

Escuela Superior Politécnica del Litoral
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Título del trabajo:
Escrutinio molecular de IHHNV y WSSV en postlarvas de
Penaeus vannamei mediante PCR punto final

VIDA-455

Proyecto Integrador

Previo a la obtención del título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Gary Steven Flores Salvatierra

&

Joao Alexander Lema Martínez

Guayaquil - Ecuador

2025

Dedicatoria

Con gran amor dedico el presente trabajo...

A mi familia, mi esposa Linda a mis hijos Maximiliano & Ethan que han sido el motor de este barco, a mi hermano Richard por estar siempre presente, pero especialmente a mis padres, Gary y Tania por su sacrificio, amor y apoyo constante, inculcando en mí, valores y espíritu de superación desde pequeño, lo que me ha permitido alcanzar mis metas, la Fe y confianza que tuvieron en mí se convirtió en mi mayor impulso para seguir superándome.

A mis maestros y mentores que, con compromiso y dedicación, contribuyeron a mi crecimiento y desarrollo profesional, me compartieron su conocimiento con altruismo y por eso siempre los llevo presentes.

A mis amigos y colegas, por los momentos compartidos que hicieron de este trayecto algo inolvidable.

Gary Steven Flores Salvatierra

Dedicatoria

Con mucho amor... dedico este trabajo a mi familia, especialmente a mi madre, Martha Martínez, y a mis hermanos Jorge, Ericka y Liliana, quienes desde el inicio depositaron su fe y confianza en mí, amor que fue el motor de mi resiliencia que me impidió rendirme. A ti, mamá, por cuidar mis sueños y apoyarme siempre, por permitirme estudiar la profesión que hoy me hace sentir orgullo.

A mi compañera de vida, Allisson, por caminar a mi lado, y el apoyo incondicional que me motiva a ser la mejor versión de mí mismo.

A mis amigos, que compartieron conmigo las risas y los retos de esta vida académica.

Finalmente, a mis mentores, por su compromiso y dedicación en mi formación, convirtiéndome en el profesional que hoy soy.

Joao Alexander Lema Martínez

Agradecimientos

Nuestros más sinceros agradecimientos...

En primer lugar, Dios por brindarnos la fortaleza, la salud y la sabiduría necesarias para culminar satisfactoriamente este trabajo

A nuestro tutor de tesis, DVM. Jorge Cuéllar, por su orientación, conocimientos y consejos brindados a lo largo del proyecto.

Al Ph.D Victor Osorio y el Ph.D. Jerry Landívar, su dedicación y paciencia aportaron de manera decisiva al éxito de este.

A la ESPOL y sus docentes por hacer posible el culminar este proceso.

Finalmente, Agradecemos profundamente a nuestras familias y amistades, ya que su respaldo incondicional fue clave para alcanzar esta meta.

A todos ustedes, muchas gracias.

Gary Steven Flores Salvatierra y Joao Alexander Lema Martínez

Declaración Expresa

Nosotros Gary Steven Flores Salvatierra y Joao Alexander Lema Martínez, acordamos y reconocemos que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique a los autores que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 22 de octubre del 2025.

Gary Steven Flores Salvatierra

Joao Alexander Lema

Evaluadores

Dr. Jerry Landívar Z.

Profesor de Materia Integradora

Dr. Jorge Cuéllar-Anjel

Tutor del proyecto integrador

RESUMEN

La sanidad de las postlarvas de *Penaeus vannamei* constituye un factor crítico para la sostenibilidad productiva y la bioseguridad de la camaronicultura, dado su potencial como vía de introducción de patógenos virales hacia las fases de engorde. El presente estudio tuvo como objetivo aplicar un esquema de diagnóstico molecular orientado al control sanitario y la trazabilidad de lotes comerciales, mediante la detección del *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV) y *White Spot Syndrome Virus* (WSSV). Se recolectaron muestras de postlarvas en estadios PL2 a PL12 siguiendo criterios epidemiológicos y principios de bioseguridad, las cuales fueron conservadas en etanol al 95 % y procesadas mediante protocolos estandarizados de extracción de ADN. Para la detección viral se utilizó PCR punto final y Nested-PCR, aplicando un análisis en pools para optimizar la respuesta diagnóstica. Bajo un diseño de muestreo dirigido establecido para una prevalencia de diseño del 5 %, los resultados no evidenciaron la amplificación de IHHNV ni WSSV en ninguna de las muestras analizadas. Esto confirma la ausencia de patógenos detectables y sugiere una prevalencia máxima probable inferior al 5 % en los lotes evaluados. Estos hallazgos validan la utilidad del diagnóstico molecular como herramienta de verificación sanitaria, fundamental para la toma de decisiones, la trazabilidad de la semilla y la mitigación de riesgos epidemiológicos en las granjas camaroneras.

Palabras Clave: *Penaeus vannamei*, diagnóstico molecular, bioseguridad, pooling, trazabilidad sanitaria.

ABSTRACT

*The health status of *Penaeus vannamei* postlarvae constitutes a critical factor for the productive sustainability and biosecurity of shrimp farming, given their potential as a pathway for introducing viral pathogens into grow-out phases. This study aimed to apply a molecular diagnostic scheme oriented towards sanitary control and traceability of commercial batches, through the detection of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) and White Spot Syndrome Virus (WSSV). Postlarvae samples were collected at stages PL2 to PL12 following epidemiological criteria and biosecurity principles; samples were preserved in 95% ethanol and processed using standardized DNA extraction protocols. Viral detection was performed using end-point PCR and Nested-PCR, applying a pooled analysis strategy to optimize diagnostic turnaround time. Under a purposive sampling design established for a 5% design prevalence, results showed no evidence of IHHNV or WSSV amplification in any of the analyzed samples. This confirms the absence of detectable pathogens and suggests a maximum probable prevalence lower than 5% in the evaluated batches. These findings validate the utility of molecular diagnosis as a reliable tool for sanitary verification, which is fundamental for decision-making, seedstock traceability, and the mitigation of epidemiological risks in shrimp farms.*

Keywords: *Penaeus vannamei*, molecular diagnosis, biosecurity, pooling, sanitary traceability.

Índice general

Resumen.....	I
<i>Abstract</i>	II
Índice de Figuras.....	VI
Índice de Tablas	VIII
Capítulo 1.....	1
1.1 Introducción	2
1.2 Descripción del problema	4
1.3 Justificación del estudio	5
1.4 Objetivos	6
1.1.1 Objetivo general.....	6
1.1.2 Objetivos específicos	6
1.5 Marco teórico	6
1.5.1 Importancia sanitaria en la camaronicultura	6
1.5.2 Principales enfermedades virales: WSSV e IHNV	7
1.5.3 Diagnóstico molecular como herramienta de detección temprana	8
1.5.4 Bioseguridad y sostenibilidad productiva.....	9
1.5.5 Conceptos fundamentales de epidemiología.....	9
1.5.5.1 Unidad epidemiológica.	11
1.5.5.2 Ventajas y aplicaciones de métodos epidemiológicos.	11
1.5.5.3 Poblaciones y marco muestral	12
1.5.5.4 Tipos de muestreo y representatividad.	13
1.5.6 Vigilancia epidemiológica y detección de enfermedades en organismos acuáticos	14
Capítulo 2.....	16
2. Metodología	17
2.1 Diseño del estudio.....	17
2.2 Población y muestreo	19
2.2.1 Población objetivo y marco muestral	19
2.2.2 Estrategia de muestreo	19
2.2.3 Tamaño y unidad de la muestra	20

2.3	Recolección, conservación y transporte.....	23
2.4	Infraestructura de análisis molecular	23
2.5	Extracción y purificación de DNA	25
2.5.1	Preparación de la muestra y eliminación de inhibidores	25
2.5.2	Homogeneización y extracción orgánica	26
2.6	Detección molecular de patógenos por PCR punto final	28
2.6.1	Detección de IHHNV (PCR simple).....	30
2.6.2	Detección de WSSV (PCR Anidada).....	30
2.7	Visualización de resultados (Electroforesis).....	31
2.8	Consideraciones éticas y autorizaciones	33
2.9	Procesamiento de datos y análisis estadístico	34
2.9.1	Gestión de los datos	34
2.9.2	Estimación de prevalencia aparente (Por lote).....	34
2.9.3	Estimación de prevalencia individual (Ajuste por Pool)	34
2.10	Criterio de análisis para resultados	35
Capítulo 3		36
3.	Resultados y Análisis	37
3.1	Verificación del desempeño del ensayo.....	37
3.2	Diagnóstico de los lotes comerciales	39
3.3	Análisis epidemiológico y estatus sanitario	40
Capítulo 4		42
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	43
4.1	Conclusiones	44
4.2	Recomendaciones	45
Bibliografía		47

Simbología, abreviaturas y glosario

g	Gramo
mL	Mililitro
L	Litro
°C	Grados Celsius
ppt	Partes por mil
pH	Potencial de Hidrógeno
%	Porcentaje
\$	Dólar americano
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DNA	Ácido desoxirribunocléico
IHHNV	Virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética
WSSV	Virus del Síndrome de las manchas blancas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Pls	Postlarvas
Amplicón	Producto de la amplificación por PCR de un fragmento de DNA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Esquema integral del diseño metodológico: desde la selección del área de estudio hasta la evaluación de los lotes comerciales</i>	18
Figura 2 <i>Proceso de recolección de muestras para análisis basado en bioseguridad</i>	22
Figura 3 <i>Unidad muestral lista para transporte</i>	23
Figura 4 <i>Acondicionamiento de viales con agente fijador en condiciones asépticas</i> ..	24
Figura 5 <i>Segregación y organización de unidades muestrales por laboratorio</i>	25
Figura 6 <i>Eliminación del agente fijador (etanol) previo a la lisis celular</i>	26
Figura 7 <i>Separación de fases tras centrifugación de alta velocidad</i>	27
Figura 8 <i>Recuperación de la fase acuosa conteniendo el material genético</i>	28
Figura 9 <i>Montaje de los ensayos de amplificación por PCR</i>	29
Figura 10 <i>Ejecución de la fase de amplificación térmica</i>	29
Figura 11 <i>Perfil térmico configurado para la detección de IHHNV</i>	30
Figura 12 <i>Conformación de la matriz de gel de agarosa</i>	31
Figura 13 <i>Separación electroforética de amplicones virales</i>	32
Figura 14 <i>Matriz de gel recuperada tras el fraccionamiento electroforético</i>	33
Figura 15 <i>Análisis por PCR simple para la detección de IHHNV en postlarvas de P. vannamei. Carriles: (1-15) Pools de muestras comerciales ordenadas secuencialmente (Lab A: 1-3; Lab B: 4-6; Lab C: 7-9; Lab D: 10-12; Lab E: 13-15); (C+) Control Positivo (DNA plásmido IHHNV); (C-) Control Negativo (Agua grado molecular); (EPM) Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder</i>	38
Figura 16 <i>Análisis por PCR anidada (Nested-PCR) para la detección de WSSV en postlarvas de P. vannamei. Carriles: Pools de muestras comerciales ordenadas secuencialmente (Lab A: 1-3; Lab B: 4-6; Lab C: 7-9; Lab D: 10-12; Lab E: 13-15); (C+)</i>	

Control Positivo (ADN WSSV); (C-) Control Negativo de la segunda reacción; (EPM)

Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder38

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Distribución de estadios postlarvarios y esfuerzo de muestreo por laboratorio.</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 2. Validación de los métodos de diagnóstico molecular empleados frente a los estándares internacionales, adaptado del Manual of Diagnostics Test for Aquatic Animals 2006, OMSA.</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 3. Estatus sanitario de los laboratorios evaluados mediante PCR punto final.</i>	<i>40</i>

Capítulo 1

1.1 Introducción

El camarón blanco (*Penaeus vannamei*) es la especie acuícola de cultivo más importante a nivel mundial y el producto marino de mayor volumen de comercio internacional, con una producción que alcanzó 6.8 millones de toneladas en 2022. Esta actividad, centrada principalmente en Asia y las Américas, depende en gran medida de reproductores domesticados y certificados que aseguren un suministro constante de postlarvas (PLs) de alta calidad sanitaria para los sistemas de cultivo (Cuéllar-Anjel et al., 2010; FAO, 2024).

