

1998 B – 2003 B

384739295

---

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

---



PROGRAMA DE VIGILANCIA Y MONITOREO DE LA SALUD DE LOS  
CAMARONES, MEDIANTE ANÁLISIS PRESUNTIVOS EN UNA GRANJA DE  
CAMARON BLANCO *Litopenaeus vannamei* EN EL SUR DE SINALOA

---

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

P R E S E N T A

**FABIÁN ALEJANDRO TORRES LÓPEZ**

Las Agujas, Zapopan, Jal., Marzo de 2006

---



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y**  
**Agropecuarias**

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura*  
*en Biología*

168/ C. C. BIOLOGÍA

**C. FABIÁN ALEJANDRO TORRES LÓPEZ**  
**PRESENTE**

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título : **“PROGRAMA DE VIGILANCIA Y MONITOREO DE LA SALUD DE LOS CAMARONES, MEDIANTE ANÁLISIS PRESUNTIVOS EN UNA GRANJA DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* EN EL SUR DE SINALOA”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al **DRA. MARÍA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ** y como asesor / a **MVZ. MIGUEL CARVAJAL SORIA** y el/la M en C. **SELENE MARÍA ABAD ROSALES**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“PIENSA Y TRABAJA”**

Las Agujas, Zapopan., 28 de Abril del 2005

  
**DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

  
**DRA. ANA ISABEL RAMÍREZ QUINTANA**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

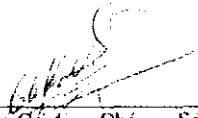
**C.c.p. DRA. MARÍA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ - Director del trabajo**


Dr. Carlos Álvarez Moya  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Carrera de Licenciado de Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

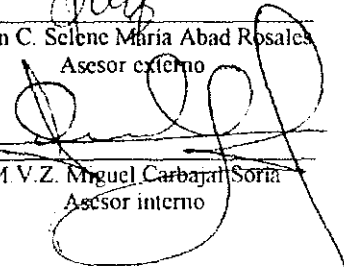
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis, opción redacción de tesis con el título: "Programa de vigilancia y monitoreo de la salud de los camarones, mediante análisis presuntivos en una granja de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en el sur de Sinaloa" que realizó el pasante Fabián Alejandro Torres López con número de código 394730295 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

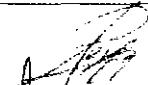
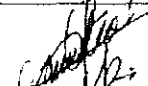
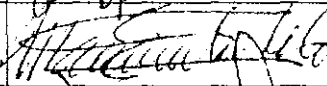

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente.  
 Mazatlan, Sinaloa a 1 de Julio de 2005.

  
 Dra. María Cristina Chávez Sanchez  
 Directora del trabajo

  
 M. en C. Selene María Abad Rosales  
 Asesor externo

  
 M. V. Z. Miguel Carbajal Soria  
 Asesor interno

Sinodales asig. por Comité de Titul.	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
M. en C. Martín Perez Peña		02/Marzo/06
M. en C. Agustín Camacho		02/marzo/06
Biol. Maurilio Soto Espinoza		02-03-06
Supl. M. V. Z. Miguel carbaja Soria		02/03/2006.

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Patología de la granja en estudio y en el Laboratorio de Histopatología de la división de Patología Acuática del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán.

## Agradecimientos

A mis maestras Cristina Chávez y Selene Abad por permitirme crecer en su laboratorio y su apoyo incondicional. A Marcela Ruiz por su apoyo con el análisis multivariado. A la granja en estudio.

Dedicatoria

A mis padres, hermana y hermanos.

**Índice de contenido**

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Vigilancia y monitoreo.....	3
Importancia del camarón blanco ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	5
Taxonomía y Anatomía del camarón.....	6
Principales enfermedades de los camarones pendidos.....	7
Enfermedades causadas por virus.....	7
<i>Baculovirus penaei</i> (BP).....	8
<i>Monodon baculovirus</i> (MBV).....	9
Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV).....	10
Virus del Síndrome de Taura (TSV).....	12
Virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).....	14
Virus de la cabeza amarilla (YHV).....	16
Enfermedades causadas por bacterias.....	18
Hepatopancreatitis necrotizante (NHP).....	18
Vibriosis ( <i>Vibrio</i> sp.).....	19
Bacterias Filamentosas ( <i>Leucothrix mucor</i> ).....	20
Protozoarios parasitos.....	21
Gregarinas ( <i>Nematopsis</i> sp.).....	21
Microsporidios ( <i>Ameson</i> , <i>Teholania</i> y <i>Pleistophora</i> ).....	22
Protozoarios epicomensales.....	23
Enfermedades causadas por Hongos.....	23
Fusariosis.....	23
OBJETIVOS.....	24
Objetivo General.....	24
Objetivos particulares.....	25
HIPOTESIS.....	25
JUSTIFICACION.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Zona de estudio.....	25
Vigilancia y monitoreo.....	26
Prevalencia y grados de severidad.....	27
Selección de los estanques y tamaño de la muestra.....	28
Método de colecta de los organismos y manejo de los mismos durante los análisis.....	29
Análisis en fresco.....	29
Análisis en fresco con tinción rápida.....	30

Análisis histológico.....	30
Análisis de parámetros ambientales.....	32
Análisis estadísticos.....	32
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>ANÁLISIS EN FRESCO.....</b>	<b>33</b>
Calendario de muestreos.....	33
Deformación tubular en hepatopáncreas.....	33
Bacterias.....	35
Epicomensales.....	36
<i>Zoothamnium</i> sp.....	36
<i>Epistylis</i> sp.....	38
<i>Acineta</i> sp.....	40
<i>Ascophrys</i> sp.....	42
<i>Leucothrix mucor</i> .....	44
Gregarinas.....	46
Trofozoítos.....	46
Sicigias.....	48
Gametocistos.....	49
<b>TINCIÓN RÁPIDA.....</b>	<b>51</b>
<b>VARIABLES FISICOQUÍMICAS.....</b>	<b>52</b>
Oxígeno disuelto matutino (5 am).....	52
Oxígeno disuelto vespertino (5 pm).....	53
Temperatura matutina (5 am).....	55
Temperatura vespertina (5 pm).....	56
Salinidad.....	58
<b>ANÁLISIS MULTIVARIADO.....</b>	<b>60</b>
Correlación de los resultados de PCA (Biológicos y Físicoquímicos).....	63
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA.....</b>	<b>63</b>
<b>HISTOPATOLOGÍA.....</b>	<b>65</b>
Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).....	65
Hepatopancreatitis necrotizante (NHP).....	67
Haplosporidios y microsporidios.....	70
Gregarinas.....	70
Trofozoítos.....	71
Sicigias.....	72
Gametocistos.....	72
Epicomensales.....	73
<i>Zoothamnium</i> sp.....	73
<i>Acineta</i> sp.....	74
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>85</b>



LITERATURA CITADA.....	88
ANEXO I	
Formato 1. Hoja de captura para análisis en fresco.....	94
ANEXO II	
Formato 2. Hoja de captura para análisis en fresco con tinción rápida.....	95
ANEXO III	
Formato 3. Hoja de captura para análisis histopatológico.....	96
ANEXO IV	
Esquema 1. Plan de vigilancia mediante análisis en fresco para detectar la presencia de NHP e iniciar el programa de monitoreo.....	97
ANEXO V	
Esquema 2. Plan de vigilancia mediante tinción rápida para detectar WSSV e iniciar el programa de monitoreo.....	98
ANEXO VI	
Prueba hematológica para detectar de manera rápida la presencia de YHV en camarones vivos.....	99

**Índice de figuras.**

Figura 1. Morfología externa de camarón.....	6
Figura 2. Anatomía interna del camarón.....	7
Figura 3. Cuerpos de oclusión tetraédricos de BP.....	9
Figura 4. Cuerpos de oclusión esféricos del MBV dentro de núcleos hipertrofiados.....	10
Figura 5. Prueba rápida con tinción de branquias de un juvenil <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	13
Figura 6. Prueba rápida con tinción de hematoxilina-eosina de Mayer-Bennett del epitelio del estómago con cuerpos de inclusión citoplasmáticos intranucleares basofílicos de WSSV.....	15
Figura 7. Muestra de hemolinfa. Se observan hemocitos con núcleos picnóticos y cariorréxicos. (Tinción de Giemsa).....	17
Figura 8. Análisis en fresco de hepatopáncreas. a) estrangulamiento, b) atrofia de los túbulos con desprendimiento e hipertrofia celular (c).....	18
Figura 9. Muestra de hepatopáncreas en fresco de <i>Litopenaeus vannamei</i> . Se observa un nódulo hemolítico.....	19
Figura 10. Muestra de branquias. Se observan los filamentos no ramificados de <i>Leucothrix mucor</i> .....	20
Figura 11. Muestra de intestino medio donde puede apreciarse las sicigias de gregarinas de 2, 3 y 4 divisiones adheridas al epitelio del lumen del intestino.....	21
Figura 12. Macerado de músculo donde se observan las cápsulas de <i>Ameson Nelson</i> .....	22
Figura 13. Macronidias del género <i>Fusarium</i> .....	24
Figura 14. Ubicación de la granja: Laguna Huizache-Caimanero, Rosario, Sinaloa.....	26
Figura 15. Hepatopáncreas con túbulo estrangulado y túbulo normal.....	35
Figura 16. <i>Zoothamnium</i> sp. en branquias de camarones cultivados.....	38
Figura 17. <i>Epistylis</i> sp. en branquias de camarones cultivados.....	40
Figura 18. <i>Acineta</i> sp. en branquias de camarones.....	42
Figura 19. Muestra de branquias. Se observa el <i>Ascophrys</i> sp. causando melanización en las dendobranquias.....	43

Figura 20. <i>Leucothrix mucor</i> en branquias de camarones.....	45
Figura 21. Gregarina en estadio de trofozoito.....	48
Figura 22. Gregarina en estadio de sicigia en intestino de camarones cultivados.....	49
Figura 23. Gregarinas enquistadas en estadio de gametocisto en ciego posterior de intestino de camarones cultivados.....	51
Figura 24. (a) PCA- ordenación de datos (muestreos) basado en la prevalencia de los agentes patógenos o epibiontes de los seis estanques durante el estudio.....	61
Figura 25. (a) PCA- ordenación de los datos (muestreos) basado en las variables fisicoquímicas de los seis estanques durante el estudio.....	62
Figura 26. Correlación de resultados del PCA (Ejes 1) biológicos y fisicoquímicos.....	63
Figura 27. Virus de la mancha blanca (WSSV) en tejido conectivo del estómago de camarones cultivados.....	66
Figura 28. Hepatopancreatitis necrotizante (NHP) en hepatopáncreas de camarones cultivados.....	67
Figura 29. Microsporidios en músculo de camarones cultivados.....	70
Figura 30. Haplosporidios en hepatopáncreas de camarones cultivados.....	70
Figura 31. Grado severo de infección de gregarinas en intestino de camarones cultivados.....	71
Figura 32. <i>Zoothamnium</i> sp. en branquias de camarones cultivados.....	73
Figura 33. <i>Acineta</i> sp. en branquias de camarones cultivados.....	74

### Índice de graficas.

Grafica 1. Promedios de las prevalencias semanales y grados de severidad de deformación tubular en hepatopáncreas en los seis estanques en estudio a través del tiempo.....	34
Grafica 2. Promedio de la prevalencia total, mensual y grados de severidad de la deformación tubular en el hepatopáncreas de los seis estanques en estudio.....	35
Grafica 3. Promedio de la prevalencia total de epicomensales en los seis estanques en estudio.....	36
Grafica 4. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad semanales de <i>Zoothamnium</i> sp. en los seis estanques en estudio.....	37
Grafica 5. Promedio de la prevalencia total, mensual y grados de severidad de <i>Zoothamnium</i> sp. en branquias de camarones de los seis estanques en estudio.....	37
Grafica 6. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad de <i>Epistylis</i> sp. en los seis estanques en estudio conforme al tiempo.....	39
Grafica 7. Promedio de la prevalencia total y grados de severidad de <i>Epistylis</i> sp. en los seis estanques en estudio.....	39
Grafica 8. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad de <i>Acineta</i> sp. en los seis estanques en estudio a través del tiempo.....	41
Grafica 9. Promedio de la prevalencia total, mensual y grados de severidad de <i>Acineta</i> sp. en branquias de camarones de los seis estanques en estudio.....	41
Grafica 10. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad de <i>Ascophrys</i> sp. en los seis estanques en estudio a través del tiempo.....	42
Grafica 11. Promedio de la prevalencia total, mensual y grados de severidad de <i>Ascophrys</i> sp. en branquias de camarones de los seis estanques en estudio.....	43
Grafica 12. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad de <i>Leucothrix mucor</i> en los seis estanques en estudio durante el tiempo.....	44
Grafica 13. Promedio de la prevalencia total, mensual y grados de severidad de <i>Leucothrix mucor</i> en branquias de camarones de los seis estanques en estudio.....	45
Grafica 14. Promedio de la prevalencia total de gregarinas en diferentes estadios en los seis estanques en estudio.....	46
Grafica 15. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad semanales de trofozoítos en los seis estanques en estudio.....	47
Grafica 16. Promedio de la prevalencia total, mensual y grados de severidad de trofozoítos en intestinos de camarones en los seis estanques en estudio.....	47

Grafica 17. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad semanales de sicigias en los seis estanques en estudio.....	48
Grafica 18. Promedio de la prevalencia total y grados de severidad de sicigias en intestinos de camarones de los seis estanques en estudio.....	49
Grafica 19. Promedio de la prevalencia semanal de gametocistos en los seis estanques en estudio.....	50
Grafica 20. Promedio de la prevalencia total de gametocistos en intestinos de camarones de los seis estanques en estudio.....	50
Grafica 21. Promedio semanal del oxígeno disuelto matutino de los seis estanques en estudio.....	52
Grafica 22. Promedio mensual de oxígeno disuelto matutino en los seis estanques en estudio.....	52
Grafica 23. Promedio total de oxígeno disuelto matutino en los seis estanques en estudio.....	53
Grafica 24. Promedio semanal de oxígeno disuelto vespertino de los seis estanques en estudio.....	53
Grafica 25. Promedio mensual de oxígeno disuelto vespertino en los seis estanques en estudio.....	54
Grafica 26. Promedio total de oxígeno disuelto vespertino en los seis estanques en estudio.....	54
Grafica 27. Promedio semanal de la temperatura matutina de los seis estanques en estudio.....	55
Grafica 28. Promedio mensual de la temperatura matutina en los seis estanques en estudio.....	56
Grafica 29. Promedio total de la temperatura matutina en los seis estanques en estudio.....	56
Grafica 30. Promedio semanal de la temperatura vespertina de los seis estanques en estudio.....	57
Grafica 31. Promedio mensual de la temperatura vespertina en los seis estanques en estudio.....	57
Grafica 32. Promedio total de la temperatura vespertina en los seis estanques en estudio.....	58

