

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA NECROSIS INFECCIOSA HIPODÉRMICA Y HEMATOPOYÉTICA (IHHNV) EN CAMARONES BLANCOS CULTIVADOS ASINTOMÁTICOS, *Litopenaeus vannamei* (BOONE), EN VENEZUELA.

Detection of the Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) in Asymptomatic Cultured White Shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), in Venezuela.

Mélida Boada¹, Marcos De Donato² y Hectorina Rodulfo²

¹ Lab. Patología de Organismos Acuáticos, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, ² Lab. Genética Molecular, Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Universidad de Oriente. Cumaná 6101, Venezuela. Tlf: (+58-293) 417 5285, Fax: (+58-293) 452 1297. E-mail: marcosdedonato@yahoo.com.

RESUMEN

El Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) es un virus que causa altas mortalidades en *Litopenaeus stylirostris* y el síndrome de la deformidad del rostro (RDS) en *L. vannamei*. Con el fin de determinar la presencia del IHHNV en camarones cultivados asintomáticos, se analizaron muestras de camarones cultivados *L. vannamei* de cinco granjas camaroneras localizadas en el oriente y occidente de Venezuela. Se analizaron un total de 90 muestras por granja, de tres tallas: PL8-PL15, juveniles de 5-6 g y de 12 a 15 g de peso. El ADN total fue extraído de muestras homogeneizadas de pleópodos, mediante el uso de kits comerciales. La detección del IHHNV fue realizado, tanto por hibridación mediante "Dot Blot" como por PCR utilizando los kits de Diagxotics ShrimpProbe y ShrimPCaRe Simplex, respectivamente. Se detectó un total de siete muestras positivas, provenientes de cuatro (B, C, D y E) de las cinco granjas camaroneras estudiadas, variando las prevalencias entre 1,1 y 3,3% por granja. Todas las muestras positivas correspondieron a individuos de 5 a 6 g de peso. La técnica diagnóstica por PCR fue más sensible para la detección del IHHNV que la hibridación por "Dot Blot". La presencia del IHHNV en camarones asintomáticos y a bajos niveles de prevalencia puede implicar que las poblaciones de camarones utilizadas para cultivo en Venezuela son resistentes o en todo caso tolerantes a este virus.

Palabras clave: Virus, *Litopenaeus vannamei*, IHHNV, prevalencia.

ABSTRACT

The Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) is a pathogen that may cause high mortalities in *Litopenaeus stylirostris* and the Runt Deformity Syndrome (RDS) in *L. vannamei*. In order to detect the presence of IHHNV in asymptomatic, cultivated shrimp, it were analyzed shrimp samples of cultivated *L. vannamei* from 5 farms located in the east and west costs of Venezuela. A total of 90 samples per farm were analyzed, using three sizes: PL8-PL15, juveniles of 5-6 g and of 12-15 g of weight. The DNA was extracted from homogenized samples of pleopods, using commercial kits. The detection of IHHNV was carried out by both dot blot hybridization and PCR using the Diagxotics kits ShrimpProbe and ShrimPCaRe Simplex, respectively. A total of 7 positive samples from 4 (B, C, D and E) of the 5 shrimp farms studied were detected. The prevalence in the farms ranged from 1.1 to 3.3%. All positive samples corresponded to individuals of 5 to 6 g of weight. PCR was a more sensitive technique than the dot blot hybridization. The presence of IHHNV in asymptomatic shrimp at low values of prevalence could imply that the shrimp populations used for culture in Venezuela are resistant or at least tolerant to this viral pathogen.

Key words: Virus, *Litopenaeus vannamei*, IHHNV, prevalence.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la industria camaronera latinoamericana en la última década ha estado caracterizado por el reconocimiento de muchas restricciones en la producción, considerán-

dose una de las más importantes, la ocurrencia de enfermedades infecciosas y no infecciosas [10]. La introducción y establecimiento de patógenos han causado enfermedades epizooticas serias y considerables pérdidas económicas a la industria del cultivo del camarón en las Américas [10].