Sin embargo, el crecimiento de la camaronicultura ha estado acompañado de mortalidades masivas causadas por frecuentes brotes de enfermedades infecciosas, las cuáles se han convertido en el mayor obstáculo para la industria (Flegel, 2012). La infección temprana reduce drásticamente la supervivencia y el rendimiento productivo, y se ha identificado a las PLs como el principal vector de introducción de estos patógenos en las fases de precría y engorde (Cuéllar-Anjel et al., 2010). Entre las enfermedades más relevantes que afectan al camarón en las Américas se incluyen: el síndrome de la mancha blanca (WSSV) y la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV) (R. Pantoja & V. Lightner, 2014).

El impacto económico y en la industria de estos dos virus ha sido devastador. WSSV es considerada la enfermedad más perjudicial en la industria acuícola mundial, cuyas pérdidas económicas acumuladas están estimadas en 21 mil millones de dólares (Millard et al., 2021) y pérdidas anuales que se acercan a una décima parte de la producción global (Stentiford et al., 2012). A pesar de tres décadas de investigación, esta enfermedad aún no se encuentra controlada a nivel de granja (Wu et al., 2017). A este desafío se suman los efectos de IHHNV, un virus que presenta altas prevalencias en reproductores de las Américas —con reportes que oscilan entre el 47% y más del 90% en lotes analizados, y que es conocido por

inducir anomalías en el desarrollo, causando pérdidas económicas estimadas entre el 10% y el 50% (Lightner & Redman, 1998; Motte et al., 2003).

En el contexto comercial actual, donde estos patógenos son endémicos, la industria se ha adaptado mediante el desarrollo de líneas genéticas tolerantes y estrategias de manejo para coexistir con los patógenos, asumiendo que la infección subclínica no siempre resulta en enfermedad (Aranguren et al., 2022; Moss et al., 2012). Esta estrategia de "compra a ciegas" ignora que las postlarvas son el principal vector de introducción de patógenos en granjas de camarón y que la prevalencia de infección puede variar drásticamente entre lotes (Intriago et al., 2024). Una larva infectada no solo reduce el rendimiento del ciclo de engorde, sino que, en caso de ser seleccionada como futuro reproductor, perpetúa la transmisión vertical del patógeno a las siguientes generaciones, cerrando un ciclo vicioso de enfermedad.

La gestión de este riesgo oculto requiere una herramienta diagnóstica que sea rápida, sensible y aplicable a la certificación de lotes. Técnicas tradicionales como la histopatología, si bien son fundamentales para describir patologías, a menudo representan una examinación "post-mortem" que puede tardar de 2 a 5 días en procesarse. Esto las vuelve ineficaces para la toma de decisiones preventivas en la recepción de lotes de postlarvas (Cuéllar-Anjel et al., 2010; Lightner & Redman, 1998)

Por consiguiente, la epidemiología aplicada a la producción no debe limitarse a contar enfermos, sino a garantizar la sanidad del producto final. Protocolos de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad, como la PCR, dejan de ser herramientas meramente científicas para convertirse en instrumentos de certificación de calidad. Estos permiten a los laboratorios transicionar de un modelo de venta por volumen a un modelo de venta por atributos de calidad garantizada.

Por lo tanto, el propósito de este estudio es proponer un esquema de control sanitario basado en PCR punto final que faculte a los laboratorios para entregar lotes de postlarvas

certificados libres de IHHNV y WSSV. Más que una vigilancia pasiva, se propone una herramienta de aseguramiento de calidad que otorgue al productor la certeza de iniciar sus cultivos con animales limpios, protegiendo su inversión y la futura base genética de la industria.

1.2 Descripción del problema

El crecimiento de la camaronicultura mundial ha estado acompañado de mortalidades masivas causadas por frecuentes brotes de enfermedades infecciosas, las cuales representan uno de los principales desafíos para la industria (Flegel, 2012). El Impacto económico de estas enfermedades es significativo; el WSSV es considerado el más perjudicial, con pérdidas acumuladas estimadas en 21 mil millones de dólares (Millard et al., 2021). A este escenario se suma la presencia endémica de IHHNV, un virus que presenta altas prevalencias en las Américas que, pese a la tolerancia desarrollada por las poblaciones de cultivo, puede ocasionar pérdidas de cosecha estimadas entre el 10% y el 50% (Motte et al., 2003). A pesar de estos desafíos, la industria ha logrado mantener su crecimiento mediante la selección de líneas genéticas tolerantes y la implementación de innovaciones tecnológicas (Piedrahita, 2018).

El problema central radica en que, en regiones endémicas como las Américas, la industria se ha adaptado para "coexistir" con estos virus mediante líneas genéticas tolerantes (Aranguren Caro et al., 2022; Moss et al., 2012). Esta percepción de "normalidad" ha llevado a priorizar el manejo en finca sobre la exclusión del patógeno. Sin embargo, esta estrategia ignora una variable de interés crítica; la prevalencia de infección puede variar drásticamente entre lotes de postlarvas, puesto que la infección temprana continúa siendo un factor de riesgo que compromete la supervivencia y la eficiencia productiva (Intriago et al., 2024). Investigaciones recientes evidencian este riesgo, demostrando que camarones infectados

pueden mantener cargas virales detectables sin manifestar signos clínicos, manteniendo así activo el potencial de diseminación silenciosa (Rakhshaninejad et al., 2023).

La gestión de este riesgo oculto requiere una herramienta diagnóstica que sea rápida, sensible y aplicable a la certificación de lotes. Sin embargo, la restricción actual de los métodos de diagnóstico tradicionales constituye un cuello de botella para la toma de decisiones preventivas; en particular, la histopatología, microbiología, o análisis en fresco requieren entre 2 a 5 días para procesar muestras y emitir resultados. Además de esta demora logística, dichas técnicas carecen de sensibilidad suficiente para detectar infecciones latentes de baja carga viral (Cuéllar-Anjel et al., 2010).

Por lo tanto, el problema susceptible de análisis es la ausencia de un protocolo de certificación validado y rápido que permita medir la prevalencia real en postlarvas antes de su despacho. Esta carencia impide a los laboratorios garantizar la inocuidad de su producto y obliga a los productores a asumir el riesgo sanitario desde el día cero del cultivo.

1.3 Justificación del estudio

Ante el escenario actual de coexistencia con patógenos virales en la camaronicultura, surge la necesidad de herramientas prácticas que permitan monitorear y clasificar los lotes de postlarvas según su condición sanitaria. A pesar de que la epidemiología ha demostrado ser vital para el desarrollo de sistemas de alerta temprana en Ecuador, su aplicación rutinaria a nivel de laboratorio sigue siendo limitada (Bayot et al., 2008; Corsin & De Blas, 2010).

Este proyecto busca cerrar dicha brecha operativa conectando la ciencia diagnóstica con la necesidad comercial, mediante la validación de un método de PCR punto final orientado a la certificación de producto. Al establecer un estándar de 'Lote Libre de Patógenos Detectables', la propuesta transforma el diagnóstico técnico en un valor agregado comercial. Esto permite a los centros de larvicultura diferenciar su producto en un mercado

saturado mediante la garantía de calidad, y ofrece al productor la seguridad necesaria para proyectar sus rendimientos, constituyendo el primer paso firme hacia una trazabilidad sanitaria integral en la industria ecuatoriana.

1.4 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Estandarizar un protocolo de vigilancia, muestreo y análisis por PCR punto final para la detección de IHHNV y WSSV en lotes de postlarvas de *Penaeus vannamei*, orientado a la clasificación sanitaria y a la gestión de riesgo previa al despacho.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de WSSV e IHHNV en lotes comerciales de Pls provenientes de 5 laboratorios de larvicultura de camarones *P. vannamei* del Ecuador, utilizando PCR punto final.
- Establecer la prevalencia de WSSV e IHHNV mediante el protocolo de diagnóstico en función del tamaño de muestra analizado, para la interpretación de los resultados bajo el criterio de "Libertad de Enfermedad".
- Diseñar un lineamiento técnico de muestreo y análisis que garantice la representatividad estadística de lotes de postlarvas, que sirva como base para procesos de certificación de calidad y trazabilidad patológica.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Importancia sanitaria en la camaronicultura

La camaronicultura es una de las actividades más dinámicas de la acuicultura mundial y representa un pilar económico en América Latina, especialmente en Ecuador. La expansión

productiva de *P. vannamei* ha traído consigo grandes retos sanitarios, principalmente por la aparición y diseminación de enfermedades virales que pueden comprometer la sostenibilidad del cultivo. En la actualidad, la detección temprana de patógenos es una necesidad prioritaria, ya que las infecciones virales suelen propagarse rápidamente y ocasionar pérdidas masivas. (Cuéllar-Anjel et al., 2010) destacan que el control sanitario de reproductores y larvas, junto con el diagnóstico molecular, son componentes críticos para evitar la diseminación de virus en los sistemas de producción.

1.5.2 Principales enfermedades virales: WSSV e IHHNV

Dos de los virus más relevantes por su impacto económico y sanitario en la camaronicultura, son WSSV e IHHNV. El WSSV pertenece a la familia Nimaviridae y es conocido por causar mortalidades agudas de hasta el 100 % en pocos días, afectando tanto a juveniles como a adultos (Lee et al., 2022). El IHHNV, por su parte, pertenece a la familia Parvoviridae y provoca infecciones crónicas que reducen el crecimiento y generan deformidades en los camarones infectados (Lightner & Redman, 1998) Ambos virus pueden persistir en el ambiente, resistiendo a cambios de temperatura o salinidad, y tienen una amplia gama de hospedadores. (Cox et al., 2023) demostraron que la transmisión del WSSV está influenciada por la densidad poblacional y las condiciones ambientales, lo que facilita la aparición de brotes epidémicos. El IHHNV, aunque menos letal, se mantiene circulando de forma silenciosa en poblaciones reproductoras, generando un riesgo constante de transmisión a las postlarvas, además presenta una característica particular que dificulta su diagnóstico molecular, este virus puede encontrarse como una forma infecciosa activa, asociada a un ciclo lítico, o como secuencias de ADN viral integradas en el genoma del camarón, correspondientes a una forma no infecciosa, esta dualidad limita la interpretación de los resultados obtenidos por PCR, ya que las técnicas moleculares convencionales detectan la

presencia de ADN viral sin diferenciar si corresponde a viriones infecciosos o a ADN integrado. Actualmente, no existen kits comerciales que permitan discriminar ambas formas, por lo que la detección de IHHNV mediante PCR debe interpretarse como evidencia de presencia genética del virus y no necesariamente de infección activa, tal como se reconoce en la literatura especializada (Cuéllar-Anjel et al., 2010).