Grafica 33. Promedio semanal de salinidad de los seis estanques en estudio.....	59
Grafica 34. Promedio mensual de salinidad en los seis estanques en estudio.....	59
Grafica 35. Promedio total de salinidad en los seis estanques en estudio.....	60
Grafica 36. Prevalencia y grados de severidad de WSSV en estómago de camarones en los estanques afectados.....	67
Grafica 37. Prevalencia y grados de severidad de NHP en hepatopáncreas de camarones de los estanques afectados.....	69
Grafica 38. Prevalencia y grados de severidad de trofozoítos en intestinos de camarones de los estanques en estudio.....	71
Grafica 39. Prevalencia y grados de severidad de sicigias en intestinos de camarones de los estanques en estudio.....	72
Grafica 40. Prevalencia y grados de severidad de gametocistos en ciego posterior de camarones de los estanques en estudio.....	72
Grafica 41. Prevalencia y grado de severidad de <i>Zoothamnium</i> sp. en branquias de camarones de los estanques en estudio.....	73
Grafica 42. Prevalencia y grado de severidad de <i>Acineta</i> sp. en branquias de camarones de los estanques analizados.....	74

**Índice de tablas.**

Tabla 1. Valor numérico cualitativo de grado de severidad a la infección, infestación, enfermedad y síndrome.....	27
Tabla 2. Tamaño de muestra, basado en la prevalencia de la enfermedad que se asume existe en una población.....	28
Tabla 3. Calendario de muestreos.....	33
Tabla 4. Resultados de el análisis de varianza de los valores biológicos entre los estanques.....	64
Tabla 5. Resultados de el análisis de varianza de los valores fisicoquímicos entre los estanques.....	64
Tabla 6. Prevalencia del virus de la mancha blanca observado en muestras de camarón al momento de la cosecha.....	66
Tabla 7. Organismos afectados por la Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP) encontrado en las muestras tomadas durante la cosecha.....	68
Tabla 8. Patologías observadas en el hepatopáncreas de camarones colectados durante la cosecha y analizados por histopatología.....	69

## INTRODUCCIÓN

La acuicultura es considerada como una de las actividades generadoras de alimento más importantes en el mundo y la de mayor crecimiento en los últimos 30 años (Jia *et al.*, 2001). Las especies que se cultivan pueden ser de agua dulce, salobre o marina como peces, moluscos, anfibios, reptiles y crustáceos.

El cultivo de camarón se lleva a cabo en más de 50 países y el crecimiento de esta biotecnología en las últimas 3 décadas se ha incrementado considerablemente, debido al alto valor comercial del producto que se deriva en grandes aportaciones económicas que generan divisas y un mejor nivel de vida en países en vías de desarrollo. En México la acuicultura marina es una industria relativamente nueva cuya principal especie de cultivo es el camarón. Tal es su importancia que actualmente existen en el estado de Sonora 116 granjas con 11,500 has de cultivo; 360 granjas en el estado de Sinaloa con 25,016 has de cultivo y 139 granjas en el estado de Nayarit con un total de 3,500 has de cultivo (ISA, 2003). Aun cuando se han obtenido altos volúmenes de producción obtenidos con la camaronicultura, esta actividad se ha visto afectada en diversas ocasiones por una gran variedad de enfermedades principalmente de tipo infeccioso ocasionadas por virus, bacterias, hongos y parásitos las cuales ocasionan importantes pérdidas en los cultivos, limitando el potencial productivo y la rentabilidad comercial de las empresas (Brock 1992, Lightner 1993, 2003 y Subashinge *et al.*, 2001).

Las enfermedades reportadas en México que han tenido un efecto negativo importante en las dos especies más importantes de camarón (*Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*) son las de tipo viral (Alceste-Oliviero, 2001) e incluyen al virus de la Infección de la Necrosis Hipodérmica y Hematopóyetica (IHHNV, por sus siglas en inglés), virus del Síndrome de Taura (TSV, por sus siglas en inglés), virus de la Mancha Blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) entre otros. También gran número de bacterias, protozoarios parásitos y hongos están implicados como agentes causantes de infecciones y enfermedades generadoras de cuantiosas pérdidas económicas en la industria camaronera (Lightner, 1996).

Se ha determinado que la presencia de las enfermedades es el resultado de una compleja interacción entre hospederos, medioambiente y patógenos (Sniensko 1973; Lightner *et al.*, 1999; 2001). La mayor parte de los organismos considerados patógenos se encuentran en el ambiente acuático de manera natural y también la mayoría de ellos son oportunistas, de tal manera que cuando los camarones se encuentran estresados, el sistema inmune se deprime y los patógenos pueden entrar en acción con poca resistencia del organismo (Snieszko, 1973). Los técnicos encargados de hacer la diagnosis de la enfermedad deben tener el conocimiento adecuado para determinar cuándo un organismo es patógeno y cuándo no, cuándo el huésped está infectado (patógenos presentes en el organismo sin causar daños) y cuándo está enfermo (patologías ocasionadas por los patógenos en el organismo).

En sistemas de cultivo abierto semi-intensivo e intensivo de camarón, clase II de acuerdo a la clasificación de Horowitz y Horowitz, (2003) es prácticamente imposible eliminar en su totalidad a los patógenos mediante medidas de bioseguridad, por lo que los productores deben contar con un programa de vigilancia y monitoreo de la salud de los camarones, con el fin de detectar a tiempo cualquier enfermedad y evitar su



dispersión. Una detección temprana seguida de una acción inmediata puede prevenir un desastre de contaminación, previniendo la dispersión del patógeno en el sistema de cultivo (Wyban *et al.*, 1991 y Subasinghe *et al.*, 2001).

Existen varios métodos y niveles para realizar una diagnosis, el análisis en fresco es una técnica que se utiliza para vigilar y monitorear el estado de salud de los camarones mediante la realización de diagnósticos presuntivos en laboratorio y campo (Lightner *et al.*, 1999; FAO/NACA, 2001). Este tipo de análisis es una herramienta útil y fácil de aplicar para la detección de las enfermedades causadas por bacterias, protozoarios parásitos y hongos más comunes en la camaronicultura (Morales y Chávez 1999, Morales 2004). Para la detección oportuna de los virus, de forma presuntiva, existe una técnica de detección en fresco que se conoce como el método de tinción rápida, el cual permite detectar principalmente el virus de la Mancha Blanca (WSSV, en altos grados de severidad de infección) que desde hace 4 años ha causado cuantiosas pérdidas en los cultivos de camarón en el estado de Sinaloa.

Con este trabajo se pretende mantener bajo vigilancia y monitoreo constante, la salud de los camarones en una granja durante un ciclo de cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) mediante análisis en fresco. El objetivo es detectar a tiempo cualquier enfermedad e informar oportunamente a los encargados de la granja para que lleven a cabo los métodos de diagnóstico confirmativo necesarios y se tomen las medidas para controlar las enfermedades y/o para minimizar o detener su dispersión y llevar a buen fin el ciclo de cultivo.

## ANTECEDENTES

### Vigilancia y monitoreo

Para evitar enfermedades en los organismos bajo cultivo, se deben de implementar medidas de bioseguridad que minimicen los riesgos de introducción y dispersión de patógenos. Las medidas de bioseguridad son “el conjunto de medidas que se toman para mantener la salud de los organismos acuáticos bajo cultivo, del peligro siempre presente de las enfermedades” (Kabata, 1985). Sin embargo, por las características de los sistemas de cultivo abierto, que hace difícil la exclusión total de los patógenos (Horowitz y Horowitz 2003, Lightner *et al.*, 2001), es necesario llevar a cabo dos acciones conocidas como vigilancia y monitoreo de las enfermedades (FAO/NACA 2001, Subasinghe *et al.*, 2001), estas acciones son parte fundamental de las medidas de bioseguridad.

Vigilancia es la observación sistemática y el examen de muestras de poblaciones de animales acuáticos, diseñado para *detectar* la presencia de agentes infecciosos o señales clínicas de enfermedad con el propósito de controlar el brote y/o dispersión de la misma. Mantener una vigilancia sistemática en poblaciones de organismos silvestres o cultivados sirve también para detectar la presencia de nuevos agentes patógenos (patógenos emergentes) que nunca antes se habían observado en dicha población (FAO/NACA, 2001).

Los muestreos de vigilancia se realizan cuando no existe presencia de enfermedades y solamente se pretende conocer el estado de salud de los organismos para determinar en sus primeros estados el brote de cualquier enfermedad o detectar en sus inicios a cualquier patógeno o afectación en el camarón. En realidad no existe una receta para llevar a cabo un programa de vigilancia y monitoreo pues depende de las circunstancias de la granja (sistema de cultivo, tamaño de la granja y de los estanques, antecedentes de enfermedades, situación local etc.), sin embargo se tiene que empezar con una planeación para el programa de vigilancia. Lo ideal sería tomar muestras diarias de todos los estanques, pero además de impráctico, en poco tiempo de tanto muestreo acabaríamos con las poblaciones. Para ello existen métodos epidemiológicos y es, necesario hacer una planificación de muestreos. Esta consiste en seleccionar estanques al azar (Cameron, 2002) y tomar una muestra representativa de organismos al azar (Lightner, 1996) para su análisis, que asegure que de existir un síndrome o enfermedad dentro de los estanques se va detectar en los camarones muestreados. Además de éste muestreo, el sistema de vigilancia pide a los encargados de la sanidad que mantengan una estrecha vigilancia en los demás estanques con el fin detectar señales clínicas de enfermedad e inmediatamente hacer un muestreo para realizar análisis presuntivos y/o confirmativos.

Cuando se ha detectado una enfermedad, el sistema de vigilancia se cambia por el sistema de monitoreo para llevar a cabo el seguimiento de la enfermedad. Seguimiento o Monitoreo es la colecta y el análisis de la información necesaria para detectar cambios en la prevalencia o la intensidad de una infección (FAO/NACA, 2001).

Los muestreos de monitoreo se planifican para determinar el comportamiento de dicho brote (MPEDA/NACA, 2003), es decir la prevalencia (variación en el tiempo del número

de animales afectados en la población), la severidad (intensidad de la infección en cada individuo) y la incidencia (número de nuevos organismos infectados en la población) de la enfermedad en el estanque (Bush *et al.*, 1997). La vigilancia en otros estanques se debe mantener y llevar rigurosamente para detectar nuevos brotes de la enfermedad detectada o de otras enfermedades. Las medidas de bioseguridad en toda la instalación se deben de realizar estrictamente para evitar en lo más posible el paso del patógeno a otros estanques y en su caso poder controlar el patógeno del estanque o estanques problema (Horowitz y Horowitz 2003, Lightner 2003 y Chanratchakool 1999).

Para llevar a cabo de manera efectiva los planes de vigilancia y monitoreo se debe contar con métodos de diagnóstico adecuados (Lightner *et al.*, 2001), para identificar la causa específica de la enfermedad o síndrome. De acuerdo a la FAO, existen 3 niveles de diagnóstico. El Nivel 1 que se lleva a cabo en la granja en la cual el responsable debe conocer el estado normal (saludable) de los camarones, tanto su apariencia como su comportamiento y debe ser capaz de conocer las señales clínicas de las enfermedades. La información sistemática y registros bien llevados de este nivel pueden proporcionar suficiente información para una diagnosis presuntiva con la cual se puedan aplicar ciertas estrategias para evitar la transmisión de enfermedades. Por lo tanto en cada granja el nivel I debe estar bien establecido (FAO/NACA, 2001).

Con el diagnóstico del Nivel I rara vez se puede llegar a una diagnosis definitiva (a menos que el problema sea ya evidente), sin embargo proporciona un punto esencial de inicio para reducir los riesgos de transferencia de patógenos a través del movimiento de los animales. El monitoreo del Nivel I es una parte importante del diagnóstico general ya que proporciona datos claves y esenciales para detectar enfermedades emergentes en sus inicios, por lo tanto esta información debe ser debidamente evaluada en cualquier programa de diagnóstico. Esta información es la mayoría de las veces básica y fundamental para los niveles II y III de diagnóstico (FAO/NACA, 2001).

El Nivel II de diagnóstico se lleva a cabo en laboratorios especializados en los que se tenga el equipo necesario y el personal entrenado en patología acuática para llevar a cabo análisis histológicos, bacteriológicos, parasitológicos y micológicos. Estos laboratorios deben contar con registros precisos de diagnóstico, protocolos para preservación y almacenamiento de muestras y especímenes. Acceso a manuales y guías para el diagnóstico de las enfermedades, contacto con nivel I y laboratorios y especialistas del nivel III (FAO/NACA, 2001).

El Nivel III son laboratorios especializados con equipo sofisticado y personal entrenado para llevar a cabo técnicas de microscopía electrónica, moleculares e inmunología. Cuentan con los protocolos para la preservación de las muestras para consulta y validación, contacto con laboratorios de referencia, accesos a la literatura científica, manuales y guías para el diagnóstico de enfermedades y contacto con los niveles I y II (FAO/NACA, 2001).

Sin embargo, los avances de la tecnología están haciendo posible el llevar a cabo técnicas de diagnóstico de nivel III en las granjas, mediante la aplicación de nuevos kits, fáciles y sencillos de realizar. Desafortunadamente, a la fecha no están disponibles todavía en todas las granjas por falta de recursos económicos o ausencia de conocimientos debido que en el momento de la escritura de esta tesis, se está iniciando

en uso estos kits. Cuando estas herramientas se utilicen más ampliamente y sean más accesibles, serán muy útiles pues el diagnóstico será más eficiente y rápido.