Las enfermedades infecciosas; de etiología viral, predominan en importancia y constituyen una de las mayores preocupaciones, tanto para la industria camaronera como para los gobiernos y ambientalistas. Las enfermedades del camarón se han propagado en los últimos años. Al inicio del año 1988, fueron reportados sólo seis virus capaces de afectar al género *Litopenaeus* (*Penaeus*) [8]. En 1996, aproximadamente 20 enfermedades virales fueron identificadas como patógenas para especies de camarón silvestre o de cultivo [9]; cuatro de los agentes que las causan: virus del síndrome del Taura (TSV), virus de la cabeza amarilla (YHV), virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), son de particular interés en camarones de las Américas [10].

El IHHNV es un virus que causa altas mortalidades en *Litopenaeus stylirostris* y el síndrome de la deformidad del rostro (RDS) en *L. vannamei*, así como infecta a otras poblaciones de peneidos en el Pacífico [1] y de otras regiones [9]. De acuerdo a su morfología y características bioquímicas, el IHHNV pertenece taxonómicamente a la familia Parvoviridae [2], siendo el virus más pequeño (22 nm de diámetro) con cadena simple de ADN que afecta a los camarones peneidos. Su secuencia de 4075 pares de bases lo presenta como uno de los virus de menor tamaño conocido (Número de Acceso el GenBank: NC_002190, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=9634944>). Este virus fue detectado por primera vez en juveniles de *Litopenaeus stylirostris* cultivado en Hawai en 1981 [11], de donde ha sido reportada una alta prevalencia en poblaciones de camarones cultivados de *L. vannamei* sin que se presentaran signos clínicos de la enfermedad [5]. Desde 1981, el virus ha sido detectado en camarones peneidos de todo el continente americano, Oceanía y Asia [9]. En América, el movimiento de reproductores infectados utilizados para la acuicultura ha contribuido en gran forma para su extensa propagación. Este virus afecta al camarón *Litopenaeus stylirostris*, tanto silvestres como de cultivo y es responsable de pérdidas económicas importantes. *L. vannamei* muestra cierta resistencia al virus IHHNV, ya que para esta especie no es letal, aunque la infección genera resultados mediocres en la producción, por la presencia de camarones enanos con deformidades en el rostro [5]. Para Venezuela, Lightner [7] lo reporta como introducido en camarones cultivados *L. vannamei* para el año 1985, sin especificar la región del país.

El IHHNV ha sido observado en infecciones naturales en *Litopenaeus stylirostris*, *L. vannamei*, *L. occidentalis*, *Farfantepenaeus californiensis* [9] y *L. schmitti* [6] e infecciones experimentales en *L. setiferus*, *F. duorarum* y *F. aztecus* [9]. En Estados Unidos, por ejemplo, se ha impuesto la detección del

IHHNV como una medida de erradicación del virus en ese país y con el propósito de desarrollar un programa de cultivo de camarón libre de patógenos [12], por lo que frenar su transmisibilidad es importante a fin de erradicar o controlar este microorganismo.

Debido a que el IHHNV es un patógeno que puede estar presente sin manifestar ningún signo clínico, se planteó el presente estudio para detectar la presencia del virus en individuos de *L. vannamei* cultivados. Además, se quiso comparar dos técnicas de detección molecular para este patógeno, ya que éstas presentan diferencias en su aplicación, costo y sensibilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de *Litopenaeus vannamei* cultivado fueron obtenidas de 5 granjas camaroneras localizadas en el Occidente y Oriente de Venezuela (denominadas granjas A, B, C, D y E), en las cuales se llevan a cabo cultivos semi-intensivos e intensivos en piscinas de 2 a 10 hectáreas, con una densidad de siembra entre 10 a 30 ind/m². Los porcentajes de recambio de agua, normalmente osciló desde el 7 al 15% diario. Los camarones fueron alimentados con dieta comercial que contenía entre 30 a 40% de proteína, suministrada al boleo utilizando esquemas de alimentación ajustados al consumo diario. Se analizó un total de 450 individuos aparentemente sanos, de tres tallas por granja: estadios entre PL8-PL15, juveniles de 5-6 g y de 12 a 15 g. Los camarones fueron obtenidos directamente de diferentes piscinas utilizando redes de pesca y fueron colocados inmediatamente en hielo y luego en hielo seco para su traslado.