1.5.3 Diagnóstico molecular como herramienta de detección temprana

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha transformado el diagnóstico de enfermedades en crustáceos, permitiendo identificar patógenos de manera específica y rápida. Cuéllar-Anjel y Morales (2014) la señalan como la técnica de referencia para confirmar la presencia de WSSV e IHHNV en tejidos de camarón. En los laboratorios de diagnóstico, la PCR punto final se emplea para la detección rutinaria, mientras que la nested-PCR ofrece la ventaja de mayor sensibilidad ante la carga del patógeno. El éxito de la detección depende no solo de la sensibilidad de la técnica, sino también de la calidad del muestreo, la conservación del tejido y la correcta estandarización del protocolo. La OMSA (2022) recomienda la aplicación de métodos moleculares validados y controles positivos certificados para asegurar resultados reproducibles y comparables entre laboratorios. La literatura especializada indica que la selección de la técnica diagnóstica debe ajustarse al comportamiento biológico de cada patógeno. En el caso del WSSV, organismos internacionales como la OMSA recomiendan el uso de nested-PCR para aumentar la sensibilidad diagnóstica, especialmente en estadios tempranos o infecciones subclínicas, mientras que para IHHNV la PCR punto final ha demostrado ser suficiente para su detección en programas de vigilancia sanitaria, en consecuencia, el desarrollo de un protocolo no solo permitiría uniformar los criterios de diagnóstico, sino establecer la técnica necesaria para la certificación sanitaria de los lotes de producción.

1.5.4 Bioseguridad y sostenibilidad productiva

El diagnóstico molecular se integra hoy como una herramienta esencial dentro de los programas de bioseguridad acuícola, no solo para confirmar infecciones, sino para prevenirlas. La detección temprana de postlarvas portadoras de WSSV o IHNV permite tomar decisiones sanitarias inmediatas: aislamiento, eliminación o sustitución. Cuéllar-Anjel et al. (2010) señalan que la combinación de monitoreo molecular, selección de reproductores y certificación de origen es la base para mantener la estabilidad productiva y reducir la necesidad de tratamientos químicos o antibióticos. La implementación de un protocolo de detección temprana fortalece la capacidad de respuesta de los laboratorios ecuatorianos, ayuda a mejorar la calidad de las postlarvas y promueve una producción sostenible. En última instancia, estos esfuerzos contribuyen a consolidar una industria camaronera más competitiva y alineada con los estándares internacionales de inocuidad y sanidad acuícola, como lo define el Codex Alimentarius (FAO/OMS) estableciendo estándares sobre higiene, control de contaminantes y buenas prácticas a lo largo de la cadena productiva, aplicables al camarón de cultivo destinado a mercados internacionales.

Desde el punto de vista de calidad y gestión, la norma ISO 22000 (Sistemas de gestión de inocuidad alimentaria) e ISO 9001 (Gestión de calidad) son ampliamente utilizadas por laboratorios y plantas procesadoras para garantizar trazabilidad, control de procesos y mejora continua.

1.5.5 Conceptos fundamentales de epidemiología

De acuerdo con Corsin & De Blas (2010), la *epidemiología* es el estudio de las enfermedades en poblaciones, específicamente de su frecuencia, distribución y determinantes (“causas”). Su enfoque radica en desplazar la atención al individuo enfermo hacia el análisis

de patrones y tendencias en la población a la que pertenece, buscando entender cómo, cuándo, dónde y por qué ocurren dichos eventos a nivel poblacional. Por esta razón, más que una disciplina aislada, la epidemiología puede considerarse un enfoque o forma de pensar aplicable a distintos contextos de salud animal.

Aunque la epidemiología utiliza la estadística como una herramienta central para trabajar con muestras y calcular probabilidades, existe una distinción fundamental: mientras la estadística se ocupa de la probabilidad de que los eventos se deban al azar, la epidemiología se centra en la magnitud y la relevancia biológica de dichos eventos. Esto significa que una asociación puede ser estadísticamente significativa, pero tener poco impacto sanitario, o viceversa.

Dentro de la epidemiología se pueden distinguir dos “tipos”:

- **Epidemiología analítica:** utiliza herramientas estadísticas avanzadas para probar hipótesis y buscar asociaciones causales.
- **Epidemiología descriptiva:** se enfoca en la caracterización de la enfermedad en términos de tiempo, lugar y persona (o animal). Utiliza frecuencias, distribuciones y mapas para describir (por ejemplo, la distribución espacial de brotes por provincia, o la proporción de granjas afectadas en una zona).

En la práctica, la epidemiología integra herramientas estadísticas, pero también elementos de otras disciplinas, como la patología, ensayos inmunológicos, la inmunología, el diagnóstico molecular (como PCR) y la modelación matemática, predecir de manera epidemiológicamente rigurosa, qué ocurriría en escenarios específicos. Asimismo, los métodos epidemiológicos pueden aplicarse al estudio de causas diversas de interés productivo —por ejemplo, ¿por qué algunos estanques producen menos que otros?, o ¿por qué ocurre caparazón blando, asociado a menores precios? En general, el resultado de una investigación

epidemiológica puede ser cualquier evento de importancia para el productor o investigador, siempre que esté claramente definido.

1.5.5.1 Unidad epidemiológica.

Una Unidad Epidemiológica, se define como un grupo de animales que comparten aproximadamente el mismo riesgo de exposición a un agente patógeno dentro de una ubicación delimitada. En acuicultura, esto puede ocurrir porque los organismos acuáticos comparten un ambiente acuático en común (p.ej. camarones en un estanque) o porque las prácticas de manejo hacen probable que un agente patógeno se propague rápidamente entre grupos de animales (p.ej. todos los tanques de un centro de larvicultura) (OMSA, 2019; Scarfe & Palić, 2020).

Una unidad epidemiológica puede ser pequeña —un individual establecimiento o granja donde todos los animales se manejan como una población única ("compartimiento")— o abarcar grandes áreas geográficas (varias granjas, una provincia, una cuenca hidrográfica, o incluso un país). El criterio determinante para definir una unidad epidemiológica es la separación efectiva de otras poblaciones, ya sea mediante barreras físicas o geográficas, que impida la mezcla de animales de otras unidades (Palić et al., 2015). Estos conceptos son fundamentales para el desarrollo e implementación de planes de bioseguridad para prevenir, controlar y erradicar *cualquier* enfermedad, en *cualquier* tipo de operación o establecimiento (Palić & Scarfe, 2019).

1.5.5.2 Ventajas y aplicaciones de métodos epidemiológicos.

El mundo y los sistemas biológicos que lo conforman, son complejos. Existe una multiplicidad de niveles de complejidad que los métodos epidemiológicos (Corsin & De Blas, 2010); éstos pueden abordar: (1) la fisiología individual del huésped y los patógenos o parásitos; (2) las interacciones poblacionales - comportamiento, canibalismo, transmisión de

enfermedades-, que son pobremente comprendidas, especialmente en el contexto de transmisión de enfermedades; (3) la influencia de variables fisicoquímicas del entorno acuático. Los estudios experimentales tradicionales, aunque valiosos, tienden a aislar variables ("reduccionismo"), lo que a veces impide ver el panorama completo.

Esta complejidad se representa frecuentemente mediante un "causal web" (red causal), que muestra los vínculos causales entre diferentes variables. La epidemiología contribuye a manejar esta complejidad mediante un enfoque observacional integral, que luego se profundiza con métodos experimentales. De esta forma, se miden las variables que se consideran importantes en la determinación o causa de la enfermedad, así como aquellas que probablemente afecten la relación entre causas y efectos. El objetivo es identificar relaciones clave que iluminen el proceso de enfermedad y señalen formas potenciales de control.

Al abordar esta complejidad mediante un enfoque observacional, la epidemiología permite analizar las interacciones en el "mundo real" de la producción acuícola. Entre sus principales ventajas y aplicaciones se encuentran:

Identificación de factores de riesgo: calcular el aumento de probabilidad de un evento (ej. enfermedad) ante una exposición específica.

Determinación de patrones espacio - temporales: entender la distribución geográfica y estacional de las patologías.

Evaluación de pruebas diagnósticas: determinar la exactitud (sensibilidad y especificidad) de herramientas como la PCR en condiciones de campo.

1.5.5.3 Poblaciones y marco muestral

Según la literatura basada en (Corsin & De Blas, 2010; De Blas & Muniesa, 2014) , para garantizar la validez del estudio, es necesario distinguir entre los diferentes niveles de poblaciones:

Población objetivo (Universo). Corresponde a la totalidad de individuos que presentan las características de interés en un área y tiempo determinados

Población de estudio (Marco muestral). Es la fracción de la población objetivo a la que se tiene acceso real y de la cual se pueden seleccionar los individuos. Frecuentemente, esta no coincide con la población objetivo debido a limitaciones logísticas o de acceso.

Participantes del estudio. Es el grupo final de individuos de los que realmente se obtiene información válida, excluyendo aquellas muestras degradadas o pérdidas durante el proceso

1.5.5.4 Tipos de muestreo y representatividad.

La representatividad de una muestra es la capacidad de un subconjunto de datos para reflejar fielmente las características de la población total de la que proviene. Según (Corsin & De Blas, 2010), esta representatividad implica que la muestra cumpla dos requerimientos básicos; homogeneidad (distribución similar a la población) y aleatoriedad (igual probabilidad de selección). Existen diversos métodos para seleccionar una muestra en estudios epidemiológicos, clasificados en dos grandes grupos:

A. Muestreo probabilístico (Aleatorio): métodos donde la selección se realiza al azar, permitiendo a la extrapolación estadística a la población total.