Un problema que se les ha presentado a los productores de camarón, es que las metodologías para llevar a cabo la vigilancia y el monitoreo no están bien definidas y los camaronicultores se enfrentan a la problemática de elaborar su programa sin los criterios adecuados para establecerlos. En la camaronicultura, el sistema de cultivo, el tamaño de las granjas y de los estanques, el manejo de las granjas y los recursos económicos disponibles difieren considerablemente, de tal manera que los técnicos de la granja se enfrentan a diversas preguntas tales como: a) ¿cuál es el mejor sistema de vigilancia y monitoreo para mi granja?; b) ¿con que criterios elaboro el programa?; c) ¿cuántos estanques debo seleccionar para que los resultados sean representativos?; d) ¿cuál es el tamaño de muestra que debo tomar para que la vigilancia y el monitoreo sea representativo de mi población?; e) ¿cuál es la frecuencia de muestreo?; f) ¿cuando debo enviar muestras para análisis confirmativo de nivel II y III?; g) ¿cuándo debo cambiar el programa de vigilancia a monitoreo?; h) ¿que tan capacitado debe estar el personal?; i) ¿realmente el diagnóstico de nivel I es importante?.

Dado que el brote de una enfermedad puede surgir en cualquier estanque, un programa de vigilancia para conocer el estado de salud de los organismos requiere que el patólogo a cargo, vigile diariamente todos los estanques. Este es un trabajo diario en colaboración estrecha con el resto del personal (alimentadores, parametristas, encargados de calidad de agua, personal de apoyo para limpieza etc.) y se basa en que todo el personal que tiene contacto con los organismos conozcan las señales básicas externas de salud y de enfermedad con el fin de detectar en sus inicios un problema y así se lo manifiesten al encargado de la salud en la granja para su verificación. Una vez detectada una señal de enfermedad en cualquier estanque, se deben realizar muestreos para determinar mediante técnicas de diagnóstico presuntivo dicha posibilidad y en su caso enviar muestras para confirmar en los niveles II y III de diagnóstico. Además de la observación diaria del estado de salud de los camarones en todos los estanques, se debe realizar un número adecuado de muestreos al azar en estanques representativos, seleccionados al azar para analizar mediante análisis en fresco y/o tinción rápida si no hay un peligro de brote de enfermedades. Un tercer punto importante es que el patólogo debe conocer los parámetros de calidad de agua de los estanques y los datos de alimentación con el fin de estar alerta de posibles factores estresantes y poner más énfasis en la vigilancia y/o monitoreo.

### **Importancia del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)**

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es actualmente la especie más cultivada en las granjas camaroneras del continente Americano (Brock, 1992). El camarón blanco se encuentra ampliamente distribuido de manera natural en las costas del Pacífico desde México hasta Perú (Wyban *et al.*, 1991). Esta especie tiene preferencia por aguas estuarinas cuando es postlarva hasta juvenil y por las aguas marinas cuando es adulto (Martínez, 1999). Esta especie se está cultivando comercialmente en Ecuador, Colombia, México, Panamá, Estados Unidos y otros países americanos (Alceste-Oliviero, 2001). Algunas ventajas importantes de cultivar esta especie es su relativa facilidad de cultivo (Wyban *et al.*, 1991) y alto precio en el mercado, principalmente el

de exportación (Martínez, 1999). Tan importantes han sido estos dos últimos aspectos que actualmente ya se cultiva esta especie en diversos países de Asia.

### Taxonomía y Anatomía del camarón

*Litopenaeus vannamei* es un crustáceo decápodo miembro de la familia Penaeidae. Esta especie tiene un rostro dentado con dos dientes debajo y de ocho a nueve dientes arriba del rostro. *L. vannamei* pertenece al subgénero *Litopenaeus* puesto que las hembras tienen el télico "abierto", sin receptáculo seminal (Wyban *et al.*, 1991, Pérez *et al.*, 1997). A este grupo pertenecen algunas especies americanas de importancia comercial, tales como: *Litopenaeus stylirostris* y *L. setiferus*.

El cuerpo de los camarones está formado por un cefalotórax y un abdomen. Externamente el cefalotórax está compuesto por el rostrum, ojos, caparazón, antenas, anténulas y pereiópodos, además de poseer las branquias. En el abdomen se localizan los pleópodos, el telson, los urópodos y los seis segmentos abdominales compuestos de tejido muscular (Figura 1).

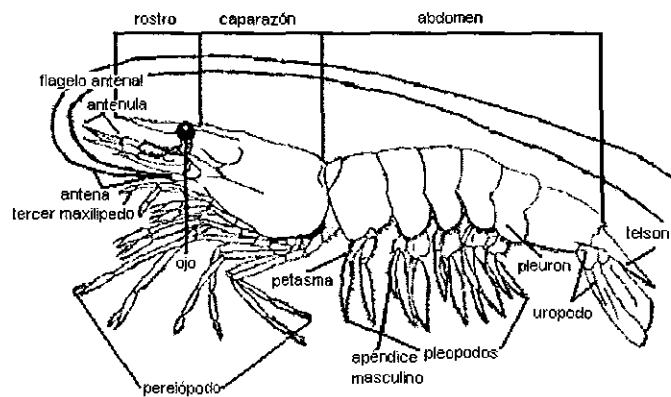


Figura 1. Morfología externa de camarón.

Internamente el cefalotórax contiene la mayor parte de los órganos vitales de estos organismos, ya que en este se localiza el hepatopáncreas, órgano linfoide, corazón, glándula antenal, el cerebro y la parte anterior del sistema digestivo. En el abdomen solo se localiza la parte posterior del cordón nervioso y el intestino medio y posterior además de la mayor parte de los paquetes musculares (Figura 2).

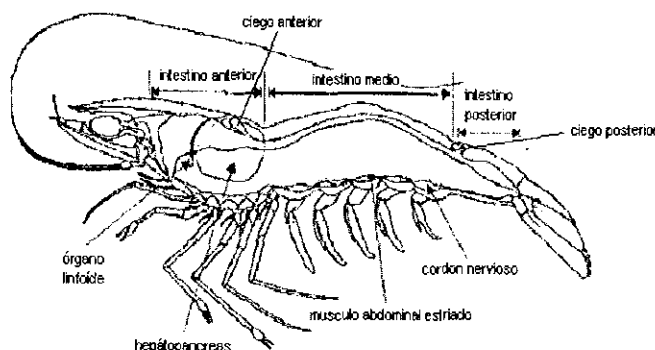


Figura 2. Anatomía interna del camarón.

Dentro de las funciones principales de sus órganos y tejidos destacan el hepatopáncreas, encargado de la distribución, absorción y almacén de nutrientes. En este órgano se aprecian principalmente enfermedades de tipo bacteriano, toxicológico, nutricional y viral. El sistema digestivo de este organismo permite la toma, masticación y almacén temporal del alimento. Las enfermedades más comunes en este importante sistema son principalmente las de tipo viral, bacteriano y las causadas por parásitos. Las branquias también juegan un papel importante en la respiración, excreción, osmoregulación y fagocitosis. Sin embargo este órgano vital puede ser afectado por la presencia de virus, bacterias, hongos y epicomensales. La presencia del exoesqueleto es una característica propia de los crustáceos ya que permite dar soporte y protección en los órganos y tejidos. Igualmente puede resultar afectado por bacterias, hongos, epicomensales y virus.

### Principales enfermedades de los camarones peneidos.

Las enfermedades son causantes de severas mortalidades en el camarón (Johnson, 1990), siendo el mayor obstáculo en la producción camaronícola mundial (MPEDA/NACA, 2003). Se ha determinado que la presencia de las enfermedades son el resultado de una compleja interacción entre hospederos, medioambiente y patógenos (Lightner *et al.*, 2001). El manejo de las condiciones ambientales en un sistema de cultivo como en la camaronicultura es un factor determinante de la presencia de una enfermedad (Couch, 1978 y Lightner, 1993). En términos de impacto económico, las enfermedades más importantes que afectan el cultivo de camarones peneidos en Asia, la región Indo-Pacífica y América son de origen infeccioso (Lightner *et al.*, 2001). Los camarones peneidos son propensos a enfermedades causadas por representantes de casi todos los grupos de agentes infecciosos conocidos, como los virus, rickettsias, bacterias Gram negativas y positivas, hongos y protozoarios (Lightner 1996, *et al.*, 1999). De estas, las más relevantes son las causadas por los virus (Lightner *et al.*, 2001).

### Enfermedades causadas por virus

Las infecciones virales son serias batallas entre patógenos y hospederos que pueden resultar en muerte celular, eliminación del virus o infección latente manteniendo ambas células vivas (célula hospedera y célula viral). Para producir una enfermedad, los virus

deben entrar en un hospedero, estar en contacto con células sensibles, replicarse en ellas y producir una lesión celular (Greber, 2001).

Se han descrito diferentes virus en la camaronicultura (Lightner, 1996). Las infecciones ocasionadas por los virus de camarones peneidos tales como WSSV (Mancha Blanca) y TSV (Síndrome de Taura), y en menor grado IHHNV (Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoética Infecciosa), YHV (Cabeza Amarilla) le han ocasionado a la industria camaronícola pérdidas de cultivos, empleos, e ingresos por exportaciones, lo cual se traduce en millones de dólares (Lightner *et al.*, 2001). De las enfermedades virales reportadas hasta la fecha para el continente americano, solamente seis se pueden diagnosticar presuntivamente con el método de análisis en fresco e improntas (BP, MBV, HPV, WSSV, YHV y TSV) (Morales, 2004).

### ***Baculovirus penaei* (BP)**

La poliedrosis nuclear baculoviral puede ser causada por dos agentes distintos: el *Monodon baculovirus* (MBV) y el *Baculovirus penaei* (BP). El primero afecta a los camarones peneidos del hemisferio oriental; el segundo, a los camarones peneidos del hemisferio occidental. Se trata de dos virus distintos, pertenecientes a la familia Baculoviridae. Se ha comprobado que existen múltiples cepas de BP en todo el mundo y es posible que también suceda lo mismo con MBV (Lightner, 1996).

BP ha sido reportado como una enfermedad que causa altas mortalidades en larvas, postlarvas y juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) (Lightner, 1996) y azul (*L. stylirostris*). BP es el único baculovirus que generó impacto en las granjas de cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Brock, 1992). Ampliamente distribuido en cultivos de Estados Unidos, México, Centroamérica, el Caribe, Ecuador, Colombia, Perú y Brasil (Lightner, 1996). En México se ha observado en larvas, postlarvas y reproductores de *Litopenaeus vannamei* (Morales, 2004). En larvas y postlarvas tempranas severamente afectadas se pueden observar algunas señales clínicas tales como: altos índices de mortalidad, reducción en los índices de alimentación y crecimiento, incremento en la infestación por organismos epicomensales en branquias e incluso se puede observar el intestino medio blanquecino (debido a la necrosis de los tejidos infectados), la cual es visible a través de la cutícula del abdomen (Lightner, 1996).

El mecanismo de transmisión del BP es exclusivamente por la vía oral. La transmisión ocurre rápidamente durante los estadios larvarios y de postlarva temprana. Las principales fuentes de transmisión del BP son: canibalismo de camarones infectados, contaminación del desove a través de las heces de adultos infectados (de las hembras, en la mayoría de los casos de cultivo), agua contaminada con BP en las bahías donde se reprocesa camarón (partículas viables en los tejidos congelados a una temperatura de -80 °C, en los sistemas de cultivo, reservorios y canales, así como a través de redes y otros utensilios y sedimentos contaminados con BP (Bruce *et al.*, 1994, Overstreet *et al.*, 1988).

Para el diagnóstico de la enfermedad causada por BP mediante análisis en fresco, se toman muestras de hepatopáncreas, intestino medio o heces para buscar la presencia de cuerpos de oclusión (simples o múltiples) de forma tetraédrica o piramidal, con la ayuda de un microscopio compuesto o de contraste de fases (Lightner, 1996).

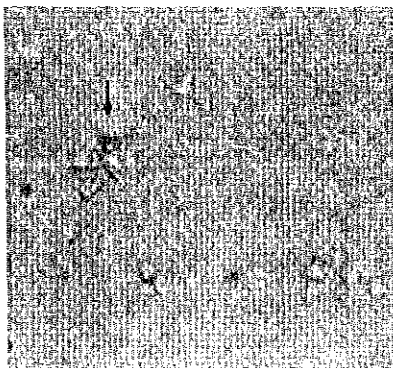


Figura 3. Cuerpos de oclusión tetraédricos de BP. Fotografía tomada a 40X mediante análisis en fresco. Tomada de Morales, 2004.

Mediante análisis histológico se observan los cuerpos de oclusión en las células epiteliales de los túbulos y lumen del hepatopáncreas e intestino medio, eosinofílicos (con tinción H&E los cuerpos de oclusión de BP se tiñen de rojo vivo), causando notables cambios citopatológicos que incluyen una marcada hipertrofia nuclear, marginación y disminución de la cromatina, disociación nuclear en células infectadas del epitelio del hepatopáncreas (Lightner, 1996).

Para el control de BP se utilizan camarones libres de patógenos específicos (SPF, *Specific Pathogen Free*) (Lightner, 2003). Si no hay otra opción y se tienen que utilizar reproductores silvestres o infectados, el contagio se puede prevenir, en gran parte, impidiendo la contaminación fecal de los desoves y con una limpieza total y desinfección de huevos, nauplios y/o larvas mediante tratamientos a base de formalina y agua de mar limpia (filtrada y tratada con cloro). También debe tomarse en cuenta que existen partículas virales libres en el agua de mar, las cuales pueden ser inactivadas de la siguiente manera:

- Por temperatura: 4 días, a 30 °C; 7 días, a 25 °C; 12 días, a 20 °C y 20 días, a 15 °C.
- Por calentamiento: a 45 °C, durante 120 minutos; a 50 °C, durante 30 minutos, y a 60 °C durante 5 minutos.

El BP también se inactiva a pH bajo (1.0-4.0) y con desinfectantes como cloro (5 ppm), cloruro de benzalconio (100 ppm), formalina (0.5 %) y alcohol etílico (30 %) (Morales, 2004).