El ADN total de los camarones fue extraído de los pleópodos utilizando el kit Extract-N-Amp para tejido (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los pleópodos fueron cortados con hojillas estériles y aproximadamente 10 mg del músculo fueron colocados en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL que contenía 100 µL de solución de extracción y 25 µL de solución de preparación de tejido, homogeneizando la mezcla con un pistilo de plástico desechable. La solución fue incubada a temperatura ambiente por 10 min y luego a 95°C por 3 min. Se agregó 100 µL de solución neutralizante B y se mezcló en un vortex. Con el fin de verificar la cantidad y calidad del ADN extraído, éste fue corrido por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X (100 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, 100 mmol/L ácido bórico), que contenía bromuro de etidio (0,5 µg/mL) como colorante, permitiendo la observación directa del ADN total. Para la corrida se utilizó un sistema de electroforesis de gel Midicell Primo EC330 (New York, EUA) empleando 120 V por 30 min y el ADN fue visualizado utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (LUV).

Para el diagnóstico molecular del virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) en las muestras de camarones fueron utilizadas dos tecnologías con basa-

mentos técnicos distintos. En primer lugar se empleó la técnica de hibridación por "Dot Blot" o de membrana utilizando el kit ShrimpProbe (Diagxotics, Lawrenceville, NJ, EUA) según las especificaciones del fabricante, con ligeras modificaciones. La modificación consistió en utilizar el ADN extraído para colocarlo en la membrana, en vez de utilizar el extracto crudo, con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica. El ADN fue calentado previamente para su desnaturalización y puesto en hielo, mientras se añadía 2 µL de cada muestra que agrupó 5 individuos en cada "spot" de la membrana. Éstas se prepararon por duplicado, ya que se utiliza una membrana para ser hibridado con la sonda y otra sin ella como control negativo. Una vez preparadas las membranas, éstas se incubaron en una estufa a 90°C por 10 min con el fin de fijar el ADN a la membrana, para el posterior procesamiento. La membrana fue puesta en una bolsa de hibridación e incubada en buffer de pre-hibridación para rehidratarla. El buffer fue eliminado y se añadió buffer de hibridación conteniendo la sonda marcada con digoxigenina, complementaria a las secuencias del IHNV, incubando a 65°C por 12 horas, en una incubadora con agitación. Se repitió este paso para la membrana control. En cada bolsa de hibridación (de prueba y control) se incluyó una membrana control que contenía ADN del IHNV.

Las membranas fueron lavadas con buffer de lavado y bloqueo por 5 min con agitación. La sonda fue detectada con la solución que contenía el conjugado Anti-Dig/AP que corresponde a una fosfatasa alcalina que contiene un epítipo que sirve de anticuerpo contra la digoxigenina. Las membranas fueron lavadas con buffer y se agregó la solución reveladora, que contiene un sustrato para la enzima fosfatasa alcalina que se precipita, produciendo una señal donde se encuentra la sonda unida al ADN del virus. Luego se inhibe la acción de la enzima con buffer de parada. Finalmente las membranas fueron comparadas y se realizó su diagnóstico.

La segunda técnica para la detección del IHNV se realizó mediante el uso la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por medio de los oligonucleótidos desarrollados como parte del kit ShrimPCaRe Simplex (Diagxotics, Lawrenceville, NJ, EUA). Para la amplificación se utilizó un volumen final de 50 µL corridos en un termociclador Techne (TC-512). A cada tubo de 0,2 mL se le agregó 5 µL de ADN de muestra, correspondiente a 5 camarones (1 µL por individuo), 5 µL de Buffer de PCR 10X (10 mmol/L Tris-HCl, pH 9,0; 50 mmol/L KCl y 1% Triton® X-100), 0,2 mmol/L de cada nucleótido trifosfato (dNTP), 0,5 µmol/L de cada cebador, 1,5 mmol/L de cloruro de magnesio (MgCl₂), y 1,25 U Taq polimerasa (Promega Corp., Madison, WI, EUA). Además de las muestras a analizar, se utilizó un control negativo (sin ADN) y un control positivo, provisto con el kit, que amplifica el fragmento de 347 pares de bases del virus.