- **Muestreo aleatorio simple:** se asigna un número único (consecutivo) a todas las unidades de la población de estudio. Posteriormente, se utiliza un software (o tablas de números aleatorios) para identificar las unidades aleatoriamente
- **Muestreo estratificado:** se divide la población en subgrupos o estratos (ej. Por especie *P. monodon*, *P. vannamei*) y se selecciona una muestra aleatoria dentro de cada estrato para asegurar que todos estén representados proporcionalmente

- **Muestreo sistemático:** se seleccionan unidades a intervalos regulares (ej. Un camarón cada 15 segundos en una línea de proceso), calculados dividiendo el total de la población por el tamaño de muestra deseado
- **Muestreo multi-etápico (Multi-stage):** utilizado cuando la población es muy grande y jerárquica (ej. País → Provincia → Granja → Estanque). Se realizan selecciones aleatorias en varias etapas sucesivas (ej. Selección aleatoria de villas, luego aleatoriamente estanques dentro de esas villas, y finalmente camarones)

B. Muestreo no probabilístico: utilizado cuando no es posible o deseable usar métodos aleatorios, o cuando el objetivo es la detección específica de enfermedades más que la representatividad poblacional

- **Muestreo por conveniencia:** la recolección se hace de manera fortuita o basada en la accesibilidad, intentado aproximar la aleatoriedad, pero sin garantizarla estrictamente
- **Muestro intencional o dirigido (Purposive Sampling):** las muestras se recolectan con un propósito específico en mente, como seleccionar deliberadamente individuos que presentan signos clínicos de enfermedad. Este método sesga la muestra a favor de los animales afectados, lo cual es útil para confirmar presencia de patógenos

1.5.6 Vigilancia epidemiológica y detección de enfermedades en organismos acuáticos

La aplicación de epidemiología en la salud del camarón es relativamente reciente, iniciándose a finales de la década de 1990 con estudios pioneros sobre la identificación de factores de riesgo para la Enfermedad de la Mancha Blanca (WSD por sus siglas en inglés) en

el sudeste asiático, específicamente en Vietnam e India (Corsin, 2001; Corsin et al., 2002).

Dichos esfuerzos iniciales permitieron el desarrollo de herramientas diagnósticas para diferenciar brotes infecciosos de otras causas de mortalidad, y la obtención de un conocimiento más profundo sobre la presencia de enfermedades infecciosas como WSD e indicadores de salud en postlarvas (Corsin et al., 2003; Thakur et al., 2002). Estos avances dieron a lugar hitos importantes, como el desarrollo de Mejores Prácticas de Manejo (BMP) y herramientas de diagnóstico de campo (Padiyar, 2009).

En el hemisferio occidental, la epidemiología también ha demostrado su valor estratégico. Estudios realizados en la región condujeron al desarrollo de sistemas de alerta temprana para epidemias de camarón, específicamente en Ecuador (Bayot et al., 2008). Sin embargo, a pesar de estas evidencias de éxito, la literatura señala que la adopción rutinaria de métodos epidemiológicos sigue siendo una práctica "de nicho" y no se ha integrado completamente en los esfuerzos de gestión sanitaria global, debido en parte a una significativa falta de capacitación que probablemente llevará décadas superar.

En el contexto actual de coexistencia con patógenos endémicos, la epidemiología es fundamental, protocolos de control y certificación sanitaria basados en técnicas diagnósticas precisas para cuantificar la prevalencia de patógenos en lotes de postlarvas representan una aplicación concreta de la epidemiología que permite a productores y laboratorios tomar decisiones informadas sobre bioseguridad y rentabilidad, garantizando la calidad del lote antes de sus despachos.

Capítulo 2

2. METODOLOGÍA

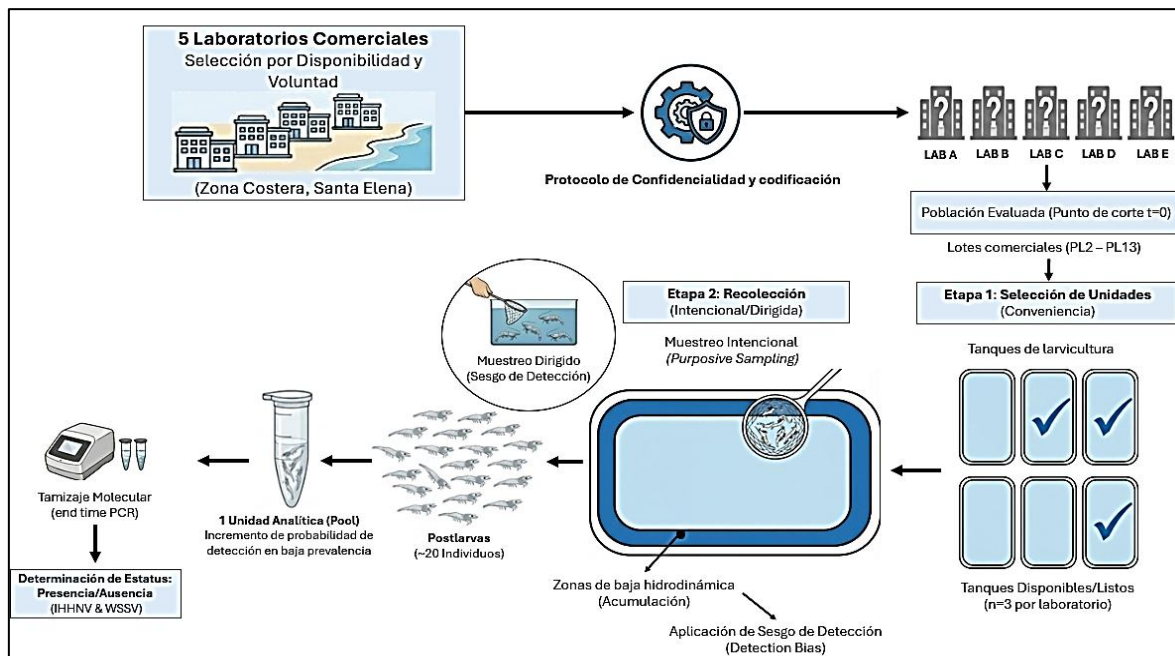
2.1 Diseño del estudio

El presente trabajo se definió como un estudio de Evaluación de la Condición Sanitaria, diseño basado en modelos epidemiológicos como un estudio *observacional de tipo transversal (cross-sectional)*. Este enfoque fue seleccionado por su idoneidad para validar el estatus sanitario de los lotes comerciales de postlarvas en un punto específico del tiempo de producción, permitiendo confirmar la presencia o ausencia de IHHNV y WSSV facilitando la detección temprana de estos patógenos sin requerir un seguimiento longitudinal, no incluyó la implementación continua de un sistema de certificación sanitaria; sin embargo, estableció los fundamentos técnicos y metodológicos para su futura aplicación mediante muestreos periódicos y diagnóstico molecular por PCR.

Debido a las disponibilidades logísticas y presupuestarias inherentes a los estudios de cohorte (alto costo y tiempo de seguimiento), se optó por el diseño transversal, el cual es la alternativa más eficiente para determinar la presencia o ausencia de patógenos en condiciones de campo (Corsin & De Blas, 2010). Dicha aproximación permite obtener una "instantánea" (snapshot) del estatus sanitario de la población muestreada, optimizando los recursos para ejecutar un control sanitario de alta sensibilidad que aporte valor a la a la certificación de origen del lote. El flujo metodológico integral adoptado para esta evaluación se detalla en la **Figura 1**.

Figura 1

Esquema integral del diseño metodológico: desde la selección del área de estudio hasta la evaluación de los lotes comerciales



Nota: el diagrama ilustra el proceso de codificación de laboratorios para garantizar el anonimato, la aplicación del muestreo dirigido en zonas de baja hidrodinámica y la conformación de la unidad analítica (pool) para maximizar la sensibilidad de detección.

La selección de las técnicas moleculares aplicadas respondió a recomendaciones internacionales para el diagnóstico de patógenos virales en camarones peneidos. De acuerdo con el Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals de la OMSA y lo descrito en The Shrimp Book, el virus WSSV puede requerir metodologías de mayor sensibilidad, como la nested-PCR, para su detección en infecciones de baja carga viral, mientras que la PCR punto final es considerada adecuada para la detección de IHHNV. En este contexto, se aplicó PCR punto final para IHHNV y nested-PCR para WSSV, con el fin de maximizar la capacidad diagnóstica del esquema de vigilancia sanitaria implementado.

2.2 Población y muestreo

2.2.1 Población objetivo y marco muestral

La población objetivo (Universo) se definió como las postlarvas de *P. vannamei* en estadios comprendidos entre PL2 y PL13. Rango determinado principalmente debido a la disponibilidad de los lotes activos por parte de los laboratorios voluntarios al momento de la visita.

La población de estudio (marco muestral) estuvo conformada por los lotes de producción activos en 5 Laboratorios comerciales en la zona costera de la provincia de Santa Elena, seleccionados bajo criterios de inclusión por disponibilidad voluntaria. Bajo los protocolos de confidencialidad del servicio de evaluación, se mantuvo el estricto *anonimato* de las instalaciones, codificándolas alfanuméricamente (Laboratorio A, B, C, D, E) para proteger sus datos comerciales (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de estadios postlarvarios y esfuerzo de muestreo por laboratorio.

Código Laboratorio	Identificación de Muestras (Pools)	Estadio Postlarva	Tanques muestreados (N)
Laboratorio A	1-3	PL13	3
Laboratorio B	4-6	PL2	3
Laboratorio C	7-9	PL8	3
Laboratorio D	10-12	PL2	3
Laboratorio E	13-15	PL9	3
Total		-	15

Nota: (N) representa el número de tanques seleccionados, correspondiendo a un pool analítico por tanque.

2.2.2 Estrategia de muestreo

La estrategia de selección de unidades (Muestreo) dada la naturaleza comercial del servicio y las restricciones de acceso, se empleó un diseño de *Muestreo No Probabilístico* en dos etapas:

- A. Selección de unidades productivas (Tanques):** se aplicó un muestreo por conveniencia. En cada laboratorio, se seleccionaron los tanques basándose en la disponibilidad operativa del día de la visita (ej. tanques listos para cosecha o monitoreo). Aunque esta selección no fue aleatoria, permitió evaluar las condiciones reales de los lotes ofertados al mercado.
- B. Recolección de individuos (Muestreo Dirigido):** para la obtención de las muestras biológicas, se utilizó una estrategia de *Muestreo Intencional (Purposive Sampling)*. La recolección se focalizó en las esquinas de los tanques (puntos de menor hidrodinámica). Esta estrategia se diseñó para aprovechar el *Sesgo de Detección (Detection Bias)*. Esta estrategia prioriza la sensibilidad diagnóstica sobre la precisión estadística poblacional; al buscar en zonas de acumulación, se incrementa la probabilidad de capturar organismos letárgicos o débiles, maximizando la sensibilidad del diagnóstico para confirmar la ausencia de patógenos con mayor certeza que un muestreo aleatorio simple.

2.2.3 *Tamaño y unidad de la muestra*

Para determinar el esfuerzo de muestreo, se consideró la naturaleza masiva de las poblaciones de cultivo ($N > 10,000$), donde el tamaño de muestra requerido se vuelve constante independientemente del aumento poblacional (Corsin & De Blas, 2010).

Se recolectaron un total de 15 muestras biológicas (3 muestras independientes por cada uno de los 5 laboratorios). Para optimizar la capacidad de detección y alcanzar la sensibilidad epidemiológica requerida, se definió como unidad muestral el "pool" o agrupamiento de organismos. Cada muestra consistió en un pool de aproximadamente 20 postlarvas, resultando en un análisis efectivo de 60 organismos por laboratorio.