### ***Monodon baculovirus (MBV)***

La importancia de MBV esta muy bien documentada en la camaronicultura de Asia. Este virus causa fuertes mortalidades en todos los estadios de vida del camarón *P. monodon* y es considerado responsable del colapso de la camaronicultura en Taiwán a finales de 1980. Se encuentra ampliamente distribuido en las costas de los océanos Índico y Pacífico, Asia, Australia y África. En América se ha observado en camarones importados de Tahití, Hawai, México, Ecuador, Brasil, Puerto Rico y Estados Unidos de Norte América (Lightner, 1996). La mayoría de los síntomas clínicos que presentan los



camarones juveniles o adultos infectados con este baculovirus no son específicos, pero en larvas y postlarvas tempranas severamente afectadas algunas señales clínicas pueden ser: altos índices de mortalidad, reducción en los índices de alimentación y crecimiento, incremento en la infestación por organismos epicomensales en branquias e incluso se puede observar el intestino medio blanquecino (debido a la necrosis de los tejidos infectados), la cual es visible a través de la cutícula del abdomen. El mecanismo de transmisión de MBV es igual al de BP (Momoyama *et al.*, 1988, Lightner *et al.*, 1983).

Para el diagnóstico de la enfermedad causada por MBV mediante análisis en fresco, se toman muestras de hepatopáncreas, intestino medio o heces para buscar la presencia de cuerpos de oclusión de forma esférica, con la ayuda de un microscopio compuesto o de contraste de fases (Lightner, 1996).



Figura 4. Cuerpos de oclusión esféricos del MBV dentro de núcleos hipertrofiados. Fotografía tomada a 40X mediante análisis en fresco. Tomada de Lightner, 1996.

Mediante análisis histológico se observan los cuerpos de oclusión característicos en las células epiteliales de los túbulos y lumen del hepatopáncreas e intestino medio, eosinofílicos (con tinción Hematoxilina-Eosina (H&E) los cuerpos de oclusión de BP se tiñen de rojo vivo). Las células infectadas presentan una marcada hipertrofia nuclear, marginación y disminución de la cromatina (Lightner, 1996). Para el control del MBV se toman las mismas medidas de prevención y control que se aplican para el BP (Morales, 2004).

#### **Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV)**

El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), es pequeño de aproximadamente 22 nm de diámetro, constituido por una cadena sencilla de ADN, perteneciente al grupo de los Parvovirus. Infecta a casi todos los órganos y tejidos de los camarones (Lightner, 1996).

Este virus se encuentra ampliamente distribuido en Asia y América. En América, se ha detectado en Estados Unidos, México, América Central, Ecuador, Perú, Brasil y numerosas Islas de Caribe. En el Pacífico Central, en Hawai, Guam, Tahiti y Nueva Calcedonia. En Asia, se ha encontrado en Singapur, Filipinas, Tailandia, Malasia y Indonesia (Lightner, 1996). En México fue reportado por primera vez en 1982, en postlarvas de camarón azul importadas de Hawai, causando altas mortalidades. En 1987 se detectó la presencia de IHHNV en laboratorios de producción de postlarva del

norte de Sinaloa. Posteriormente, en 1990, se reportó este virus en laboratorios de producción de postlarvas del sur de Sinaloa (Lightner, 1992). Esta infección ha causado severas pérdidas en las granjas de cultivo de *L. stylirostris*. En *L. vannamei* también ha ocasionado grandes pérdidas en las granjas camaroneras, pero no tan severas como en *L. stylirostris* (Lightner, 1996).

Es desconocido si IHHNV está representado por una sola cepa o existen varias cepas en diferentes zonas geográficas. Se sabe que algunos organismos sobrevivientes de una epizootia pueden ser portadores de por vida, y transmitirlo a sus descendientes y a otras poblaciones (transmisión vertical y horizontal, respectivamente) (Lightner, 1999).

Los síntomas clínicos de la enfermedad IHHN no son específicos, pero en juveniles de *L. stylirostris* y *L. vannamei*, en etapa aguda, se observa una marcada reducción en la alimentación seguida de cambios en la apariencia y comportamiento (nado lento hacia la superficie con la parte ventral hacia arriba). El camarón repite este comportamiento por varias horas hasta que se encuentra demasiado cansado para continuar (la muerte de los animales infectados, o hasta que es atacado y canibalizado por sus congéneres más sanos (Lightner *et al.*, 1999). La muerte de los camarones infectados ocurre dentro de 4 – 12 horas de la aparición de las primeras señales (Conroy, 1990). A menudo, en este estado de infección *L. stylirostris* tiene manchas brillosas de color blanco en la epidermis cuticular, especialmente en la unión de los platos tergaes del abdomen, dándole al camarón una apariencia moteada. Después que esta apariencia moteada se debilita, en *L. stylirostris* y en algunas otras especies como *L. monodon* con la enfermedad, a menudo los camarones moribundos se distinguen por una coloración azulosa y con opacidad en el músculo abdominal (Lightner, 1996).

En *L. vannamei* la enfermedad IHHN se relaciona a través de datos epizootiologicos con síndrome del enanismo (RDS) (Lightner, 1996). Camarones juveniles con RDS se caracterizan por presentar el rostrum deforme y torcido, flagelo antenal arrugado y otras deformidades cuticulares. En poblaciones cultivadas de *L. vannamei* infectadas con IHHNV, se ha observado una distribución de tallas relativamente amplia, con una proporción de tallas pequeñas (enanias) mucho mayor de la normal, entre 30 y 50 %. Mientras que en juveniles de *L. vannamei* libres de IHHNV son entre 10 y 30 % (Lightner, 1999).

Mediante análisis histológico se observan los cuerpos de inclusión intranucleares tipo Cowdry A (CAIs), eosinofílicos (con tinción H&E en tejidos de organismos fijados con solución Davison y preservados en alcohol (OH) 70 %), con cromatina marginal, núcleos hipertrofiados en células de tejidos de origen ectodérmico (branquias, epidermis, epitelio intestinal, cordón nervioso ventral y ganglios asociados) y mesodérmico (órganos hematopoiéticos, glándula antenal, gónadas, órgano linfoide, tejido conectivo y músculo estriado). Rara vez se observan CAIs de IHHN en células epiteliales del hepatopáncreas, los cuales son acompañados con infecciones severas en los tejidos anteriormente mencionados (Lightner, 1999).

Para el control de IHHNV es necesario monitorear los reproductores de los laboratorios de producción de postlarvas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior la eliminación de los reproductores infectados. Para así sembrar postlarvas (SPF, *Specific Pathogen Free*) libres de este patógeno (Lightner, 2003). Es

indispensable limpiar y desinfectar adecuadamente los estanques antes de sembrarlos. Debe evitarse el intercambio de equipo de mantenimiento entre estanques (por ejemplo, redes, cubiertas, lanchas, material de análisis patológicos y calidad de agua y sedimentos); además han de eliminarse todos los camarones moribundos o muertos en cuanto aparezcan y se confirme la presencia de IHNV (Charantchakool, 1998).

### **Virus del Síndrome de Taura (TSV )**

El virus del síndrome de Taura (TSV) fue reportado por primera vez en 1992, en granjas camaroneras cerca de la boca del río Taura, en Guayaquil, Ecuador. Este virus ha sido clasificado, tentativamente como un miembro de la familia Piconaviridae. Presenta una morfología icosaédrica; las partículas tienen un diámetro promedio de 30 a 32 nanómetros; su replicación es citoplasmática, contiene ARN de una sola cadena con una longitud de aproximadamente 9 kb. TSV es una enfermedad que provoca lesiones severas en las células del epitelio del estómago, del epitelio cuticular y de las branquias; causa muy altas mortalidades en el camarón blanco y en el camarón azul (Lightner, 1996).

La distribución del síndrome de Taura parecía estar limitada al continente americano, pero los movimientos irresponsables de *L. vannamei* de América a Asia han ocasionado la dispersión de TSV en Indonesia (Informe del Dr. Don Lightner a la OIE y transmitido por la FAO a la comunidad científica). El TSV se encuentra ampliamente distribuido en países del Centro y Sudamérica. En México fue reportado por primera vez en 1995 en camarón blanco, pero actualmente también afecta a las dos especies (camarón blanco y camarón azul) en cultivo, principalmente en los estadios de postlarva y juvenil, con altas mortalidades (Lightner 1996).

Hansson *et al.*, (1999) publicaron un artículo de la distribución del TSV durante 6 años (1992 a 1997) en países de América. Donde en 1996 encontraron una amplia distribución de camarones en fase aguda de TSV en Belice, Costa Rica, Guatemala, México (Sonora, Sinaloa y Tamaulipas), Panamá y USA (Texas y S. Carolina).

En 1996 se analizaron muestras de 33 granjas de diferentes áreas del estado de Sinaloa, los estudios histopatológicos revelaron 92 % de prevalencia de TSV en la zona centro, 78 % en la zona Sur y 73 % en la zona norte. Para 1997 se detectó una disminución de la incidencia del virus en los organismos cultivados, teniendo en la zona norte una prevalencia de 34 %, centro un 78 % y sur un 20 %. En 1998, se observó una reducción significativa en la prevalencia de TSV con solo un 30 % de prevalencia en las granjas analizadas (Zarain y Asencio, 2001).

La enfermedad presenta dos fases. En la *fase aguda* se observan camarones moribundos con cromatóforos rojos, lo que le da al camarón un aspecto rosado a rojizo, y a los urópodos, una coloración rojiza (enfermedad de la cola roja), intestino vacío y presentan altas mortalidades (mortalidades acumuladas entre 80 y 90 %) durante el proceso de muda. En la *fase crónica/recuperación*, los organismos presentan melanización multifocal en la cutícula. Los organismos pueden o no presentar cutícula suave y expansión de los cromatóforos rojos. Su comportamiento es el de animales sanos. Sólo se observan regiones melanizadas en vías de recuperación.

Regularmente en esa fase se obtiene sobrevivencias de 60 % al momento de la cosecha (Lightner 1996).

Para detectar de manera rápida, y presuntiva, la presencia de TSV en camarones vivos con la sintomatología descrita para la fase aguda, se toman muestras de branquias y estómago y se sigue la metodología descrita para el virus de la mancha blanca. Se observa al microscopio compuesto (con aumentos de 40 o 60X), para buscar células con núcleos picnóticos y con cariorrexis; en esta fase es posible observar cuerpos de inclusiones citoplasmáticas y abundantes cuerpos esféricos de 1 a 20 micrómetros de diámetro (Morales, 2004).



Figura 5. Prueba rápida con tinción de branquias de un juvenil *Litopenaeus vannamei*, se observan núcleos cariorrexicos, picnóticos y cuerpos de inclusión de TSV. (Tinción de hematoxilina-eosina de Mayer-Bennett). Fotografía tomada a 60X de Morales, 2004.

El diagnóstico por histología de rutina en organismos en fase aguda, con tinción de hematoxilina-eosina, se basa en la búsqueda de áreas con necrosis multifocal en el epitelio cuticular del exoesqueleto, apéndices, branquias, epitelio del estómago e intestino. En esta fase también se ven afectados el tejido conectivo y las fibras musculares. Las células epiteliales son las más afectadas y se observa que el citoplasma se vuelve más eosinófilico. La picnosis nuclear y la cariorrexis son características de una lesión del síndrome de Taura; en algunos casos es posible observar la presencia de inclusiones citoplasmáticas y una gran cantidad de cuerpos esféricos pequeños (de 1 a 20 micrómetros), que van de eosinófilicos a basofílicos pálido. En esta fase no se observa infiltración hemolítica y otro tipo de respuesta como formación de nódulos hemocíticos y melanización (Lightner 1996).

Durante la fase crónica o de recuperación, las lesiones son semejantes a las de una infección bacteriana en la cutícula; presentan erosión bacteriana y colonización de la cutícula. También es común observar esferoides en el órgano linfoide, así como una marcada infiltración hemocítica, la cual puede o no estar melanizada (ésta se localiza principalmente bajo las lesiones cuticulares melanizadas o necróticas) (Morales, 2004).

Para el control del virus, debe tomarse en cuenta que solamente puede ser inactivado a 100 °C durante 10 minutos en el tejido. Las sustancias químicas que quizá puedan inactivar al virus son los oxidantes, el sulfato de sodio y el dodecilo (SDS), los detergentes no iónicos y los disolventes lípidos. Se desconoce la resistencia del virus a los desinfectantes, pero la desecación de los viveros o estanques de cultivo, con o sin cal, es efectiva para prevenir la infección de los cultivos subsiguientes. El hipoclorito de

calcio, a 220 ppm de cloro, durante 24 horas, es eficaz para desinfectar las superficies de los estanques de cultivo. El virus del síndrome de Taura sobrevive bien en tejidos congelados; el agua procedente de los acuarios con camarones infectados por el virus mantiene su estado infeccioso durante 14 días (OIE, 2003).

### **Virus del síndrome de la Mancha Blanca (WSSV)**

El virus de la mancha blanca posee una doble cadena de ADN; su forma elíptica a cilíndrica, con una membrana trilaminar y viriones de 80-120 × 250-380 nm; tiene un genoma de aproximadamente 290 kbp, característica que lo hace uno de los virus más complejos que ataca al camarón. Debido a que es un virus completamente diferente, se ha propuesto la creación de una nueva familia, que llevaría el nombre de Nimaviridae (Lightner *et al.*, 1999).

Fue reportado por primera vez en 1992-1993, en el noroeste de Asia, y se dispersó rápidamente a través de la mayoría de las regiones de Asia y del Indo-Pacífico (Lightner 1996 y Lightner *et al.*, 1999). En noviembre de 1995, se documentó el primer caso de mancha blanca en el hemisferio occidental, en granjas de cultivo de *L. setiferus* del sur de Texas. Plantas empacadoras de camarón localizadas cerca de la granja afectada fue la causa de la introducción del virus, debido que ahí están los mayores empacadores y reprocesadores de camarones importados de las áreas afectadas de Asia (Lightner, 1996).

Actualmente se encuentra distribuido en poblaciones naturales y de cultivo de camarón de *L. monodon*, *L. japonicus*, *L. chinensis*, *L. indicus*, *L. merguensis* y *L. setiferus* (Lightner 1996 y Lightner *et al.*, 1999). Sin embargo, debido a que la industria del camarón depende del transporte regional e internacional de organismos vivos (como reproductores, nauplios y larvas) y el envío de camarón para el consumo humano de lugares donde se ha reportado mancha blanca es posible que la dispersión de WSSV sea mayor a la reportada de manera oficial (Lightner *et al.*, 1999). Se sabe que este virus ha causado altas mortalidades en cultivos de *L. setiferus* en los estados de Texas y Carolina del Sur; en México, en *L. stylirostris* y *L. vannamei* y en algunos países de América Central (como Honduras, Costa Rica, Nicaragua, Panamá, Ecuador) y Colombia, en *L. vannamei* (Lightner *et al.*, 1999).