El programa de amplificación utilizado constó de 1 ciclo a 94°C por 5 min, para la desnaturalización inicial; 45 ciclos con un paso a 94°C por 1 min para la desnaturalización; otro a 45°C por 1,5 min para la hibridación de los oligos; y un último

a 72°C por 2,5 min para la extensión de los fragmentos. Se realizó una extensión final a 72°C por 10 min para asegurar la producción de fragmentos completos. Los productos de amplificación fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0,5 µg/mL), observándose en un transluminador LUV. Para la corrida se utilizó un marcador molecular de 100 pb (Promega Corp., Madison, WI, EUA) y el gel se corrió en buffer TBE 1X con 120 V por 45 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis por electroforesis del ADN extraído de las 450 muestras de *Litopenaerus vannamei* cultivado, demostró que poseía buena calidad y cantidad para realizar los protocolos subsiguientes. La técnica de hibridación de membrana o por "Dot Blot" no detectó a ninguna muestra como positiva, a pesar que la membrana con los controles positivos mostraron señales evidentes de que la técnica funcionó adecuadamente (FIG. 1). No se observó ruido de fondo (background) ni en la membrana de prueba ni en la de control (sin la sonda). En cambio, la técnica del PCR resultó ser mucho más sensible, permitiendo detectar el virus en 7 muestras positivas de camarones (grupos de 5 individuos; FIG. 2). Las muestras positivas

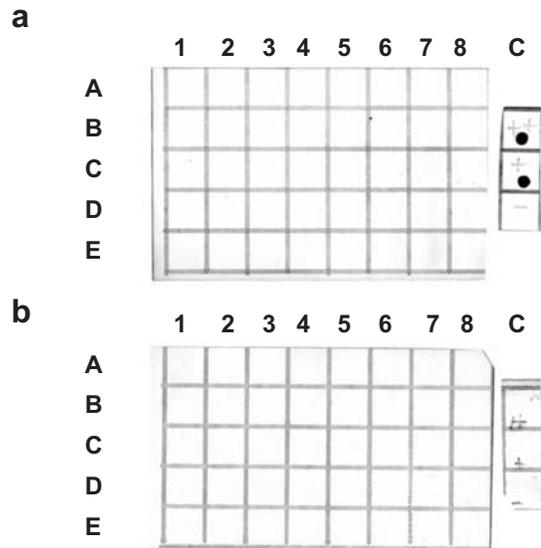


FIGURA 1. HIBRIDACIÓN DE DOT BLOT EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA PARA DETECTAR IHNV EN MUESTRAS DE *L. vannamei*. CADA CUADRO CORRESPONDE A UN GRUPO DE 5 INDIVIDUOS. C: CONTROLES POSITIVOS (++) Y NEGATIVO (-). LAS MEMBRANAS SE HICIERON POR DUPLICADO, UTILIZANDO UNA PARA AGREGAR EL ANTICUERPO CONJUGADO ANTI-DIG/AP (a) Y EL CONTROL EN LA OTRA (b). /DOT BLOT HIBRIDIZATION IN NITROCELLULOSE MEMBRANES FOR THE DETECTION OF IHNV IN SAMPLES OF *L. vannamei*. EACH SQUARE REPRESENTS A GROUP OF 5 INDIVIDUALS. C: POSITIVE (++) AND NEGATIVE (-) CONTROLS. THE MEMBRANES WERE BLOTTED IN DUPLICATES, USING ONE TO ADD THE ANTI-DIG/AP CONJUGATED ANTIBODY (a) AND THE CONTROL IN THE OTHER (b).