Si bien el agrupamiento de muestras optimiza el esfuerzo diagnóstico, se consideró el potencial 'Efecto de Dilución'. Según los principios de diagnóstico en animales acuáticos, al combinar tejidos en un pool, la carga viral de un único individuo infectado se diluye proporcionalmente a la biomasa de los organismos sanos del grupo. Por tanto, la sensibilidad analítica en este estudio se interpreta a nivel de lote y no individual, reconociendo que infecciones leves o latentes con carga viral inferior al límite analítico de detección del ensayo podrían no ser amplificadas.

No obstante, el tamaño de pool seleccionado ($n=20$) se mantuvo bajo el umbral de seguridad para el diagnóstico en estadios tempranos. Según (Corsin & De Blas, 2010) este tamaño de muestra se seleccionó siguiendo el criterio de límite de agrupamiento, el cual establece que para estadios tempranos (camarones desde P11 hasta P110-12) no se deben exceder los 30 individuos por reacción. Mantener el pool en este rango evita el "Efecto de Dilución", garantizando que la carga viral de un solo individuo infectado no descienda por debajo del umbral de detección al mezclarse con tejido sano. Adicionalmente, esta biomasa controlada previene la saturación de la columna de extracción y reduce la co-purificación de inhibidores (como polisacáridos y pigmentos oculares), cuya concentración excesiva en reacciones con >50 mg de tejido larvario completo podría comprometer la actividad de la polimerasa.

El diseño se fundamentó en el criterio de "Vigilancia para demostrar libertad de enfermedad" (Disease Freedom). Según las tablas de referencia para poblaciones infinitas con un Nivel de Confianza del 95 % (Corsin & De Blas, 2010), el análisis de ~ 60 individuos permite detectar la presencia del patógeno si la prevalencia teórica en el lote es igual o superior al 5 %. Este diseño asegura que, en caso de obtener resultados negativos, se pueda certificar con un 95 % de certeza estadística que la carga de patógenos en los laboratorios evaluados se encuentra por debajo del umbral de detección del 5 %.

Figura 2

Proceso de recolección de muestras para análisis basado en bioseguridad



Nota: se observa el uso de guantes y mascarilla para evitar la contaminación cruzada entre los laboratorios participantes.

Figura 3

Unidad muestral lista para transporte



Nota: cada vial contiene un pool de aproximadamente 30 postlarvas fijadas en etanol al 95%.

2.3 Recolección, conservación y transporte

La recolección se ejecutó en una única jornada logística, cubriendo la ruta integral de los laboratorios participantes en la Península de Santa Elena. Para garantizar la preservación de los tejidos del organismo, los pools de postlarvas fueron fijadas *in situ* inmediatamente tras su captura usando etanol (95%) en volumen excedente (aprox. >1:5) asegurando que el volumen de etanol cubriera totalmente la biomasa.

Este procedimiento aseguró la preservación del material genético a temperatura ambiente durante el transporte hasta el centro de análisis. Se implementaron protocolos estrictos de bioseguridad, incluyendo el cambio de indumentaria y desinfección de materiales entre sitios, para mitigar cualquier riesgo de contaminación cruzada o dispersión de patógenos entre las instalaciones evaluadas.

2.4 Infraestructura de análisis molecular

El procesamiento analítico se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM). Las instalaciones

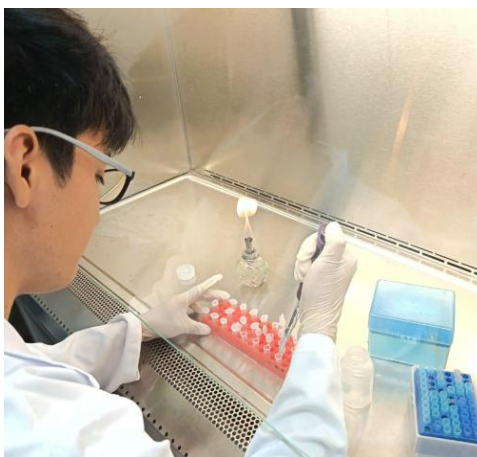
operaron bajo un esquema de flujo unidireccional de trabajo para garantizar la confiabilidad de los resultados y prevenir la contaminación cruzada. El laboratorio contó con áreas físicamente separadas par:

1. **Área limpia (Pre-PCR):** preparación exclusiva de mezclas maestras (*Master Mix*) con reactivos libres de DNA
2. **Área de extracción:** adición del DNA molde de las muestras
3. **Área sucia (Post-PCR):** amplificación y electroforesis, donde se manipulan los productos de reacción

Para la amplificación de los ácidos nucleicos, se utilizó un termociclador Veriti™ de 96 pozos (Applied Biosystems), empleando la tecnología de bloque VeriFlex™ para el control preciso de temperaturas. La visualización se realizó mediante sistemas de electroforesis horizontal en gel de agarosa.

Figura 4

Acondicionamiento de viales con agente fijador en condiciones asépticas



Nota: el procedimiento se realizó en cabina de flujo laminar para garantizar la esterilidad.

Figura 5

Segregación y organización de unidades muestrales por laboratorio



Nota: se verificó la codificación y el número correcto de réplicas por tanque para asegurar la correcta identificación e integridad de cada lote productivo.

2.5 Extracción y purificación de DNA

2.5.1 Preparación de la muestra y eliminación de inhibidores

Previo al proceso de lisis, se aplicó un protocolo de estandarización y lavado. De cada unidad muestral (pool), se transfirió la totalidad del pool (aproximadamente 20 postlarvas) a microtubos estériles de 1.5 mL. Esta estandarización biológica se implementó para priorizar la integridad de la unidad epidemiológica. Al procesar el pool completo de ~20 organismos, se asegura la representatividad del lote sin exceder la capacidad de carga de la columna de extracción, evitando así la co-purificación de inhibidores enzimáticos frecuentemente asociados al procesamiento de biomasa excesivas en estadios larvarios.

A continuación, se procedió a la eliminación del agente fijador (etanol 95%), el cual actúa como inhibidor de la PCR (Schrader et al., 2012). Se añadieron 600 μ L de agua ultrapura (tipo Milli-Q) libre de nucleasas para rehidratar el tejido, seguido de una centrifugación a 10,000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante (etanol diluido) fue descartado cuidadosamente con micropipeta. Este procedimiento de lavado se repitió dos veces consecutivas para garantizar la eliminación total de trazas de alcohol.

Figura 6

Eliminación del agente fijador (etanol) previo a la lisis celular



Nota: se realizó una inspección visual rigurosa durante el descarte del sobrenadante para asegurar la retención total del pellet de tejido en el fondo del vial.

2.5.2 Homogeneización y extracción orgánica

Una vez lavadas las muestras, fueron sometidas a disrupción mecánica utilizando un macerador estéril de plástico dentro del mismo microtubo hasta obtener un homogeneizado tisular uniforme. Para el aislamiento del material genético, se empleó el protocolo estándar de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico.

Para la lisis y extracción, se añadieron 500 μ L de Fenol, seguido de agitación vigorosa (vortex) y centrifugación a 13,000 rpm durante 2 minutos. Se recuperó el sobrenadante (fase acuosa) y se transfirió a un nuevo tubo, añadiendo un volumen equivalente de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1). La mezcla se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 2 minutos para separar las fases y eliminar proteínas.

Figura 7

Separación de fases tras centrifugación de alta velocidad



Nota: se observa la estratificación de los componentes a 13,000 rpm, permitiendo el aislamiento selectivo del material genético en la fase acuosa.

Al sobrenadante recuperado (aprox. 400 μ L) se le adicionaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto (100 %) frío y 200 μ L de Acetato de Amonio para favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos. La mezcla se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 minutos hasta obtener un precipitado visible (pellet). Posteriormente, se realizaron lavados con 300 μ L de etanol al 70 % frío (centrifugación a 10,000 rpm por 1 minuto) para eliminar sales residuales. Finalmente, el etanol remanente se evaporó colocando los tubos abiertos en una estufa a 45 °C durante 1 hora, y el ADN fue resuspendido en agua libre de nucleasas.

Figura 8

Recuperación de la fase acuosa conteniendo el material genético



Nota: se realizó una aspiración selectiva del estrato superior, evitando el contacto con la interfase proteica para garantizar la pureza del ADN.

2.6 Detección molecular de patógenos por PCR punto final

La PCR punto final se seleccionó como herramienta diagnóstica por ser el método estándar validado internacionalmente para la confirmación de ambos patógenos en estadios larvarios tempranos (Cuéllar-Anjel et al., 2010; Lightner & Redman, 1998; OMSA, 2019).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando un termociclador Veriti™ de 96 pozos (Applied Biosystems) con tecnología de bloque VeriFlex™. Las reacciones se prepararon en condiciones de asepsia (zona limpia), manteniendo estrictamente la cadena de frío con almacenamiento de reactivos a -20 °C y manipulación sobre bloques de hielo para preservar la actividad enzimática.

Figura 9

Montaje de los ensayos de amplificación por PCR



Nota: distribución de la mezcla maestra (Master Mix) en condiciones asépticas para garantizar la homogeneidad de los reactivos y evitar falsos positivos.

Figura 10

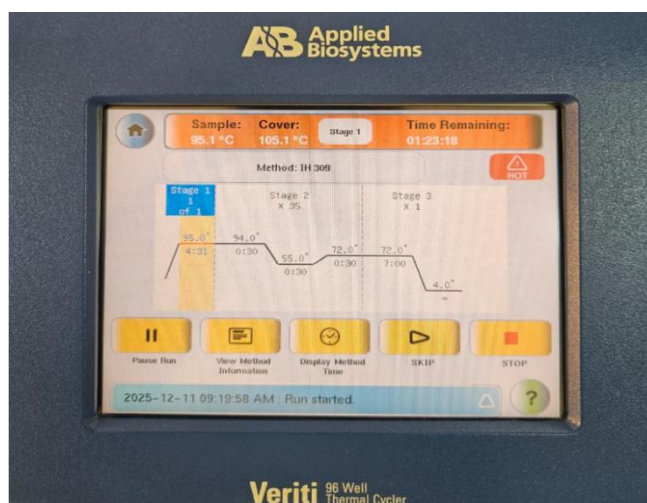
Ejecución de la fase de amplificación térmica



Nota: carga de las muestras en el termociclador Veriti™ para iniciar la replicación exponencial de las secuencias de ADN viral bajo perfiles de temperatura controlados.

Figura 11

Perfil térmico configurado para la detección de IHHNV



Nota: visualización de los parámetros de ciclaje (tiempo y temperatura) ajustados específicamente para los cebadores 309F/309R, con un producto esperado de 309 pb.