En camarones juveniles tardíos y subadultos (especialmente durante los 40 a 60 días de engorda) la primer señal clínica es una drástica reducción en la alimentación, hasta dejar de comer por completo. Posteriormente se detecta la aparición de camarones moribundos nadando cerca de la superficie y en las orillas de los estanques, llegando a causar mortalidades hasta del 100 % en pocos días (3 a 10 días a partir de la aparición de los primeros síntomas) (Lightner, 1996).

En *L. stylirostris* y *L. vannamei*, los organismos en fase aguda presentan una coloración rosada a rojiza: esto se debe a la expansión de los cromatóforos del epitelio cuticular. En fase crónica es posible observar algunas manchas blancas muy pequeñas en el cefalotórax, menores que las reportadas para *L. monodon* (0.5 a 2.0 mm de diámetro). Tales manchas blancas son depósitos de calcio que también pudieran ser provocados por cambios ambientales relacionados con la concentración de calcio y con el pH del estanque (Lightner, 1996).

Mediante la prueba rápida con tinción de hematoxilina-eosina (tinción rápida), es posible observar núcleos hipertrofiados, con cuerpos de inclusión en el centro. Las células normales poseen núcleos irregulares, cromatina dispersa (manchas negras en el centro). Las células infectadas presentan núcleos esféricos de mayor tamaño (aproximadamente de dos a tres veces más grandes que el tamaño normal del núcleo) y cromatina marginal. La metodología de la prueba se provee en materiales y métodos (Morales, 2004).



Figura 6. Prueba rápida con tinción de hematoxilina-eosina de Mayer-Bennett del epitelio del estómago, se observan cuerpos de inclusión citoplasmáticos intranucleares basofílicos de WSSV. Fotografía tomada a 60X de Morales, 2004.

En el análisis histopatológico se observan los cuerpos de inclusión intranucleares tipo Cowdry A (CAIs), que generalmente van de eosinofílicos a basofílicos pálido (tinción H&E) en organismos fijados con solución Davidson. Estos cuerpos de inclusión se encuentran dentro de núcleos hipertrofiados con cromatina marginal, en células de branquias, epitelio cuticular, epitelio de estómago, cordón y ganglios nerviosos, y también es posible observarlo en el tejido hematopoyético, en la glándula antenal, en el órgano linfóide y en el tejido conectivo (Lightner 1996).

Un brote de WSSV puede ser prevenido mediante la eliminación de los vectores potenciales y cerrando las compuertas de entrada de agua a los estanques. Sin embargo, un brote serio puede ocurrir en estanque sembrados con postlarva infectada (PLs). Usar diagnósticos por PCR para buscar PLs infectadas es un camino para reducir el riesgo de infección. Esta técnica es usada en muchos países con diferentes resultados. El PCR es muy sensible e incluso puede detectar pequeñas cantidades del virus en animales individuales. Sin embargo, esta técnica no es efectiva cuando las poblaciones son muy grandes y sólo algunos organismos están afectados. Esto puede explicar el porqué de los brotes de la enfermedad pueden ocurrir en estanques con postlarva certificada como negativa mediante PCR (Chanratchakool, 1999).

Es importante mantener a los predadores y los competidores fuera de los estanques. Después de que el estanque es llenado, los recambios de agua son reducidos al mínimo por al menos el primer mes después de la siembra. El agua sólo debe ser cambiada cuando es necesario, no como un proceso de rutina. También es muy importante estar seguros de que el agua que entra a los estanques este libre de

animales y que no este contaminada con basura de otras granjas. El reservorio es esencial para realizar cada uno de los tratamientos del agua entrante.

Las infecciones se pueden mover de un estanque a otro dentro la granja, por lo que el equipo no debe ser usado en más de un estanque a menos que sea absolutamente inevitable. Si el equipo es movido entre los estanques tiene que ser primero lavado y desinfectado. Es importante eliminar y destruir todos los camarones moribundos o muertos en cuanto aparezcan y se confirme la presencia de WSSV (Chanratchakool, 1999).

El virus de la mancha blanca es inactivado a diferentes temperaturas: a 50 °C durante 20 minutos, y a 70 °C durante cinco minutos; la inactivación por desecación ocurre a 30 °C. También se inactiva a pH 3 durante una hora, y pH 12 durante 10 minutos (a temperatura de 25 °C) (OIE, 2003).

Los productos químicos más usados para la inactivación de WSSV son: solución de NaCl al 15 %, a 28 °C, durante 4 horas, y 0.5 µg/ml de ozono residual durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para la inactivación también se ha usado desinfectantes como hipoclorito de sodio, con 100 ppm de yodo durante 10 minutos o 10 ppm durante 30 minutos; y con 75 ppm de cloruro de benzalconio durante 10 minutos (Morales, 2004).

Es importante tomar en cuenta que el virus de la mancha blanca presenta una sobrevivencia a diferentes temperaturas. A baja concentración se mantiene viable en agua de mar estéril durante cinco días, a 28 °C, y por más tiempo a temperaturas más bajas. También puede mantenerse viable hasta por cuatro días (a temperaturas que oscilan entre 25 y 28 °C) en el agua de estanques en donde han ocurrido brotes de la enfermedad (OIE, 2003).

### **Virus de la cabeza amarilla (YHV)**

El virus de la cabeza amarilla pertenece a la familia Coronaviridae. Es un virus con ARN de cadena sencilla, de forma cilíndrica (150 a 200 nm de longitud por 40 a 50 de ancho), posee una envoltura y su replicación es citoplasmática (Lightner *et al.*, 1999). Ampliamente distribuido en los cultivos de *L. monodon* en Asia. Este virus se reportó por primera vez en Tailandia en 1990. Hasta el momento, no se ha confirmado la presencia de YHV en el continente Americano (Lightner, 1996).

La primer señal clínica de esta enfermedad es un incremento anormal en el consumo del alimento (especialmente durante los 50 a 70 días de engorda) en camarones juveniles tardíos y subadultos, posteriormente dejan de comer por completo. Como consecuencia se observa la aparición de camarones moribundos nadando en la superficie de las orillas de los estanques (los cuales pueden o no tener una coloración amarillenta del cefalotórax). En el segundo día, el número de camarones afectados se incrementa drásticamente: al tercer día después del cese total de la alimentación, se observa una mortalidad masiva, perdiéndose hasta el 100 % de los organismos. Los camarones moribundos presentan palidez generalizada del cuerpo, con un color amarillento; a menudo cefalotórax inflamado; branquias de color amarillo pálido a café y hepatopáncreas amarillo pálido (Lightner 1996, *et al.*, 1999)

Para detectar de manera rápida, y presuntiva, la presencia de YHV en camarones vivos, se toma una muestra de hemolinfa de los organismos sospechosos y se observa al microscopio para buscar hemocitos que tengan picnosis, cariorrexis y cuerpos de inclusión citoplasmáticas perinucleares basofílicas (Lightner, 1996). La metodología de la toma de muestra y tinción se da a conocer en anexo 6.

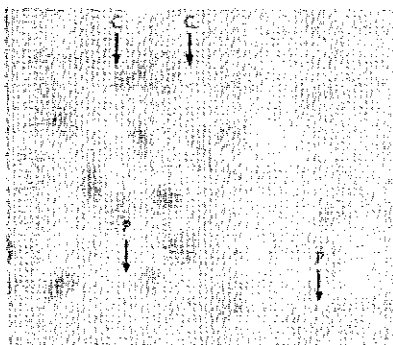


Figura 7. Muestra de hemolinfa; se observan hemocitos con núcleos picnóticos y cariorréxicos. (Tinción de Giemsa). Fotografía tomada a 60X de Alday, 1999.

El diagnóstico por histología de rutina en organismos con esta enfermedad con tinción de hematoxilina-eosina se basa en la búsqueda de áreas con necrosis generalizada, de multifocal a difusa, con presencia de picnosis y cariorrexis. En los tejidos afectados es posible observar inclusiones citoplasmáticas perinucleares basofílicas de forma esférica. Las células y tejidos afectados por el YHV son los hemocitos, el órgano linfóide, el tejido hematopoyético, las células epiteliales de las láminas branquiales, el tejido conectivo, el músculo, el intestino, la glándula antenal, el cordón nervioso y las gónadas (Lightner 1996).

Cuando el organismo tiene esta enfermedad, se ha observado que los primeros cambios que sufren las células son: hipertrofia nuclear, disminución y posterior marginación de la cromatina, desplazamiento hacia la parte lateral del nucléolo, así como la presencia de infiltración hemocítica. También se sabe que, durante una infección de YHV, se presenta un tipo de células, en cantidades moderadas, en los espacios por donde viaja la hemolinfa (que se encuentran en las branquias, la glándula antenal, el hepatopáncreas y el corazón). Dichas células tienen forma esférica, y presentan un citoplasma de apariencia uniforme, basofílico y con el núcleo esférico en el centro. Se piensa que estas células pueden ser hemocitos inmaduros liberados de manera prematura por el órgano hematopoyético (Lightner, 1996).

Este virus puede ser inactivado a 60 °C durante 30 minutos. En el agua de estanques infectados, el virus es inactivado utilizando 30 ppm de hipoclorito de calcio. Pese a que se desconocen otros desinfectantes, quizá también son eficaces: soluciones de formalina al 3 % durante 10 minutos, NaOH al 2 % durante 10 minutos, 540 ppm de cloro durante 20 minutos y 250 ppm de compuestos que contengan yodo durante 30 minutos. El virus de cabeza amarilla tiene una sobrevivencia en el agua de estanques afectados, de unos cuatro días a una temperatura de 25 a 28 °C (OIE, 2003).



## Enfermedades causadas por bacterias

Las bacterias gram negativas predominan en el ambiente marino y usualmente constituyen la mayoría de las bacterias que normalmente se presentan en la microflora asociada con los camarones silvestres y de cultivo. *Vibrio* sp. constituye la mayoría de las bacterias aisladas del estómago, branquias y cutícula de los camarones, ya que siempre están presentes; solamente causan mortalidades muy altas cuando se rompe su equilibrio o cuando el sistema inmune de los camarones está suprimido, lo cual puede deberse a diversos factores (Lightner, 1996).

### Hepatopancreatitis necrotizante (NHP)

La hepatopancreatitis necrotizante (NHP) es una severa enfermedad provocada por bacterias intracelulares del tipo de las rickettsias. Esta bacteria gram negativa fue reconocida por primera vez en camarones peneidos de granjas camaroneras de Texas. Posteriormente, en 1993 se reportó una epizootia causada por NHP en camarones cultivados del noroeste de Perú (Lightner *et al.*, 1994). También ha sido reportada en Costa Rica, Panamá, Brasil, Venezuela, Ecuador y México, donde provocó mortalidades entre 20 y 95 % en los sistemas de cultivo de *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco) y *Litopenaeus stylirostris* (camarón azul) (Lightner 1996). Hasta este momento, las infecciones de NHP han sido reportadas únicamente en camarones peneidos americanos. La bacteria de NHP es pequeña y altamente pleomorfica, factor que juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Frelter, 1992). El camarón enfermo reduce su alimentación, por lo que el intestino se ve vacío y se observa anorexia. Reduce marcadamente el crecimiento y presenta el caparazón flácido, con una coloración oscura en las branquias. La expansión de los cromatóforos da la apariencia de manchas oscuras en los pleópodos y urópodos. Apéndices melanizados, letargia, atrofia en el hepatopáncreas. Puede llegar a ocasionar mortalidades hasta del 90 % en 30 días desde su inicio (Lightner, 1996).

En análisis en fresco de la fase inicial de la NHP, no se observa atrofia del hepatopáncreas, pero los organismos presentan deformación tubular, por atrofia y estrangulamiento de los túbulos, con desprendimiento e hipertrofia celular (Lightner *et al.*, 1999).



Figura 8. Análisis en fresco de hepatopáncreas; se observan: a) estrangulamiento, b) atrofia de los túbulos con desprendimiento e hipertrofia celular (c). Fotografía tomada de Morales, 2004.

Esta enfermedad se asocia a factores ambientales como temperatura (> 29 °C a 35 °C) y salinidades altas (> 20 ppt a 35 ppt) durante períodos prolongados (Lightner *et al.*, 1994).

### Vibriosis (*Vibrio* sp.)

La vibriosis también ha causado significativas enfermedades dentro de las granjas de cultivo de *L. vannamei*, un ejemplo de ello es el síndrome de la Gaviota que es una enfermedad que se caracteriza por las altas mortalidades en estanques de cultivo de *L. vannamei* (Brock, 1992). Esta enfermedad se presenta cuando existen condiciones de estrés dentro de los estanques como deficiencias nutricionales, lesiones en la cutícula, amonio elevado, temperaturas extremas, infecciones continuas por virus u otros microorganismos. Condiciones elevadas de salinidad y altos niveles de nitrógeno son importantes variables para conducir los brotes del Síndrome de la Gaviota (Brock, 1992). Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en instalaciones de cultivo en todo el mundo (Lightner, 1996). Todas las especies de acuicultura son susceptibles a estas bacterias bajo condiciones de estrés. En la camaronicultura, se han reportado grandes epizootias causadas por vibriosis en Japón (*P. japonicus*), en el Indo – Pacífico (*P. monodon*) y en Ecuador, Centro América, Perú y Colombia (*L. vannamei*) (Lightner, 1996). La vibriosis puede presentarse como una infección sistémica (atacando varios órganos). En infecciones de la cutícula usualmente aparecen manchas negras café (Lightner, 1996). El impacto de la vibriosis en los estanques de cultivo de camarón depende de la severidad de la infección. La mortalidad es variable, en algunos casos ha excedido el 70 %. En estanques con gran cantidad de fitoplancton, la vibriosis puede pasar desapercibida hasta que se cosecha, cuando se descubre la baja supervivencia. Al realizarse análisis en fresco se observan altas concentraciones de bacterias en la hemolinfa y hepatopáncreas (Lightner, 1996).