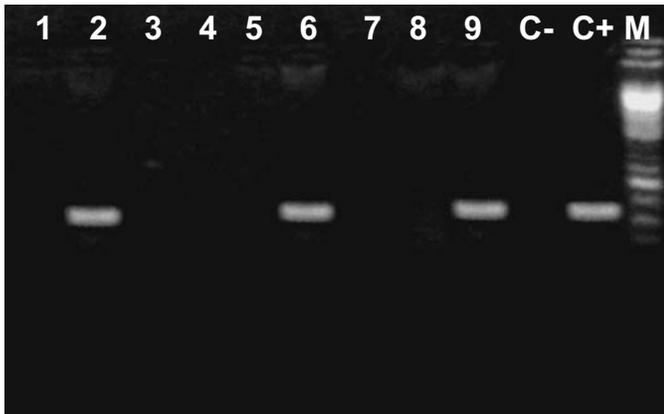


FIGURA 2. GEL DE AGAROSA MOSTRANDO LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DEL IHHNV EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS. CADA LÍNEA CORRESPONDE A UN GRUPO DE 5 EJEMPLARES DE *L. vannamei*, C-: CONTROL NEGATIVO (AGUA), C+: CONTROL POSITIVO (ADN DE IHHNV) Y M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 100 PB. /AGAROSE GEL SHOWING THE AMPLIFIED FRAGMENTS OF IHHNV IN THE STUDIED SAMPLES. EACH LINE REPRESENTS A GROUP OF 5 INDIVIDUALS OF *L. vannamei*, C-: NEGATIVE CONTROL (WATER), C+: POSITIVE CONTROL (DNA OF IHHNV) AND M: MOLECULAR WEIGHT MARKER OF 100 BP.

provenían de 4 (B, C, D y E) de las 5 granjas camaronerías estudiadas. Los grupos de muestras que resultaron positivas fueron repetidas pero de manera individual para determinar el número de individuos positivos por grupo, encontrándose un solo individuo positivo para cada grupo analizado. La prevalencia del IHHNV por granja fue del 1,1% para la granja B, 2,2% para la granja C, 3,3% para la granja D y 2,2% para la granja E. Todas las muestras positivas fueron detectadas en individuos de 5 a 6 g de peso. No se observó diferencia en la localización geográfica de la granja que resultó negativa para IHHNV, ni en las características del cultivo, por lo que no se descarta completamente la ausencia de este virus sin realizar un estudio con un mayor número de muestras.

La técnica de diagnóstico por PCR fue más sensible para la detección del IHHNV que la hibridación por "Dot Blot". Esta última técnica ha sido utilizada ampliamente para la detección de patógenos [3, 16] con buenos resultados, pero con limitada sensibilidad, comparada con el diagnóstico por PCR [13, 14]. Es muy probable que la falta de detección de la técnica de hibridación se deba a niveles bajos de carga viral de la muestra, limitando así el número de moléculas blanco útiles para la detección con esta sonda. El PCR, por su parte, implica la multiplicación de la secuencia blanco, aumentando de manera considerable el límite de detección. Así, la técnica de PCR constituye el método más recomendado de diagnóstico para la detección del IHHNV [15], especialmente en camarones asintomáticos. Sin embargo, no se puede descartar la aplicación de la hibridación por "Dot Blot", ya que es una técnica útil para su aplicación en condiciones donde no se cuenta con el equipamiento necesario para el diagnóstico por PCR, ya

que no requiere de equipos especializados, pero sólo se recomienda su aplicación en la detección de agentes infecciosos presentes en altas densidades y una vez establecida su sensibilidad en las condiciones dadas de diagnóstico.

En las muestras de camarones analizados no se observó ningún signo clínico típico del síndrome de la deformidad del rostro, producto de la infección por IHHNV. El bajo valor de prevalencia del IHHNV en camarones asintomáticos puede estar relacionado con el hecho que en Venezuela, la raza de camarones blancos *Litopenaeus vannamei*, ha sido producto de un proceso de selección artificial para mejorar su crecimiento y supervivencia ante este virus [4]. Anteriormente fue reportada una alta prevalencia en poblaciones de camarones cultivados de *L. vannamei* de Hawái sin que presentaran signos clínicos de la enfermedad [5]. En camarones de la especie *L. stylirostris* ha sido obtenida una raza resistente al IHHNV (Super Shrimp®), que muestra altas supervivencias y total ausencia de signos clínicos de la enfermedad [17].

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La presencia del virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) en camarones blancos asintomáticos, *Litopenaeus vannamei*, a bajos porcentajes de prevalencia puede implicar que las poblaciones de camarones cultivados en Venezuela son resistentes o en todo caso tolerantes a este virus, minimizando su poder patogénico y reduciendo su capacidad de multiplicación e infección. Se recomienda realizar este tipo de estudios a muestras de camarones provenientes de granjas camaronerías de todo el país, así como en camarones silvestres, y en lo posible con un número grande de muestras, con el fin de establecer la distribución actual de este patógeno con mayor precisión.

