = Sensibilidad diagnóstica, DSp = Especificidad diagnóstica, NA= No disponible,  
 PCR: = reacción en cadena de la polimerasa.

<sup>1</sup>100% de sensibilidad para el conjunto de cebadores TUMSAT-Vp3.

#### 6.3.2. Para la vigilancia de animales aparentemente sanos

Tipo de prueba	Finalidad de la prueba	Poblaciones de origen	Tipos de tejidos o muestras	Especie	DSe (n)	DSp (n)	Prueba de referencia	Cita bibliográfica

DSe = Sensibilidad diagnóstica, DSp = Especificidad diagnóstica, NA= No disponible,  
 PCR: = reacción en cadena de la polimerasa.

## 8. Bibliografía

- ARANGUREN CARO L.F., MAI H.N., KANRAR S., CRUZ-FLORES R. & DHAR A.K. (2020a). A mutant of *Vibrio parahaemolyticus* *pirAB<sub>VP</sub>* (+) that carries binary toxin genes but does not cause acute hepatopancreatic necrosis disease. *Microorganisms*, **8**, 1549.
- ARANGUREN CARO L.F., MAI H.N., NOBLE B. & DHAR A.K. (2020b). Acute hepatopancreatic necrosis disease (VP<sub>AHPND</sub>), a chronic disease in shrimp (*Penaeus vannamei*) population raised in latin America. *J. Invertebr. Pathol.*, **174**, 107424. doi: 10.1016/j.jip.2020.107424. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32535000
- CRUZ-FLORES R., MAI H.N. & DHAR A.K. (2019). Multiplex SYBR Green and duplex TaqMan real-time PCR assays for the detection of *Photobacterium* Insect-Related (Pir) toxin genes *pirA* and *pirB*. *Mol. Cell. Probes*, **43**, 20–28.
- DABU I.M., LIM J.J., ARABIT P.M.T., ORENSE S.J.A.B., TABARDILLO J.A., CORRE V.L. & MANINGAS M.B.B. (2017). The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquacult. Res.*, **48**, 792–799.
- DANGTIP S., SIRIKHARIN R., SANGUANRUT P., THITAMADEE S., SRITUNYALUCKSANA K., TAENGCHAIYAPHUM S., MAVICHAK R., PROESPRAIWONG P. & FLEGEL T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Rep.*, **2**, 158–162.
- DE LA PENA L.D., CABILLON N.A.R., CATEDRAL D.D., AMAR E.C., USERO R.C., MONOTILLA W.D., CALPE A.T., FERNANDEZ D.D. & SALOMA C.P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.*, **116**, 251–254.
- GOMEZ-GIL B., SOTO-RODRÍGUEZ S., LOZANO R. & BETANCOURT-LOZANO M. (2014). Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00055-14.
- GOMEZ-JIMENEZ S., NORIEGA-OROZCO L., SOTELO-MUNDO R.R., CANTU-ROBLES V.A., COBIAN-GUEMES A.G., COTA-VERDUGO R.G., GAMEZ-ALEJO L.A., DEL POZO-YAUNER L., GUEVARA-HERNANDEZ E., GARCIA-OROZCO K.D., LOPEZ-ZAVALA A.A. & OCHOA-LEYVA A. (2014). High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00800-14.
- HAN J.E., TANG K.F.J., TRAN L.H. & LIGHTNER D.V. (2015a). *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.*, **113**, 33–40.
- HAN J.E., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (2015b). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, **442**, 12–15.
- HONG X.P., XU D., ZHUO Y., LIU H.Q. & LU L.Q. (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **39**, 1085–1097.
- JOSHI J., SRISALA J., SAKAEW W., PRACHUMWAT A., SRITUNYALUCKSANA K., FLEGEL T.W. & THITAMADEE S. (2014a). Identification of bacterial agent(s) for acute hepatopancreatic necrosis syndrome, a new emerging shrimp disease. *Suranaree J. Sci. Technol.* Available from: <http://ird.sut.ac.th/e-journal/Journal/pdf/140283.pdf>.
- JOSHI J., SRISALA J., TRUONG V.H., CHEN I.T., NUANGSAENG B., SUTHIENKUL O., LO C.F., FLEGEL T.W., SRITUNYALUCKSANA K. & THITAMADEE S. (2014b). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, **428–429**, 297–302.
- KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I., VENUGOPAL M.N. & NAGESHA C.N. (1987). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine and sea water and in association with clams. *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**, 316–319.
- KOIWAI K., TINWONGGER S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2016). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease strain of *Vibrio parahaemolyticus* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **39**, 603–606.