2.6.1 Detección de IHHNV (PCR simple)

Para la detección del virus de la *necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa* (IHHNV), se empleó un protocolo de un solo paso (*One-step PCR*) basado en el método descrito por (Tang et al., 2007). Se utilizaron los cebadores específicos 309F y 309R, diseñados para amplificar una región de 309 pares de bases (pb) del genoma viral. La mezcla de reacción (*Master Mix*) estuvo compuesta por Buffer de PCR, Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) como cofactor iónico, dNTPs, polimerasa Taq DNA y agua libre de nucleasas.

2.6.2 Detección de WSSV (PCR Anidada)

Para el virus del *síndrome de la mancha blanca* (WSSV), se aplicó una estrategia de PCR Anidada (Nested-PCR) en dos etapas para maximizar la sensibilidad y especificidad, siguiendo los fundamentos metodológicos de (Lo et al., 1996) y las actualizaciones sobre enfermedades listadas por la OMSA (Lee et al., 2022).

- **Primera etapa:** se utilizaron los cebadores externos IK1 e IK2.

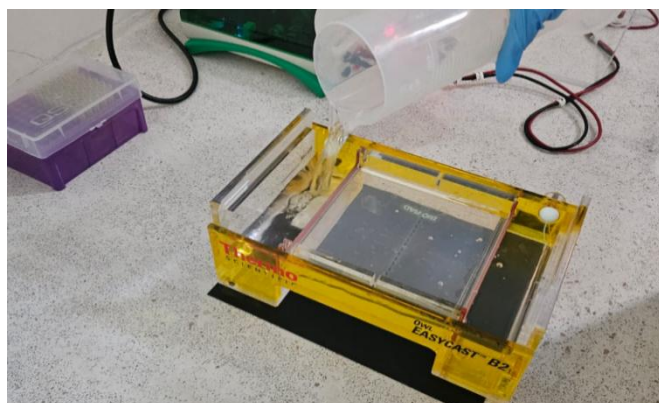
- **Segunda etapa:** se utilizaron los cebadores internos IK3 e IK4 utilizando el producto de la primera reacción como molde. A diferencia del protocolo para IHHNV, la mezcla de reacción para WSSV fue suplementada con Sulfato de Magnesio (MgSO_4) en lugar de cloruro, optimizando la catálisis enzimática para este set de cebadores específicos.

2.7 Visualización de resultados (Electroforesis)

Los productos de la amplificación (amplicones) fueron analizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5 %, preparados con tinción fluorescente tipo SYBR™ para la visualización de ácidos nucleicos. Previo a la carga, los productos de PCR se mezclaron con tampón de carga en una proporción adecuada para garantizar la densidad de la muestra, depositando un volumen final de 8 μL por pocillo.

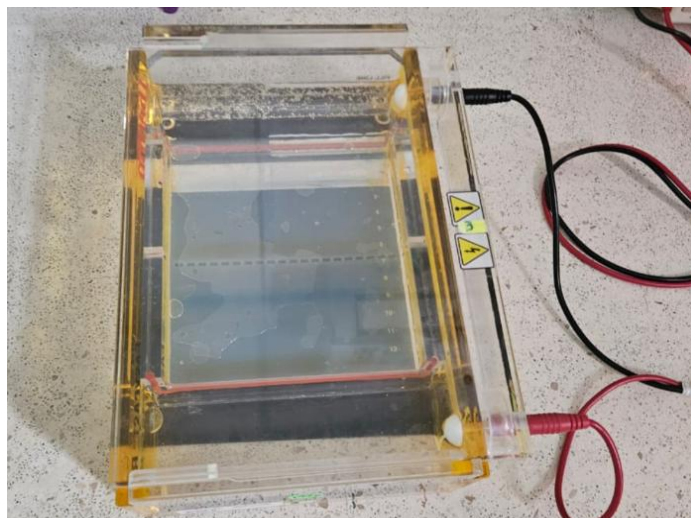
Figura 12

Conformación de la matriz de gel de agarosa



Nota: vertido de la solución al 1.5% en la bandeja de moldeo, concentración optimizada para crear la densidad de poro necesaria para la resolución de los productos de PCR.

Figura 13. Separación de amplicones virales mediante electroforesis.

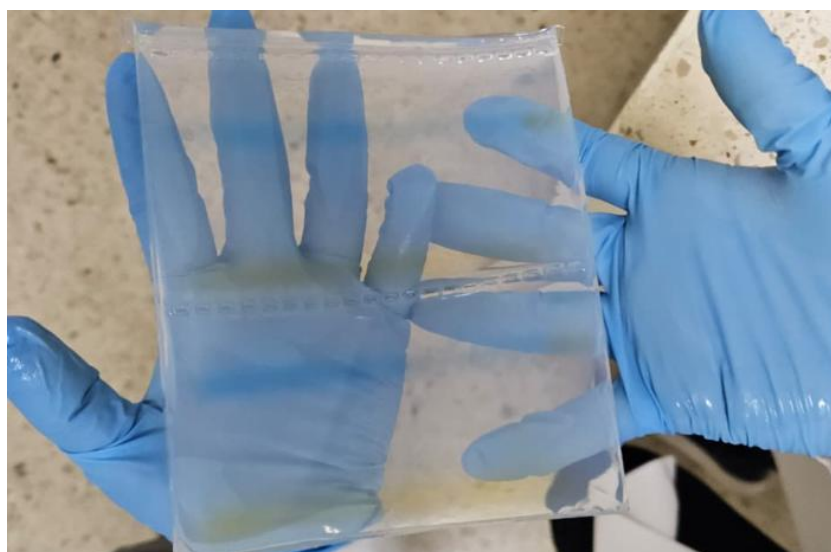


Nota: migración de los fragmentos de ADN bajo un campo eléctrico constante, permitiendo su discriminación por peso molecular para la lectura diagnóstica final.

Para la determinación exacta del tamaño de los fragmentos, se utilizó el marcador de peso molecular Gene Ruler 100 pb DNA Ladder. La validación del diagnóstico se fundamentó en la identificación de los amplicones específicos obtenidos en los controles: una banda de 309 pb para la detección de IHHNV y una banda de 310 pb para WSSV (producto de la PCR anidada). Cada corrida analítica fue validada estrictamente mediante la visualización de dichas bandas en los controles positivos y la ausencia total de amplificación en los controles negativos, asegurando la sensibilidad y especificidad del ensayo antes de procesar las muestras problema.

Figura 14

Matriz de gel de agarosa recuperada tras el fraccionamiento electroforético



Nota: inspección visual de la integridad del gel previa a la fotodocumentación. La ausencia de bandas luminiscentes específicas en los carriles de muestra confirmó el diagnóstico negativo para IHHNV y WSSV.

2.8 Consideraciones éticas y autorizaciones

El estudio contó con la autorización expresa de los encargados de producción de los cinco laboratorios participantes, bajo un acuerdo de confidencialidad que garantiza el anonimato de las instalaciones y el uso de los datos exclusivamente con fines académicos (Codificados de A-E).

Respecto al manejo de los especímenes, el protocolo se alineó con las normas de bienestar animal para invertebrados acuáticos. La fijación directa en etanol al 95 % actuó simultáneamente como método de eutanasia rápida (choque químico) y preservación, minimizando el estrés y evitando manipulaciones innecesarias previas al sacrificio. Asimismo, todas las visitas de campo se ejecutaron cumpliendo estrictamente los cercos de bioseguridad y tiempos de vacío sanitario exigidos por cada instalación para proteger la integridad de sus cultivos.

2.9 Procesamiento de datos y análisis estadístico

2.9.1 Gestión de los datos

Siguiendo las recomendaciones epidemiológicas para el manejo de bases de datos, se generó una matriz estandarizada donde cada observación (unidad muestral) ocupó una única fila. Se establecieron criterios de consistencia terminológica para las variables categóricas (ej. denominación uniforme de patógenos y códigos de laboratorio) para evitar errores de duplicidad o ambigüedad durante el análisis. Los resultados se clasificaron como variable dicotómica: "Positivo" (presencia de banda) o "Negativo" (ausencia de banda).

2.9.2 Estimación de prevalencia aparente (Por lote)

En primera instancia, se calculó la Prevalencia Aparente (AP) como se indica en la ecuación 2.1 referida a las unidades muestrales (pools). Este estimador refleja la frecuencia de detección positiva del test diagnóstico sobre el total de muestras procesadas (n), utilizando la fórmula estándar de (Corsin & De Blas, 2010):

$$AP = \left(\frac{N^{\circ} \text{ de Pools Positivos}}{\text{Total de Pools Analizados (N)}} \right) \times 100 \quad (2.1)$$

2.9.3 Estimación de prevalencia individual (Ajuste por Pool)

Para inferir la prevalencia real en la población de postlarvas a partir de muestras agrupadas (pools) y corregir el sesgo de dilución, se aplicó la siguiente ecuación (2.2) de (Kline et al., 1989):

$$P_{ind} = \left[1 - \left(1 - \frac{\text{pools positivos}}{\text{pools negativos}} \right)^{\frac{1}{\text{tamaño del pool}}} \right] \times 100 \quad (2.2)$$

2.10 Criterio de análisis para resultados

Se estableció a priori que, en el escenario de obtener una ausencia total de detección ($p = 0$), el análisis estadístico no se basaría en comparaciones de grupos (ANOVA/Chi-cuadrado), sino en el cálculo teórico del Valor Predictivo Negativo (NPV). Este enfoque metodológico se seleccionó para validar el estatus sanitario bajo el criterio de "Libertad de Enfermedad" (Disease Freedom), permitiendo inferir la ausencia de infección activa con base en la sensibilidad del diseño muestral.

Capítulo 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Verificación del desempeño del ensayo

La confiabilidad del diagnóstico molecular se estableció mediante la validación funcional de los protocolos de amplificación previo a la evaluación de los lotes comerciales. Como se evidencia en los geles de electroforesis (Figuras 15 y 16), el sistema analítico demostró una sensibilidad y especificidad adecuadas para la detección de los patógenos objetivos. En ambos ensayos, los controles positivos (C+) exhibieron una amplificación nítida y específica de los fragmentos diagnósticos esperados, confirmando la integridad de los reactivos y la eficiencia de la polimerasa.

Para el caso de IHHNV, se obtuvo la banda característica de 309 pb, mientras que para WSSV se recuperó el amplicón de 310 pb derivado de la reacción anidada (nested-PCR). De igual relevancia, la ausencia absoluta de bandas o productos inespecíficos en los controles negativos (C-) y blancos de reacción validó la asepsia del proceso de extracción y la preparación de la mezcla maestra, descartando la ocurrencia de contaminación cruzada o falsos positivos técnicos durante el procesamiento de las muestras.