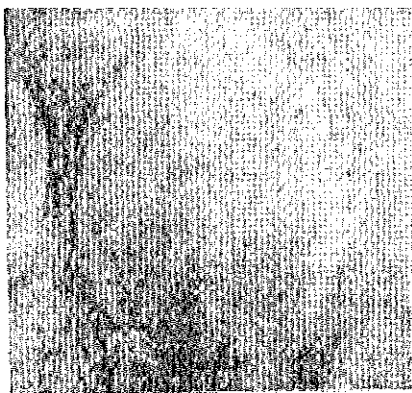


Figura 9. Muestra de hepatopáncreas en fresco de *Litopenaeus vannamei*; se observa un nódulo hemocítico. Fotografía tomada de Morales, 2004.

Como métodos de control se utiliza la disminución de la biomasa en los estanques, mediante cosechas parciales e incremento en los recambios diarios de agua. Para su tratamiento es necesario el empleo de antibióticos, los cuales se seleccionan con

antibiogramas previos. Los antibióticos reportados como eficaces para estas bacterias son los del grupo de los nitrofuranos (Morales, 2004).

### **Bacterias Filamentosas (*Leucothrix mucor*)**

Las bacterias filamentosas, son organismos gram negativos (Lightner, 1996), aeróbicos, los cuales se constituyen por largos filamentos no ramificados compuestos de pequeñas células ovoides o cilíndricas fuertemente adheridas a sustratos vivos (Brock, 1966) o inertes. Esta bacteria de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro y longitud variable, no penetra la cutícula del crustáceo (Couch, 1978). Estos organismos se fijan principalmente en la cutícula, branquias, pleópodos y pereiópodos de juveniles y adultos (Johnson, 1990). Cuando estas bacterias se encuentran en grandes cantidades llegan a generar dificultades en la respiración, muda, alimentación y locomoción (Lightner, 1996). Los camarones que se encuentran con infestaciones medias y avanzadas, las branquias se observan de color café a oscuro, en estado avanzado las bacterias impiden el intercambio gaseoso – provocando la muerte del tejido (necrosis multifocal)-, y se aprecia inflamado el intestino en algunos casos, los organismos dejan de comer y se observa vacío el intestino (Lightner, 1996). El análisis en fresco es una herramienta que se utiliza para detectar la presencia de *Leucothrix mucor*. Para proceder con el diagnóstico, se toman muestras de branquias, epipodito, palpo mandibular, cutícula y pleópodos (Lightner, 1996). Con el microscopio compuesto, se observan los filamentos de diversos tamaños de esta bacteria.



Figura 10. Muestra de branquias; se observan los filamentos no ramificados de *Leucothrix mucor*. Fotografía tomada a 40X de Morales, 2004.

Para el control se requiere mantener una buena calidad del agua de cultivo, con excelente producción de fitoplancton, para que estas poblaciones compitan con *Leucothrix mucor* por los nutrientes disponibles. En laboratorio se han utilizado diferentes fármacos; Cutrine es el más efectivo (Morales, 2004).

## Protozoarios parásitos

### Gregarinas (*Nematopsis* sp.)

Estos protozoarios se encuentran en la naturaleza necesitando de vertebrados e invertebrados (moluscos y poliquetos) para completar su ciclo de vida. Sin embargo, muchas especies de gregarinas tienen hospederos específicos, como *Nematopsis* sp. que se encuentra en el intestino medio de *L. vannamei*. Diferentes tipos de gregarinas se han reportado en estadios de misis y post-larva de *L. vannamei* (Lightner, 1996). No existen signos clínicos de las infecciones por gregarinas que permitan asegurar su presencia, posiblemente la reducción del crecimiento puede ser debido a infecciones por gregarinas. En infecciones severas presenta una decoloración amarilla en el intestino medio (Brock, 1992). Cuando las gregarinas se encuentran en los camarones con prevalencia y grado de severidad alto, se observan altas mortalidades, intestino vacío e inflamado, además de una reducción en el crecimiento, también se observa un incremento en la proliferación de epicomensales principalmente en branquias y presencia alta de bacterias en hepatopáncreas (Lightner, 1996). Las gregarinas son transmitidas al camarón cuando este ingiere esporas del fondo del estanque las cuales son liberadas de los moluscos y de los poliquetos o también al consumir poliquetos del género *Polydora* sp., que contiene gimnosporas del parásito y da como resultado la formación de un esporozoito. Después el esporozoito viaja por el intestino para adherirse a las células del epitelio intestinal de las cuales se alimenta a través del epimerito para convertirse en trofozoito y formar bioasociaciones (trofozoítos de dos divisiones) y multiasociaciones (sicigias de tres divisiones o más), posteriormente los organismos asociados se enquistan para convertirse en gametocistos los cuales se adhieren a la pared del recto o se encuentran en el ciego hepático posterior del camarón; posteriormente se presenta una división de los gametocistos para dar paso a las gimnosporas las cuales se liberan al medio al romperse la pared de los gametocistos, las gimnosporas se adhieren a la mucosa de los poliquetos y moluscos, donde se desarrollan hasta convertirse en esporas con trofozoítos para ser liberadas al fondo del estanque la cual es ingerida por el camarón. Se conoce que *Nematopsis* sp. requiere de dos hospederos para completar su ciclo de vida. El diagnóstico se realiza analizando todo el intestino del camarón, en el cual se pueden observar los gametocistos cerca del ciego hepático posterior, trofozoítos y sicigias de 3, 4 y más divisiones en el intestino medio.



Figura 11. Muestra de intestino medio; puede apreciarse las sicigias de gregarinas de 2, 3 y 4 divisiones adheridas al epitelio del lumen del intestino. Fotografía tomada de Morales, 2004.

Para control de gregarinas en los estanques es necesario erradicar al poliqueto del genero *Polydora* sp. y a los moluscos que son los huéspedes intermediarios que utilizan para completar su ciclo de vida, conocer el comportamiento cíclico de la parasitosis causada por este protozooario, puede servir para elaborar un programa sanitario favorable para la erradicación de este parásito (Lightner 1996 y Morales 2004).

### **Microsporidios (*Ameson*, *Teholania* y *Pleistophora*)**

Los microsporidios son protozoarios parásitos que afectan a varias especies de insectos, peces y crustáceos. Las especies pertenecen a tres géneros *Ameson*, *Agnastoma* y *Pleistophora*, parasitan casi todos los tejidos y órganos del hospedero; la mayoría infecta los sistemas reproductor, excretor y nervioso, así como el tejido conectivo y músculo. En el camarón son las causantes de la enfermedad conocida como “enfermedad del algodón” o “camarón de leche” y no se considera como un problema grave pues se reporta en forma temprana en juveniles y adultos y su control es eliminando a los huéspedes secundarios (peces) (Lightner, 1996).

La enfermedad del algodón en *L. vannamei* ocurre cuando el músculo estriado es invadido por el protozooario *Ameson* sp., un miembro del familia Microsporidia (Brock, 1992). Una gran cantidad de esporas de *Ameson* sp., infectan las células musculares y hacen que se pierda la transparencia del músculo, ocasionando una coloración blanquecina, este cambio indica la presencia de la enfermedad del algodón. Es difícil detectar las infecciones leves por estos parásitos; sin embargo, un color blanco en la parte ventral de abdomen es un signo que puede servir como ayuda para el diagnóstico preliminar. En juveniles con infecciones severas se observa músculo lechoso, una coloración negra-azulosa en la cutícula y también se observa letargia. *Agnastoma* sp. infecta las gónadas, corazón, branquias, hepatopáncreas e intestino medio, produciendo la coloración blanquesina que genera opacidad en las gónadas, branquias y cutícula. Para su detección se realiza análisis en fresco de abdomen principalmente, buscando esporas en los tejidos.

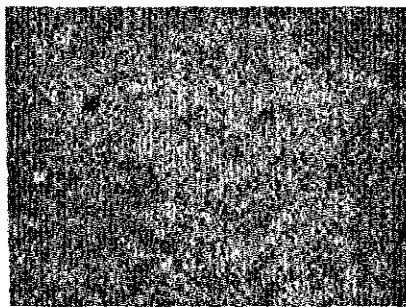


Figura 12. Macerado de músculo donde se observan las cápsulas de *Ameson nelsoni*. Fotografía tomada de Morales, 2004.

Se sabe que la ingesta de heces de peces portadores de las esporas de microsporidios provoca infección en crustáceos. Una medida de prevención para esta enfermedad es eliminar los peces en los estanques para evitar que los parásitos cumplan su ciclo de vida (Lightner, 1996). Algunas medidas de control son: el secado hasta el agrietamiento

del suelo, la remoción de materia orgánica y la adición de cal como desinfectante (Morales, 2004).

### **Protozoarios epicomensales**

Los protozoarios epicomensales son organismos cosmopolitas que se encuentran de manera natural en los estanques de cultivo. Con frecuencia se observan en branquias, apéndices y cutícula de diversas partes del cuerpo del camarón a cierto número de estos organismos, sin que con ello se encuentren enfermos. Sin embargo, cuando los camarones se encuentran sometidos a factores estresantes reducen su actividad limpiadora y no mudan, y por lo tanto son susceptibles a la invasión masiva. Los epicomensales más comunes en el cultivo de camarón son: (1) *Zoothamnium* sp.; protozoario ciliado colonial, fijo mediante un pedúnculo contráctil, con mionema continuo, donde todas las ramificaciones del tallo con sus individuos se contraen al mismo tiempo. (2) *Epistylis* sp.; ciliado peritríco, solitario con labio y disco peristomial fuertemente convexo; habita sistemas de fangos activos estabilizados. (3) *Acineta* sp.; presenta forma cónica, cuya célula se encuentra rodeada por una lórica; los tentáculos se agrupan en fascículos, situados a ambos lados del cuerpo. (4) *Ascophrys* sp.; ciliado apostomado que posee cilios para su locomoción y captura de alimento. Estos organismos pueden causar altas mortalidades cuando atacan las branquias, la región oral, la cutícula, los apéndices y el resto del cuerpo de juveniles y adultos; las postlarvas tardías y los subadultos son los más afectados en los cultivos con medianas y altas densidades. Es difícil detectar las infecciones leves por estos epicomensales; sin embargo signos como coloración rojiza en la superficie del cuerpo y decoloración de las branquias pueden servir como ayuda para el diagnóstico preliminar. En estados avanzados de la infección, la superficie corporal del camarón se torna rojiza, y se dificulta la locomoción, la alimentación, la respiración y la reproducción, finalmente sobreviene la muerte. La abundancia de estos protozoarios puede ser indicio de alta densidad de bacterias, contaminación orgánica, estrés nutricional o ambiental, e higiene inadecuada (mala calidad del agua). Cuando las condiciones del estanque son pobres, es frecuente observar además de los protozoarios epicomensales, la acumulación de materia orgánica. Para su detección se realizan montajes de branquias, cutícula y pleópodos para análisis en fresco. Se observan al microscopio de luz las formas bien definidas de estos protozoarios epicomensales (Lightner, 1996). Para poder controlar estos protozoarios es necesario tener buena calidad de agua de cultivo, proporcionar buena alimentación y desinfectar los estanques entre cosechas. En laboratorio, para el control de protozoarios en reproductores, se utilizan los baños con formalina, a 150 ppm durante una hora; este proceso se repite durante los tres días siguientes (Morales, 2004).

### **Enfermedades causadas por Hongos**

#### **Fusariosis**

El principal agente etiológico que produce esta infección micótica es un hongo imperfecto, que pertenece al género *Fusarium*, principalmente *Fusarium solani*. Esta especie de hongo infecta a juveniles y adultos de peneidos, y su distribución es mundial. Estos hongos se encuentran presentes en el suelo y en los detritos en forma natural constituyéndose como un patógeno oportunista al afectar organismos heridos o

estresados. Interfieren en el intercambio de gases, se dificulta su locomoción, alimentación y reproducción. La infección se da lentamente y puede llegar a ocasionar la muerte del camarón. Las infecciones causadas por *Fusarium solani* se ven marcadas por una respuesta inflamatoria a las lesiones en la cutícula del cuerpo, branquias "Enfermedad de las branquias negras" y apéndices, seguida de una intensa melanización (Brock 1992, Lightner 1996). A menudo se observan otras regiones melanizadas, tales como los flagelos antenales, los tallos del ojo, pereiópodos, urópodos y telson. Las lesiones melanizadas están asociadas a las abrasiones cuticulares, heridas y las "quemaduras químicas" que son encontradas a menudo en un camarón infectado por *Fusarium* sp. Se detecta por medio de análisis en fresco en montajes de las partes afectadas como son: branquias, cutícula y pleópodos.

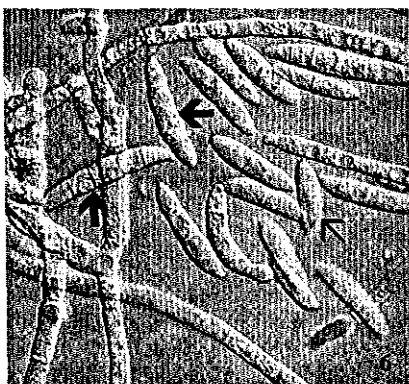


Figura 13. Macronidias del género *Fusarium*, donde se observa su forma bien definida. Fotografía tomada de Lightner, 1996.

En las muestras se observan las macronidias, típicas del género (en forma de canoa), así como infiltración hemocítica, melanización y necrosis (Lightner, 1996). Para prevenir la infección se recomienda evitar el exceso de materia orgánica en los estanques de cultivo, manejar la densidad de siembra de la especie de camarón a cultivar de acuerdo con el nivel de susceptibilidad reportado y cosechar inmediatamente los estanques afectados (Morales y Chávez 1999; Morales 2004), puesto que si se mantiene el hongo *Fusarium* en la algún estanque se tiene el riesgo de que otros estanques se contaminen, por lo cual se recomienda mantener las condiciones de sanidad adecuadas para la prevención de un nuevo brote (Brock, 1992).

## OBJETIVOS

Objetivo General.

Vigilar y monitorear el estado de salud de los camarones en una granja durante un ciclo de cultivo, para determinar el inicio de un brote infeccioso y dar seguimiento a las enfermedades con el fin de evitar su dispersión utilizando análisis en fresco y tinción rápida como métodos de diagnóstico presuntivos.