- KONDO H., TINWONGGER S., PROESPRAWONG P., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R. & HIRONO I. (2014). Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00221-14.
- KONDO H., VAN P.T., DANG L.T. & HIRONO I. (2015). Draft genome sequences of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.*, **3**, e00978-15.
- KUMAR V., BELS L.D., COUCK L., BARUAH K., BOSSIER P. & BROECK W.V.D. (2019). PirABVP Toxin Binds to Epithelial Cells of the Digestive Tract and Produce Pathognomonic AHPND Lesions in Germ-Free Brine Shrimp. *Toxins*, **11**, 717.
- 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., LIN S.S., LIGHTNER D.V., WANG A.H., WANG H.C., HOR L.I. & LO C.F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **112**, 10798–10803.
- LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- LO C.-F., LEU J.-H., HO C.-H., CHEN C.-H., PENG S.-E., CHEN Y.-T., CHOU C.-M., YEH P.-Y., HUANG C.-J., CHOU H.-Y., WANG C.-H. & KOU G.-H. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.
- MAI N.H., ARANGUREN L.F.C, CRUZ-FLORES R. & DHAR A.K. (2021). Development of a Recombinase Polymerase Amplification (RPA) assay for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) detection in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mol. Cell. Probes*, **57**, 101710.
- MAI H.N., CRUZ-FLORES R. & DHAR A.K. (2020). Development of an indirect Enzyme Linked Immunoassay (iELISA) using monoclonal antibodies against Photorhabdus insect related toxins, PirA<sup>Vp</sup> and PirB<sup>Vp</sup> released from *Vibrio* spp. *J. Microbiol. Methods*, **176**, 106002.
- MUNTADA-GARRIGA J.M., RODRIGUEZ-JEREZ J.J., LOPEZ-SABATER E.I. & MORA-VENTURA M.T. (1995). Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. *Lett. Appl. Microbiol.*, **20**, 225–227.
- NACA (2014). Acute hepatopancreatic necrosis disease card (updated June 2014). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.
- NUNAN L., LIGHTNER D., PANTOJA C. & GOMEZ-JIMENEZ S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Org.*, **111**, 81–86.
- SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SANGUANRUT P., CHI T.D., MAVICHAK R., PROESPRAWONG 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**, e0126987. doi:10.1371/journal.pone.0126987.
- SOTO-RODRIGUEZ S.A., GOMEZ-GIL B., LOZANO-OLVERA R., BETANCOURT-LOZANO M. & MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1689–1699.
- THOMSON W.K. & THACKER C.L. (1973). Effect of temperature on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters at refrigerator and deep freeze temperatures. *Can. Inst. Food Sci. Tech. J.*, **6**, 156–158.
- TINWONGGER S., PROESPRAWONG P., THAWONSUWAN J., SRIWANAYOS P., KONGKUMNERD J., CHAWEEPCK T., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2014). Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol.*, **49**, 159–164.
- TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014). AHPND/EMS: From the academic science perspective to the production point of view. *Aquaculture Asia Pacific*, **10**, 14–18.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.M., MOHNEY L.L., PANTOJA C.R., 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.*, **105**, 45–55.

WEISBURG W.G., BARNS S.M., PELLETIER D.A. & LANE D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697–703.

YANG Y.T., CHEN I.T., LEE C.T., CHEN C.Y., LIN S.S., HOR L.I., TSENG T.C., HUANG Y.T., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., WANG H.C. & LO C.F. (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00816-14.

\*  
\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OMSA para la enfermedad de la necrosis pancreática aguda (puede consultarse la lista actualizada la página web de la OMSA:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

Para más información sobre la enfermedad de la necrosis pancreática aguda, por favor contactar con los Laboratorios de Referencia de la OMSA.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2017. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2023.