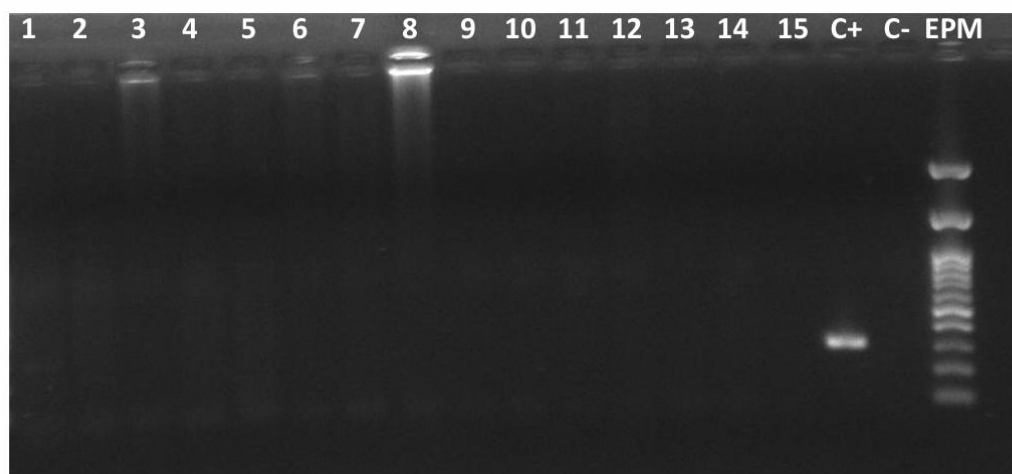
La validez de estos resultados se sustenta en la alta sensibilidad de la técnica de PCR, la cual teóricamente posee la capacidad de detectar copias genómicas virales en una proporción de una entre un millón de células. Sin embargo, esta sensibilidad extrema conlleva riesgos de amplificación inespecífica o transferencia accidental de material genético. En este estudio, la ausencia de bandas en los controles negativos confirma que las medidas de bioseguridad implementadas (flujo unidireccional y limpieza de pipetas) fueron efectivas para prevenir falsos positivos.

Adicionalmente, la selección de los formatos moleculares empleados en este estudio se alinea estrictamente con los estándares de diagnóstico recomendados por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA). Como se detalla en la Tabla 2 (adaptada del *Manual of*

Diagnostic Tests for Aquatic Animals y resumida por (Chen et al., 2010)), la aplicación de PCR Anidada (Nested-PCR) para WSSV no es opcional, sino el método de referencia validado para garantizar la sensibilidad necesaria en la detección de infecciones latentes; mientras que para IHHNV, la PCR convencional se mantiene como el estándar diagnóstico recomendado. Esta concordancia metodológica con la normativa internacional confiere a los resultados del presente ensayo una validez técnica que respalda su uso para la certificación sanitaria de lotes comerciales

Figura 15

Análisis por PCR simple para la detección de IHHNV en postlarvas de P. vannamei. Carriles: (1-15) Pools de muestras comerciales ordenadas secuencialmente (Lab A: 1-3; Lab B: 4-6; Lab C: 7-9; Lab D: 10-12; Lab E: 13-15); (C+) Control Positivo (DNA plásmido IHHNV); (C-) Control Negativo (Agua grado molecular); (EPM) Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder

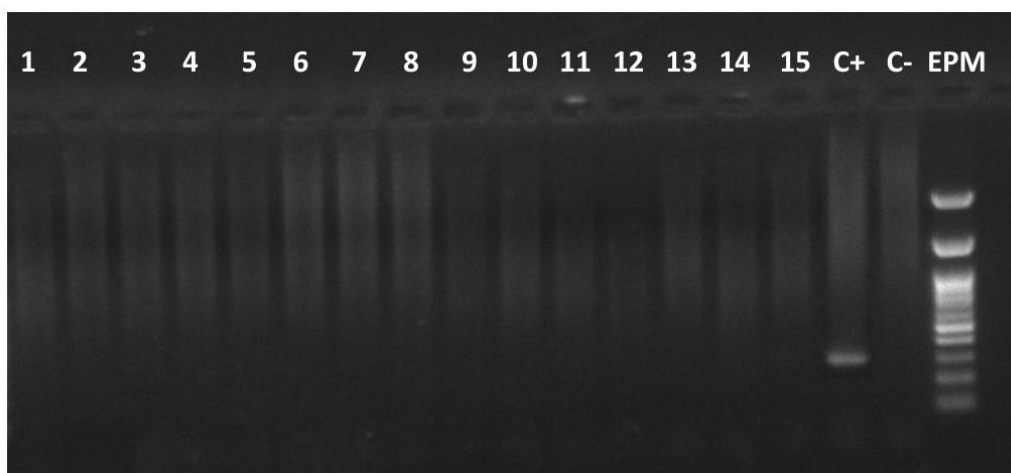


Nota: se observa la banda diagnóstica específica de 309 pb únicamente en el control positivo.

Figura 16

Análisis por PCR anidada (Nested-PCR) para la detección de WSSV en postlarvas de P. vannamei. Carriles: Pools de muestras comerciales ordenadas secuencialmente (Lab A: 1-3; Lab B: 4-6; Lab C:

7-9; Lab D: 10-12; Lab E: 13-15); (C+) Control Positivo (ADN WSSV); (C-) Control Negativo de la segunda reacción; (EPM) Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder



Nota: se observa la banda diagnóstica específica de 310 pb únicamente en el control positivo.

Tabla 2. *Validación de los métodos de diagnóstico molecular empleados frente a los estándares internacionales, adaptado del Manual of Diagnostics Test for Aquatic Animals 2006, OMSA.*

Patógeno Objetivo	Formato Molecular Empleado	Estándar Recomendado (OMSA)	Resultado de la Validación
IHHNV	PCR Convencional (punto final)	PCR / In situ hybridization	Cumple
WSSV	Nested-PCR (Anidada)	Nested-PCR / Real-time PCR	Cumple

3.2 Diagnóstico de los lotes comerciales

Una vez verificada la idoneidad del ensayo, se procedió al tamizaje molecular de las 15 unidades muestrales (pools) recolectadas en los cinco laboratorios de larvicultura de la provincia de Santa Elena. El análisis electroforético reveló una ausencia total de productos de amplificación para los patógenos de interés en todos los lotes evaluados. Como se detalla en los registros visuales (Figuras 15 y 16, carriles 1-15), no se detectaron bandas compatibles

con los marcadores de peso molecular de referencia para IHHNV (309 pb) ni WSSV (310 pb) en ninguna de las muestras procesadas, las cuales abarcaron estadios de desarrollo desde PL2 hasta PL13.

Estos resultados permitieron clasificar el estatus sanitario de todos los lotes como "No Detectable" bajo el límite de sensibilidad del protocolo empleado. La distribución de los resultados negativos por centro de producción se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Estatus sanitario de los laboratorios evaluados mediante PCR punto final.

Código Lab.	Muestras (Carriles)	IHHNV	WSSV	Estatus del Lote
Lab A	1-3	(-) Negativo	(-) Negativo	No Detectado
Lab B	4-6	(-) Negativo	(-) Negativo	No Detectado
Lab C	7-9	(-) Negativo	(-) Negativo	No Detectado
Lab D	10-12	(-) Negativo	(-) Negativo	No Detectado
Lab E	13-15	(-) Negativo	(-) Negativo	No Detectado

3.3 Análisis epidemiológico y estatus sanitario

La consistencia de los resultados negativos (no detectado) en la totalidad de la muestra permitió caracterizar la condición sanitaria de la población bajo estudio mediante estimadores epidemiológicos. Al aplicar la corrección estadística para muestras agrupadas descrita por Kline et al. (1989), no se detectó la presencia de IHHNV ni WSSV en los lotes evaluados. Bajo el diseño muestral aplicado, estos datos son estadísticamente compatibles con una prevalencia poblacional inferior al umbral detectable del 5%.

$$P_{\text{ind}} = \left[1 - \left(1 - \frac{0}{15} \right)^{\frac{1}{20}} \right] \times 100 = 0\%$$

No obstante, es técnico precisar que la estrategia de pooling (agrupación de muestras), si bien optimiza el tamizaje masivo, conlleva el riesgo conocido como "efecto de dilución". Si la carga viral individual es mínima, su dilución en un pool de tejidos sanos podría descender por debajo del límite analítico de detección de la PCR. Por lo tanto, el resultado negativo obtenido certifica la ausencia de infecciones con cargas virales detectables, validando la sanidad del lote a nivel grupal.

Este hallazgo indica que, dentro de los márgenes de confianza del diseño muestral (capacidad para detectar prevalencias $\geq 5\%$), no existe evidencia de circulación viral activa en los lotes analizados al momento del muestreo. Cabe destacar que para certificar una ausencia de patógenos con mayor sensibilidad (prevalencias $<2\%$) y una confianza del 95% en poblaciones grandes, se requeriría el análisis de aproximadamente 150 organismos. Al haberse trabajado con un diseño ajustado a la logística comercial, el presente diagnóstico focaliza su potencia estadística en la detección de prevalencias medias y altas, lo cual es suficiente para la toma de decisiones productivas inmediatas.

Epidemiológicamente, la interpretación de estos datos se fundamenta en el alto Valor Predictivo Negativo (NPV) derivado del muestreo dirigido. Al haber focalizado la recolección en zonas de acumulación biológica (puntos críticos de riesgo), la probabilidad de que la ausencia de detección corresponda a verdaderos negativos es elevada. En consecuencia, se certifica que los lotes evaluados cumplen con el criterio de "Libertad de Enfermedad" (Disease Freedom) para IHNV y WSSV, evidenciando la eficacia de las barreras de bioseguridad y exclusión de patógenos implementadas en dichas instalaciones durante el ciclo productivo evaluado.

Capítulo 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La presente investigación valida la implementación de un protocolo de control y certificación sanitaria como una herramienta de servicio esencial para la gestión del riesgo sanitario en la producción de *P. vannamei*, la principal fortaleza del estudio reside en la aplicación del diagnóstico molecular (PCR punto final nested-PCR) que, debido a su alta especificidad y sensibilidad en comparación con métodos histológicos o visuales, permite detectar infecciones latentes antes de la siembra en piscinas, actuando como un filtro de bioseguridad crítico, con base en los resultados obtenidos, se propone la implementación de un esquema de trazabilidad sanitaria que contemple visitas periódicas a laboratorios de larvicultura, con una frecuencia de una a dos veces por mes a conveniencia del cliente, para la toma de muestras y análisis por PCR. El cumplimiento sostenido de resultados “no detectados” permitiría respaldar la emisión de certificados sanitarios de postlarvas libres de IHNV y WSSV, fortaleciendo la confianza comercial y la bioseguridad en las camaroneras receptoras.

No obstante, se identifica como debilidad la restricción estadística inherente al diseño de muestreo no probabilístico empleado, como señala la literatura especializada, para garantizar una confianza del 95% en la detección de patógenos con baja prevalencia (<2%), se requiere el análisis de aproximadamente 150 individuos por lote, una cifra superior a la empleada en este corte transversal. A pesar de esta limitante, los resultados negativos obtenidos certifican la ausencia de circulación viral activa detectable bajo los parámetros del ensayo, reforzando la garantía de calidad sanitaria de los laboratorios evaluados.