### Objetivos particulares.

Establecer un programa de vigilancia que mediante análisis en fresco, permita la detección temprana de los diferentes patógenos, tomando las muestras de estanques elegidos al azar.

Llevar a cabo un programa de monitoreo en los estanques en donde se detecte alguna infección y/o infestación y darle seguimiento para determinar su prevalencia y severidad.

Buscar la posible relación entre la infección o infestación, con las condiciones estresantes del sistema de cultivo.

Evaluar histopatológicamente las diferentes patologías que se presenten y que sirvan como antecedentes para los siguientes ciclos mediante la toma de muestra de camarones al azar durante la cosecha.

### **HIPOTESIS**

La aplicación de un programa de vigilancia y monitoreo de la salud de los camarones cultivados favorece una alta tasa de sobrevivencia y producción.

No aplicar un programa de vigilancia y monitoreo de la salud de los camarones cultivados favorece a un aumento en la mortalidad y baja en la producción.

### **JUSTIFICACION**

La aplicación de un sistema de vigilancia y monitoreo de salud en granjas de camarón, utilizando técnicas de diagnóstico presuntivas del nivel I, como análisis en fresco y tinción rápida, permiten la detección temprana de diversas enfermedades infecciosas, además de infestaciones por parásitos y epibiontes, lo cual favorecerá en la aplicación de medidas de control para evitar su dispersión y/o lograr su erradicación.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Zona de estudio**

La granja de estudio, se encuentra ubicada en el margen derecho del sistema lagunar Huizache-Caimanero (figura 14), aproximadamente a 8.8 Km. de la línea de costa del Océano Pacífico, a 5 Km. del poblado de Agua Verde, Municipio de El Rosario, Sinaloa.

El sistema lagunar abarca una superficie aproximada de 175 km<sup>2</sup> y las lagunas se encuentran comunicadas por un estrechamiento que se conoce como Pozo de la Hacienda. En este ecosistema se encuentran recursos pesqueros tales como camarón, lisa, mojarra, chihuil, puyequé, róbalo y langostino.

La marisma del Huizache tiene aproximadamente 40.7 km<sup>2</sup> y recibe influencia marítima del estero "El Ostial" y "Agua Dulce" por un canal de desviación procedente del Río Presidio. Los esteros de la Anona y El Pozo del Caimán, reciben agua de los Ríos



Presidio y Baluarte. La laguna el Caimanero tiene una superficie aproximada de 134.3 km<sup>2</sup> y recibe influencia marítima a través del estero "Agua Dulce".

Se presentan 2 principales períodos hidrológicos: Período 1. Época de secas, que comprende de Noviembre a Junio, con salinidades entre 26.5 y 35.8 ‰ ups (unidades prácticas de salinidad) y temperaturas entre 21.2 y 24.6°C; el Período 2. Época de lluvia que comprende de Julio a Octubre, con salinidades entre 1.6 y 10.4 ‰ ups y temperaturas promedio entre 28.1 a 35.0°C. Ambas lagunas se encuentran amenazadas por el desarrollo acuícola, obras de canalización y disminución de las inundaciones cíclicas tanto de marea como del río Baluarte.

El sistema ha sido ampliamente descrito desde el punto de vista geológico y del desarrollo lagunar por varios autores, entre ellos están: Chapa y Soto (1969); Ayala-Castañares *et al.*, (1970); Phleger y Ayala-Castañares (1972).

Por otro lado, el sistema lagunar Huizache y Caimanero es reconocido como un importante refugio natural de aves que han adoptado estos lugares para fines de alimentación, crecimiento, madurez y migraciones. De acuerdo con algunos reportes, forma parte del área de invernación del pelícano blanco y de al menos siete especies de patos. En cuanto a aves playeras se han contabilizado alrededor de 200,000 individuos de avoceta (*Recurvirostra americana*).



**Figura 14. Fotografía tomada con el satélite Landsat 7, banda 4, 2000. Ubicación de la granja: Laguna Huizache-Caimanero, Rosario, Sinaloa.**

### Vigilancia y monitoreo

El programa de vigilancia de enfermedades a nivel I (observación de las características y comportamiento de los organismos, análisis en fresco y tinción rápida) se inició una vez que los camarones alcanzaron el peso de 1 gr., debido a que se supone por las medidas de bioseguridad practicadas durante la compra de la Postlarva (fue entregada con un certificado de salud que indicó que no se había detectado WSSV, TSV, YHV).

Por lo tanto durante el primer mes, los camarones no deben presentar problemas y además porque a tallas menores es muy difícil capturarlos con atarraya.

La vigilancia se realizó en seis estanques seleccionados al azar. Cuando se detectó algún signo de enfermedad u observó mortalidad en alguno de los estanques bajo muestreo, se realizó una colecta selectiva de los organismos, iniciando así un programa de monitoreo, para determinar el comportamiento de la afectación determinando su prevalencia y severidad.

### Prevalencia y grados de severidad

#### Prevalencia

Para calcular el porcentaje de prevalencia de infecciones virales de los organismos colectados se utilizó la siguiente fórmula (Bush *et al.*, 1997):

$$\text{Prevalencia} = \left( \frac{\text{número de hospederos infectados}}{\text{número de hospederos examinados}} \right) / 100$$

La severidad se calculó de acuerdo a la tabla de Lightner, (1996).

Tabla 1. Valor numérico cualitativo de grado de severidad a la infección, infestación, enfermedad y síndrome (Lightner, 1996).

Grados de severidad	Signos Clínicos
0	No presentan signos de infección por patógenos, parásitos o epicomensales. No presentan lesiones características de síndromes
1	Presencia muy baja de patógenos, parásitos o epicomensales. En aquellos donde se tiene un número estándar permitido, éste se encuentra justo arriba del límite normal. Se observan muy pocas lesiones características del síndrome.
2	Se observa la presencia baja y moderada de patógenos, parásitos o epicomensales. Se observan muchas lesiones características del síndrome. Incremento en la mortalidad si no se aplica el tratamiento (cuando existe tratamiento).

- 3 Se observa la presencia moderada de patógenos, parásitos o epicomensales. Se observan muchas lesiones características del síndrome. Potencialmente letal si no se aplica tratamiento (cuando existe tratamiento).
- 4 Se observa gran cantidad de patógenos, parásitos o epicomensales. Se observan severas lesiones características del síndrome. Muy letal con altas mortalidades.

### Selección de los estanques y tamaño de la muestra

Para seleccionar estanques al azar, se siguió el método del muestreo espacial de Cameron (2002), el cual consistió en obtener un mapa o croquis de la granja, cuadrangular la zona de los estanques en 200 cuadros. Posteriormente se numeran del 1 al 200 y se seleccionan al azar el 5 % del total de los cuadros que en este caso es 10. A continuación se identifican los estanques que quedaron dentro de los cuadros con los números seleccionados. La granja seleccionada para esta tesis cuenta con 23 estanques y para este estudio se seleccionaron los estanques 2, 4, 6, 11, 16 y 18.

El tamaño de la muestra fue de 10 organismos por estanque por semana de acuerdo a la tabla de Amos, (1987) y utilizada ampliamente por Lightner, 1996, la cual proporciona un 95 % de confianza que de haber una infección y/o infestación dentro del estanque en el muestreo debe haber especímenes infectados, asumiendo una prevalencia del 20 % . No se nos permitió realizar colectas mayores a 10 organismos por estanque por muestreo.

**Tabla 2. Tamaño de muestra, basado en la prevalencia de la enfermedad que se asume existe en una población. Amos, (1987).**

Tamaño del lote	Tamaño de muestra asumiendo una prevalencia de ...			
	2 %	5 %	10 %	20 %
50	50	35	20	8
100	75	45	23	8
250	110	50	25	8
500	130	55	26	8
1,000	140	55	27	10
1,500	140	55	27	10
2,000	145	60	27	10
4,000	145	60	27	10
10,000	145	60	27	10
> 100,000	150	60	30	10

### **Método de colecta de los organismos y manejo de los mismos durante los análisis.**

Las muestras de camarón se obtuvieron de dos formas, la primera fue tomándolos al azar mediante las canastas de alimentación (organismos de 1 gr. hasta 7 gr.) y la segunda fue con la ayuda de una atarraya (de los 7 gr. en adelante). Los organismos colectados en cada muestreo, fueron introducidos en recipientes de 20 litros con suficiente agua del mismo estanque, para después depositarlos en bolsas y trasladarlos al laboratorio de análisis patológicos de la granja. Los organismos fueron colocados en recipientes de 20 litros con aireación hasta el momento de su análisis, tratando de que se estresaran lo menos posible.

### **Análisis en fresco**

La técnica de análisis en fresco consiste en tomar mediante la disección de cada organismo, muestras de hepatopáncreas, intestino, branquias y músculo para sus análisis y observar si presentan alteraciones (Morales y Chávez, 1999).

Para la realización del análisis en fresco se requiere contar con espacio limpio en donde se tenga material como: microscopio compuesto con objetivos de 10, 40 y 60x, portaobjetos, cubreobjetos, bisturí, pinzas de disección, tijeras finas de disección, tabla de disección, pizetas, guantes, agua de mar estéril o filtrada.

Para llevar a cabo esta técnica primero se miden y se pesan los organismos, posteriormente se selecciona una porción de cada tejido u órgano. Cada porción se coloca en un mismo portaobjetos limpio, se les adiciona unas gotas de agua estéril y se pone el cubreobjetos.

Las muestras a analizar son:

- a) Branquias: Con tijeras finas se toma una pequeña porción y se coloca en el portaobjetos para buscar: epibiontes, hongos, bacterias, melanizaciones, deformaciones etc.
- b) Hepatopáncreas: Se separa el exoesqueleto del cefalotórax por la parte posterior para descubrir el hepatopáncreas. Se toma el hepatopáncreas y se observa la coloración (color normal verde oscuro), el tamaño del hepatopáncreas para decidir si hay atrofia (reducción de tamaño) o hipertrófia (aumento de tamaño) de este órgano. Con un bisturí se parte por la mitad y se observa la coloración del fluido. Se toma una pequeña muestra y se coloca en un portaobjetos para buscar: túbulos deformes, presencia de masas bacterianas, presencia de células lipídicas, MBV y BP.
- c) Intestino: El abdomen, se separa del telson y urópodos para facilitar la extracción del intestino. Por la parte posterior se localiza el intestino que puede o no contener hilo fecal, con una pinza fina (sin dientes) se extrae con cuidado y se coloca en un portaobjetos de la siguiente manera: uno de los extremos del intestino se detiene con una pinza con el portaobjetos ligeramente inclinado, se presiona ligeramente el intestino y con las pinzas se jala para extraer el contenido que se analiza al

microscopio para buscar: gregarinidos (gametocistos, trofozoitos y sicigias), nemátodos, MBV y BP.

- d) Músculo: Se toma una pequeña muestra de músculo, especialmente el que muestre opacidad o de tipo lechoso, se coloca en un portaobjetos y se presiona para facilitar la búsqueda de microsporidios.

Las muestras ya preparadas se analizan en el microscopio iniciando con el objetivo de menor aumento y finalizando con el de mayor. Se anota todo lo que se observa en cada uno de los objetivos en la hoja de reporte (anexo 1) para después calcular el porcentaje de prevalencia y determinar el grado de severidad que presente la muestra para finalizar con el diagnóstico presuntivo.

### **Análisis en fresco con tinción rápida**

La técnica de tinción rápida (Morales y Chávez, 1999) se utilizó para monitorear el virus de WSSV en tejidos como cutícula, branquia y estómago en camarones que presentaron señales de estrés o de estar infectados por el virus, con el fin de determinar la prevalencia y el grado de severidad.

Para la realización de él método de tinción rápida se necesitó contar con el siguiente material: microscopio óptico con 10x, 40x y 80x, solución Davidson-HCl, Etanol a diferentes concentraciones, hematoxilina de Mayer, eosina, xileno, pinzas, navajas de disección, portaobjetos, cubreobjetos, cajas de Petri, tubos eppendorf, resina sintética, papel absorbente y guantes.

Para llevar a cabo el procedimiento de la tinción rápida se requiere medir y pesar a los organismos para obtener un promedio, posteriormente se toma una muestra de cutícula y branquias y se coloca en el tubo eppendorf con fijador Davidson – HCl durante 1 hr, para luego lavar con agua corriente por 15 min. Después se adiciona alcohol etílico al 100 % durante 2 minutos, repitiendo la operación dos veces más para luego adicionar alcohol al 96 % durante 2 minutos, e igualmente repitiendo dos veces más. Después se lava con agua corriente por 10 min. y se le añade a la muestra la hematoxilina de Mayer durante 10 min. y después lavar con agua corriente por 15 min. Después se añade la eosina durante 1 – 2 min. para luego quitar el exceso con alcohol al 96 % por 2 minutos, con dos cambios y alcohol al 100 % por 2 minutos, con dos cambios. Para finalizar se adiciona xileno durante 30 segundos, con dos cambios y se monta la muestra adicionando una gota de resina sintética, y colocando el cubreobjetos para poder observar al microscopio iniciando con el objetivo de menor aumento y finalizando con el de mayor. Se deberá anotar todo lo que se observa en cada uno de los objetivos en la hoja de reporte (anexo 2), para después calcular el porcentaje de prevalencia y determinar el grado de severidad que presente la muestra para finalizar.

### **Análisis histológico**

Para contar con mayor información de las enfermedades que estuvieron presentes en la granja, se tomaron muestras de seis organismos para analizar mediante técnicas de histología en la mayoría de los estanques al final del ciclo de cultivo, específicamente durante la cosecha. La técnica que se siguió es la sugerida por Lightner (1996). En esta técnica, la rapidez en la fijación de los organismos es requisito importante para

obtener una buena preparación de laminillas histológicas; una fijación inadecuada de los organismos, puede dar por resultado una interpretación errónea.

Previo a la realización de la técnica histológica se fijaron rápidamente los organismos que mostraban el comportamiento y la apariencia anormal durante la cosecha. Se requirió contar con el siguiente material: solución Davidson-normal, frascos, jeringas, navaja, tabla de disección y papel absorbente.