AGRADECIMIENTO

La investigación fue financiada por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) y el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente a través del proyecto número CI-2-0404-1369/07.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALCIVAR-WARREN, A.; OVERSTREET, R.M.; DHAR, A.K.; ASTROFSKY, K.; CARR, W.H.; SWEENEY, J.; LOTZ, J.M. Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei*: Possible relationship with growth status and metabolic gene expression. *J. Invertebr. Pathol.* 70: 190-197. 1997.
- [2] BONAMI, JR.; TRUMPER, B.; MARY, J.; BERLÍN, M.; LIGHTNER, D.V. Purification and characterization of the

- infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. **J. Gen. Virol.** 71: 2657-2664. 1990.
- [3] CARR, W.H.; SWEENEY, J.N.; NUNAN, L.; LIGHTNER, D.V.; HIRSCH, H.H.; REDDINGTON, J.J. The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. **Aquacult.** 147: 1-8. 1996.
- [4] DE DONATO, M.; MANRIQUE, R.; RAMÍREZ, R.; HOWELL, C. Mass selection and inbreeding effects on a cultivated strain of *Litopenaeus vannamei* in Venezuela. **Aquacult.** 247(1-4): 159-167. 2005.
- [5] KALAGAYAN, H.; GODIN, D.; KANNA, R.; HAGINO, G.; SWEENEY, J.; WYBAN, J.; BROCK, J. IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. **J. World Aquacult. Soc.** 22: 235-243. 1991.
- [6] LAIRA, R.; QUINTANA, Y.; SILVEIRA, R.; GONZÁLEZ, N. Detección del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) en el camarón de cultivo *Litopenaeus schmitti* en Cuba. **III Congreso Interamericano Virtual de Acuicultura (CIVA) 2004**, 19 de noviembre al 19 de diciembre. En línea: <http://www.revistaaquatic.com/civa2004/coms/listado.asp?cod=42>. 12 de junio 2007.
- [7] LIGHTNER, D.V. A review of the diseases of cultured penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. In: **Proc. First. Inst. Conf. Cult.** Penaeid Praws/Shrimp, Iloilo, Philippines, 4-7 December, 1984. SEAFDEC. Aquac. Dep. 79-103 pp. 1985.
- [8] LIGHTNER, D.V. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: Sindermann, C. & D. Lightner (Ed.). **Disease, diagnosis and control in North American Marine Aquaculture**. Series: Developments in Aquaculture and Fisheries Science 17. 432pp. 1988.
- [9] LIGHTNER, D.V. **A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp**. World Aquaculture Society. Baton Rouge. Louisiana. Sec. 3.1. 1-13pp. U.S.A. 1996.
- [10] LIGHTNER, D.V. The viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV & YHD: Current status in the Americas. **Aquaculture Brazil 2003, Book of Abstracts**. World Aquaculture Society. 489pp. 2003.
- [11] LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; BELL, T.A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. **J. Invertebr. Pathol.** 42: 62-70. 1983.
- [12] LOTZ, J.M. Disease control and pathogen status assurance in an SPF-based shrimp aquaculture industry, with particular referente to the United States. In: Flegel, T.W.; MacRae, I.H (Eds). **Diseases in Asian Aquaculture III**. Fish Health Section, Manila, Asian Fisheries Society. 243-254 pp. 1997.
- [13] NUNAN, L.M.; POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V. Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in penaeid shrimp. **Mar. Biotechnol.** 2: 319-328. 2000.
- [14] NUNAN, L.M.; ARCE, S.M.; STAHA, R.J.; LIGHTNER, D.V. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. **J. World Aquacult. Soc.** 32: 330-334. 2001.
- [15] Office International des Epizooties (OIE). Taura Syndrome. In: **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**, 5th Ed., 2006. En línea: http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm. 12 junio 2007.
- [16] OWENS, L.; ANDERSON, I.G.; KENWAY, M.; TROTT, L.; BENZOE, J.A.H. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. **Dis. Aquat. Org.** 14: 219-228. 1992.
- [17] TANG, K.F.J.; DURAND, S.V.; WHITE, B.L.; REDMAN, R.M.; PANTOJA, C.R.; LIGHTNER, D.V. Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. **Aquacult.** 190: 203-210. 2000.