4.1 Conclusiones

1. La aplicación del diagnóstico molecular mediante PCR punto final y nested-PCR permitió determinar la ausencia de material genético de WSSV e IHNV en los lotes comerciales de postlarvas analizados. Este resultado confirma la eficacia de los cercos de bioseguridad y producción implementados en los laboratorios y garantiza al cliente la entrega de semilla libre de patógenos específicos detectables, cumpliendo con el objetivo de minimizar la introducción de enfermedades en las fases subsiguientes de precría y engorde.
2. Si bien no se detectaron positivos, el análisis estadístico basado en el tamaño de muestra y la técnica de pooling (agrupación de muestras) sugiere que la prevalencia de infección en los lotes, de existir, se encuentra por debajo del umbral de detección del protocolo ($<5\%$). Esto implica que la metodología es altamente eficiente para reducir el riesgo de introducción de patógenos objetivo, pero requiere un aumento en el número de muestras para asegurar estadísticamente la ausencia de infecciones de muy baja prevalencia.
3. El desarrollo y aplicación de una metodología de muestreo, conservación en etanol al 95 % y análisis por PCR en postlarvas, siguiendo principios de bioseguridad y epidemiología, demostró ser técnicamente robusta y reproducible para su implementación en laboratorios de larvicultura. La ausencia de falsos positivos en los controles negativos valida la pureza de los reactivos y la eficacia de las medidas implementadas contra la contaminación cruzada, un factor crítico dado la alta sensibilidad de la técnica de PCR.
4. Se concluye que la certificación sanitaria mediante PCR no debe interpretarse solo como un requisito técnico, sino como una herramienta estratégica de deslinde de responsabilidades. Al proveer diagnósticos verificables y

trazables, el laboratorio no solo ofrece un producto de calidad, sino que genera una evidencia objetiva de "debida diligencia". Esto protege la reputación del laboratorio al certificar que la semilla fue despachada libre de patógenos, delimitando que cualquier eventualidad sanitaria posterior en la finca responde a factores externos y no al origen de las postlarvas.

4.2 Recomendaciones

Una vez culminado el desarrollo del proyecto y considerando los alcances y limitaciones del estudio, se plantean las siguientes recomendaciones para trabajos futuros y aplicaciones prácticas:

1. Se recomienda a los centros de larvicultura integrar este protocolo de PCR como un paso obligatorio de “Liberación de Lote” previo al despacho. Esto debe comercializarse como un sello de calidad sanitaria que diferencia al laboratorio de la competencia, justificando un valor añadido sobre la postlarva comercial estándar.
2. Para futuros servicios e investigaciones sobre evaluación del estado sanitario de lotes de producción, se recomienda incrementar el tamaño muestral a un mínimo de 150 postlarvas por tanque (o lote epidemiológico), analizadas en pools de máximo 30 individuos.
3. Al realizar pooling de muestras, existe el riesgo de diluir el ADN de un solo individuo infectado entre muchos sanos. Se recomienda establecer un máximo de 30 larvas por pool de extracción para evitar que la carga viral caiga por debajo del límite de detección molecular de la PCR punto final.
4. Dado el dinamismo patológico del sector, se recomienda ampliar el servicio de diagnóstico para incluir e integrar otros patógenos de relevancia sanitaria en

larvicultura, como los patógenos no virales como *Ecytonucleospora* (*Enterocytozoon*) *hepatopenaei* (EHP) y AHPND, permitiendo ampliar el alcance del esquema de vigilancia y fortalecer los programas de control sanitario en los centros de larvicultura.

Bibliografía

- Aranguren Caro, L. F., Gomez-Sanchez, M. M., Piedrahita, Y., Mai, H. N., Cruz-Flores, R., Alenton, R. R. R., & Dhar, A. K. (2022). Current status of infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in the Peruvian and Ecuadorian shrimp industry. *PLOS ONE*, 17(8), e0272456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272456>
- Bayot, B., Sonnenholzner, S., Ochoa, X., Guerrero, J., Vera, T., Calderón, J., De Blas, I., Del Pilar Cornejo-Grunauer, M., Stern, S., & Ollevier, F. (2008). An online operational alert system for the early detection of shrimp epidemics at the regional level based on real-time production. *Aquaculture*, 277(3-4), 164-173. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.035>
- Chen, S., Mudjekeewis D., S., & A., C. (2010). What will PCR bring to shrimp farming: Contribution, compromise or conflict? En V. Alday-Sanz (Ed.), *The Shrimp Book* (pp. 713-750). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781800629349.0027>
- Corsin, F. (2001). *An epidemiological study of White Spot Disease in the rice-shrimp farming system of Vietnam*. [PhD. Thesis]. University of Liverpool.
- Corsin, F., & De Blas, I. (2010). Shrimp Epidemiology: Applying Population-Based Methods to Shrimp Health Management. En V. Alday-Sanz (Ed.), *The Shrimp Book* (pp. 713-750). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781800629349.0027>
- Corsin, F., Phi, T. T., Phuoc, L. H., Tinh, N. T. N., Hao, N. V., Mohan, C. V., Turnbull, J. F., & Morgan, K. L. (2002). Problems and solutions with the design and execution of an epidemiological study of white spot disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Vietnam. *Preventive Veterinary Medicine*, 53(1-2), 117-132. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(01\)00265-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(01)00265-3)
- Corsin, F., Thakur, P., Padiyar, P., Madhusudhan, M., Turnbull, J., Mohan, C., Hao, N., & Morgan, K. (2003). Relationship between white spot syndrome virus and indicators of quality in *Penaeus monodon* postlarvae in Karnataka, India. *Diseases of Aquatic Organisms*, 54, 97-104. <https://doi.org/10.3354/dao054097>

- Cuéllar-Anjel, J., Corteel, M., Galli, L., Alday-Sanz, V., & W. Hasson, K. (2010). Principal Shrimp Infectious Diseases, Diagnosis and Management. En V. Alday-Sanz (Ed.), *The Shrimp Book* (pp. 517-596). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781800629349.0000>
- De Blas, I., & Muniesa, A. (2014). Vigilancia Epidemiológica en Acuicultura. En V. Morales Q. & J. Cuéllar-Anjel (Eds.), *Guía Técnica—Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos* (2da ed., pp. 309-327). OIRSA.
- FAO. (2024). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024 – La transformación azul en acción*. <https://doi.org/10.4060/cd0683es>
- Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>
- Intriago, P., Medina, A., Cercado, N., Arteaga, K., Montenegro, A., Burgos, M., Espinoza, J., Brock, J. A., McIntosh, R., & Flegel, T. (2024). Passive surveillance for shrimp pathogens in *Penaeus vannamei* submitted from 3 regions of Latin America. *Aquaculture Reports*, 36, 102092. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102092>
- Kline, R. L., Brothers, T. A., Brookmeyer, R., Zeger, S., & Quinn, T. C. (1989). Evaluation of human immunodeficiency virus seroprevalence in population surveys using pooled sera. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(7), 1449-1452. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.7.1449-1452.1989>
- Lee, D., Yu, Y.-B., Choi, J.-H., Jo, A.-H., Hong, S.-M., Kang, J.-C., & Kim, J.-H. (2022). Viral Shrimp Diseases Listed by the OMSA: A Review. *Viruses*, 14(3), 585. <https://doi.org/10.3390/v14030585>
- Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1998). Strategies for the Control of Viral Diseases of Shrimp in the Americas. *Fish Pathology*, 33(4), 165-180. <https://doi.org/10.3147/jsfp.33.165>
- Lo, C., Leu, J., Ho, C., Chen, C., Peng, S., Chen, Y., Chou, C., Yeh, P., Huang, C., Chou, H., Wang, C., & Kou, G. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25, 133-141. <https://doi.org/10.3354/dao025133>

- Millard, R. S., Ellis, R. P., Bateman, K. S., Bickley, L. K., Tyler, C. R., Van Aerle, R., & Santos, E. M. (2021). How do abiotic environmental conditions influence shrimp susceptibility to disease? A critical analysis focussed on White Spot Disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186, 107369. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107369>
- Moss, S. M., Moss, D. R., Arce, S. M., Lightner, D. V., & Lotz, J. M. (2012). The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 247-250. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.013>
- Motte, E., Yugcha, E., Luzardo, J., Castro, F., Leclercq, G., Rodríguez, J., Miranda, P., Borja, O., Serrano, J., Terreros, M., Montalvo, K., Narváez, A., Tenorio, N., Cedeño, V., Mialhe, E., & Boulo, V. (2003). Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 219(1-4), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00631-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00631-2)
- OMSA. (2019). *Aquatic Animal Health Code*. World Organization for Animal Health.
- Padiyar, AP. (2009). *Epidemiology and management of Penaeus monodon farms in Andhra Pradesh, India* [PhD. Thesis]. Deakin University.
- Palić, D., & Scarfe, A. D. (2019). Biosecurity in aquaculture: Practical veterinary approaches for aquatic animal disease prevention, control, and potential eradication. En J. Dewulf & F. Van Immerseel (Eds.), *Biosecurity in animal production and veterinary medicine: From principles to practice* (1.^a ed., pp. 497-523). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781789245684.0497>
- Palić, D., Scarfe, A. D., & Walster, C. I. (2015). A Standardized Approach for Meeting National and International Aquaculture Biosecurity Requirements for Preventing, Controlling, and Eradicating Infectious Diseases. *Journal of Applied Aquaculture*, 27(3), 185-219. <https://doi.org/10.1080/10454438.2015.1084164>
- Piedrahita, Y. (2018, junio 25). Shrimp farming industry in Ecuador, part 1—Responsible Seafood Advocate. *Global Seafood Alliance*. <https://www.globalseafood.org/advocate/shrimp-farming-industry-in-ecuador-part-1/>

- Rakhshaninejad, M., Zheng, L., & Nauwynck, H. (2023). Shrimp (*Penaeus vannamei*) survive white spot syndrome virus infection by behavioral fever. *Scientific Reports*, 13(1), 18034. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45335-5>
- Scarfe, A. D., & Palić, D. (2020). Aquaculture biosecurity: Practical approach to prevent, control, and eradicate diseases. En *Aquaculture Health Management* (pp. 75-116). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813359-0.00003-8>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors—Occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Stentiford, G. D., Neil, D. M., Peeler, E. J., Shields, J. D., Small, H. J., Flegel, T. W., Vlak, J. M., Jones, B., Morado, F., Moss, S., Lotz, J., Bartholomay, L., Behringer, D. C., Hauton, C., & Lightner, D. V. (2012). Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 141-157. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.013>
- Tang, K., Navarro, S., & Lightner, D. (2007). PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 74(2), 165-170. <https://doi.org/10.3354/dao074165>
- Thakur, P., Corsin, F., Turnbull, J., Shankar, K., Hao, N., Padiyar, P., Madhusudhan, M., Morgan, K., & Mohan, C. (2002). Estimation of prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) by polymerase chain reaction in *Penaeus monodon* postlarvae at time of stocking in shrimp farms of Karnataka, India: A population-based study. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49, 235-243. <https://doi.org/10.3354/dao049235>
- Wu, H., Zhang, J., He, Y., Zhou, J., Yan, J., & Jiang, M. (2017). A metabolic study in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* response to white spot syndrome virus. *International Aquatic Research*, 9(3), 195-201. <https://doi.org/10.1007/s40071-017-0167-0>