Para el procedimiento de la fijación de los organismos fue necesario inyectar las muestras de juveniles, iniciando con el hepatopáncreas. Se inyectó todo el organismo. Posteriormente se realizó un corte con una navaja en la parte ventral, iniciando en el sexto segmento abdominal para terminar cerca del pedúnculo ocular. Finalmente la muestra se sumergió en el resto de la solución fijadora, manteniéndola en ella durante 48 horas. Después de transcurrido este tiempo de fijación, se desechó la solución fijadora y se enjuagó la muestra con agua dulce para retirar el exceso de fijador. Posteriormente a la muestra se le adicionó alcohol etílico al 70 %, donde permaneció hasta embeber las muestras en parafina.

Las muestras fijadas se trasladaron al laboratorio de histología para la continuación del procesamiento. Para la realización del embebido en parafina se requirió contar con el siguiente material: alcohol etílico al 50 %, alcohol etílico al 80 %, alcohol etílico al 96 %, alcohol etílico al 100% (absoluto), xileno, parafina, moldes para embeber, contenedores para deshidratación, tabla de disección, pinzas, navajas, guantes y papel absorbente.

El procedimiento de muestras para embebido en parafina consta de los siguientes pasos: (1) Se saca la muestra del alcohol al 70 % y se pone sobre una superficie limpia (tabla de plástico), para realizar la disección. Mediante un solo corte de navaja, se separa el cefalotórax y el abdomen. (2) Se corta longitudinalmente el cefalotórax para obtener dos secciones, se cortan y se desechan los pleópodos y pereiópodos de la muestra. (3) De la primera sección, se realiza un corte ventral longitudinal del cefalotórax y se coloca en el contenedor para ser deshidratado y embebido en parafina. (4) De la segunda sección se toman las branquias retirando la cutícula y se depositan en el contenedor de deshidratación. (5) Posteriormente, se realiza un corte longitudinal del abdomen, para efectuar un corte trasversal y así obtener el sexto segmento abdominal, se pone en el contenedor de deshidratación. (6) Las muestras son deshidratadas y bañadas en parafina en un deshidratador de tejidos (histoquinete Tissue- Tek II 4640-B), de la siguiente manera: (a) dos baños separados (de una hora cada uno) de alcohol etílico al 70 %. (b) dos baños separados (de una hora cada uno) de alcohol etílico al 80 %. (c) dos baños separados (de una hora cada uno) de alcohol etílico al 96 %. (d) dos baños separados (de una hora cada uno) de alcohol etílico absoluto. (e) dos baños separados (de una hora cada uno) de xileno. (f) dos baños separados (de una hora cada uno) de parafina. (7) Para el embebido en parafina, las muestras se colocaron en moldes para formar bloques, con la ayuda de un histoembebedor Jung/Leica.

Los bloques se rebajan en un micrótopo Jung/Leica 820 a 20 micrómetros y se colocan en el descalcificador (preparación en anexos) durante una hora y media. Posteriormente, los bloques se cortan a 5 micras, después se montan en portaobjetos y se etiquetan para su posterior tinción.

Para la realización de la tinción de rutina, se requiere contar con el siguiente material: xileno, alcohol etílico al 50 %, alcohol etílico al 80 %, alcohol etílico al 96 %, alcohol etílico absoluto, hematoxilina, eosina-floxina, agua destilada, resina, guantes y papel absorbente.

La tinción de rutina, utilizada para muestras de camarón, es la hematoxilina-eosina/floxina (H&E) de Mayer-Bennett, la cual se realiza de la siguiente forma: (1) dos baños separados de xileno (de cinco minutos cada uno). (2) dos baños separados de etanol absoluto (de diez inmersiones cada uno). (3) dos baños separados de etanol al 95 % (de diez inmersiones cada uno). (4) dos baños separados de etanol al 80 % (de diez inmersiones cada uno). (5) dos baños separados de etanol al 50 % (de diez inmersiones cada uno). (6) seis enjuagues con agua destilada (cada enjuague se realiza con agua limpia). (7) se sumergen las muestras cinco minutos en hematoxilina (preparación en anexos). (8) se sumergen las muestras cuatro minutos, en un recipiente con agua dulce, que tenga flujo continuo y se realizan cinco inmersiones. (9) se sumergen las muestras por dos minutos en eosina-floxina (preparación en anexos). (10) dos baños separados de etanol al 96 % (de diez inmersiones cada uno). (11) dos baños separados de etanol absoluto (de diez inmersiones cada uno). (12) cuatro baños separados de xileno (de diez inmersiones cada uno). (13) las muestras se montan con resina sintética. (14) las muestras son colocadas en un horno a 58 °C durante 24 horas. (15) se etiquetan las muestras para poder observar al microscopio, iniciando con el de menor aumento y finalizando con el de mayor. Se deberá anotar todo lo que se observa en cada uno de los objetivos en la hoja de reporte (anexo 3), para después calcular el porcentaje de prevalencia y determinar el grado de severidad que presente la muestra para finalizar.

### **Análisis de parámetros ambientales**

Los análisis sobre la calidad del agua de cada estanque muestreado fueron proporcionados por los responsables de la granja, con el fin de poder evaluar y relacionar posibles cambios drásticos del ambiente con brotes de enfermedades. Los datos proporcionados fueron promedios de cada semana. No se facilitó la información diaria de todo el ciclo de cultivo.

### **Análisis estadísticos**

Para comprobar si hay diferencias significativas en cada una de las variables biológicas y fisicoquímicas de los estanques estudiados, se determinaron las condiciones de normalidad y homoscedasticidad para posteriormente aplicar un ANOVA de una vía (Kruskall-Wallis) (Zar, 1996). Para saber cual estanque fue diferente significativamente, se aplicó un análisis de comparación múltiple (Tukey test) (SigmaStat, v3.1). También se aplicó un análisis de ordenación de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) en el programa Multivariate Statistical Package (MVSP versión 3.01, Kovach Computing Services). Las variables incluidas en este análisis fueron salinidad, temperatura y oxígeno (matutino y vespertino) y las prevalencias de las variables biológicas (deformación tubular, epicomensales y gregarinas). Los datos fueron centrados, estandarizados y transformados logarítmicamente (en base 10). Los puntajes de los ejes principales de las variables bióticas fueron correlacionados con los

puntajes de los ejes principales de las variables ambientales (López-Portillo y Ezcurra, 1989).

## RESULTADOS

### ANÁLISIS EN FRESCO

#### Calendario de muestreos

El programa de vigilancia y monitoreo se inició el día 3 de junio finalizando del 14 al 23 de septiembre, debido que el último muestreo fue quincenal. Se realizaron un total de 16 muestreos semanales.

Tabla 3. Calendario de muestreos.

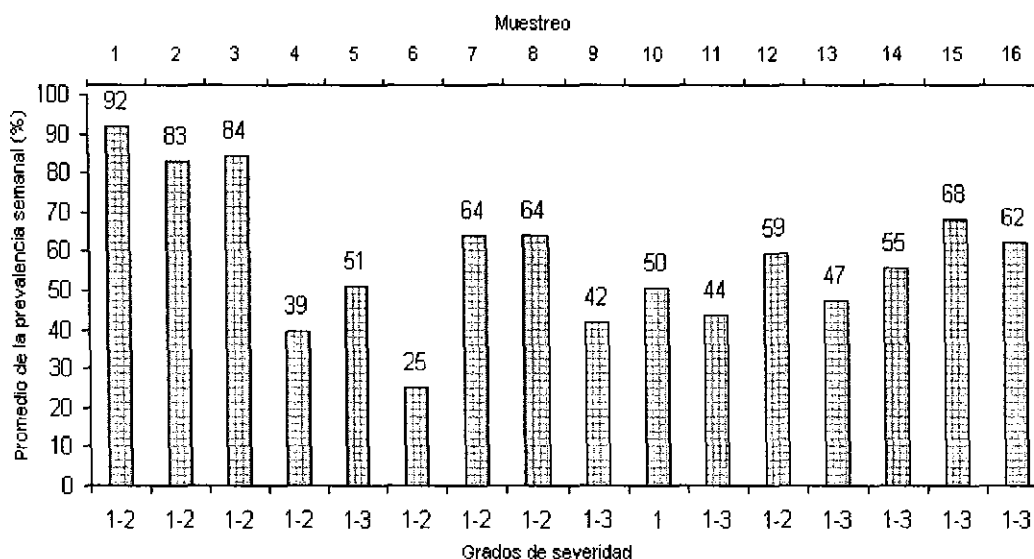
Calendario de muestreos		
Mes de muestreo	Día de muestreo	Estanques muestreados
Junio	3, 9, 16, 23 y 30.	2, 4, 6, 11, 16 y 18.
Julio	6, 12, 20 y 29.	2, 4, 6, 11, 16 y 18.
Agosto	4, 10, 16, 23 y 31.	2, 4, 6, 11, 16 y 18.
Septiembre	8 y 14-23.	2, 4, 6, 11, 16 y 18.

Debido a que no se presentaron problemas durante el período de estudio, no fue necesario realizar muestreos extras a los establecidos en los estanques seleccionados.

#### Deformación tubular en hepatopáncreas

Durante los tres primeros muestreos, los promedios de la prevalencia semanal de los seis estanques en estudio (PPS-SEE), se mantuvieron entre 83 y 92 %. Observándose un decremento drástico en la prevalencia de 84% en el muestreo 3 a 39 % durante el muestreo cuatro. En el muestreo cinco se presentó un incremento a 51 %. El PPS-SEE que presentó menor porcentaje de prevalencia fue en el muestreo seis (25 %). Observándose un fuerte incremento de 25 a 64 % durante el muestreo seis, siete y ocho. A partir de este muestreo se mantuvo la prevalencia en rangos medios, oscilando entre 22 y 62 % hasta el muestreo dieciséis (gráfica 1).





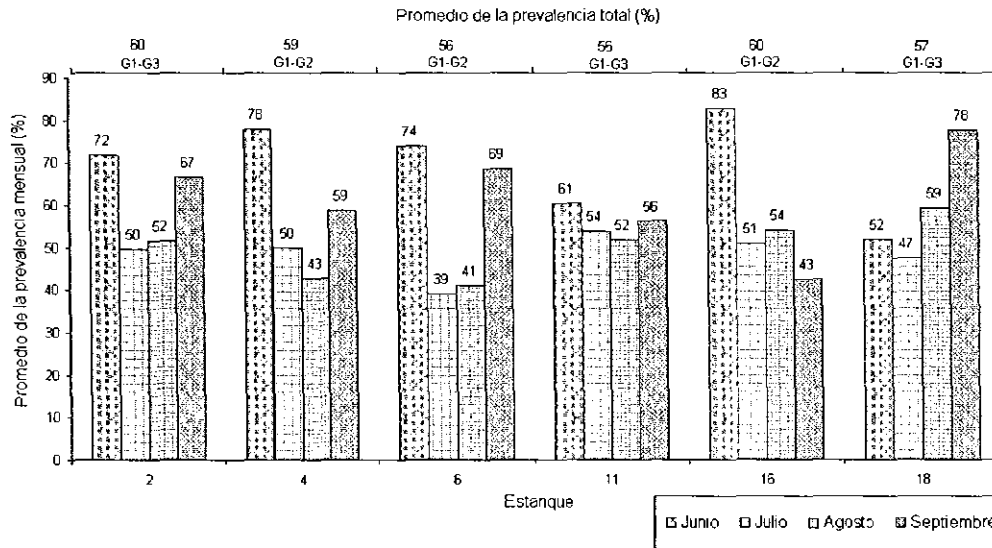
Grafica 1. Promedios de las prevalencias semanales y grados de severidad de deformación tubular en hepatopáncreas en los seis estanques en estudio a través del tiempo

El promedio total de la prevalencia de deformación tubular en hepatopáncreas en los seis estanques en estudio (PPT-SEE) fue del 58 % con grados de severidad 1 y 2 (G1 y G2) principalmente, aunque se llegaron a encontrar camarones en G3. El promedio de la prevalencia total de deformación tubular en el estanque 2 fue del 60 % en G1, G2 y G3, en el estanque 4 fue del 59 % en G1 y G2, en el estanque 6 se calculó una prevalencia promedio total del 56 % en G1 y G2, en el estanque 11 fue del 56 % en G1, G2 y G3, en el estanque 16 fue del 60 % en G1 y G2 y para el estanque 18 fue de 57 % en G1, G2 y G3 (grafica 2).

Con estos resultados se sabe que en los seis estanques en estudio (2, 4, 6, 11, 16 y 18) se encontraron camarones con deformación tubular en el hepatopáncreas. Es importante mencionar que durante todo el ciclo de cultivo se observó esta afectación en G1 y G2 aunque se llegaron a observar camarones en G3.

En el mes de junio, se observaron los promedios de las prevalencias mensuales más altas de esta afectación en los estanques 2, 4, 6, 11 y 16. Es interesante observar que en los meses de Julio y Agosto se presentaron las prevalencias más bajas de esta afectación y que durante el mes de Septiembre se observó un aumento en la prevalencia de deformación tubular en los estanques 2, 4, 6, 11, y 18.

Durante el mes de junio, en el estanque 16, se presentó el promedio de la prevalencia mensual más alto (83 %), donde el 70 % de los camarones presentaron G1 y el 13 % en G2 (grafica 2).



Grafica 2. Promedio de la prevalencia total, mensual y grados de severidad de la deformación tubular en el hepatopáncreas de los seis estanques en estudio.

El 30 de Junio (estanque 2), 29 de Julio (estanque 11), 10 de Agosto (estanque 2), 23 de Agosto (estanque 4, 6, 11 y 18) se diagnosticaron camarones con G3 de deformación tubular en hepatopáncreas. Observándose en estos organismos la mayor cantidad de túbulos deformes.

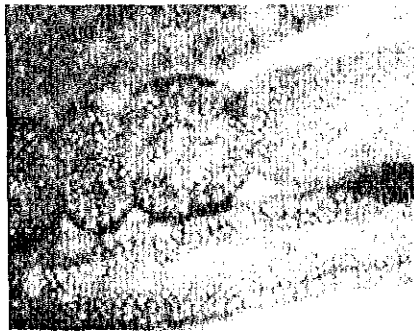


Figura 15. Hepatopáncreas con túbulo estrangulado y túbulo normal. Fotografía tomada a 60X de Morales, 2004.

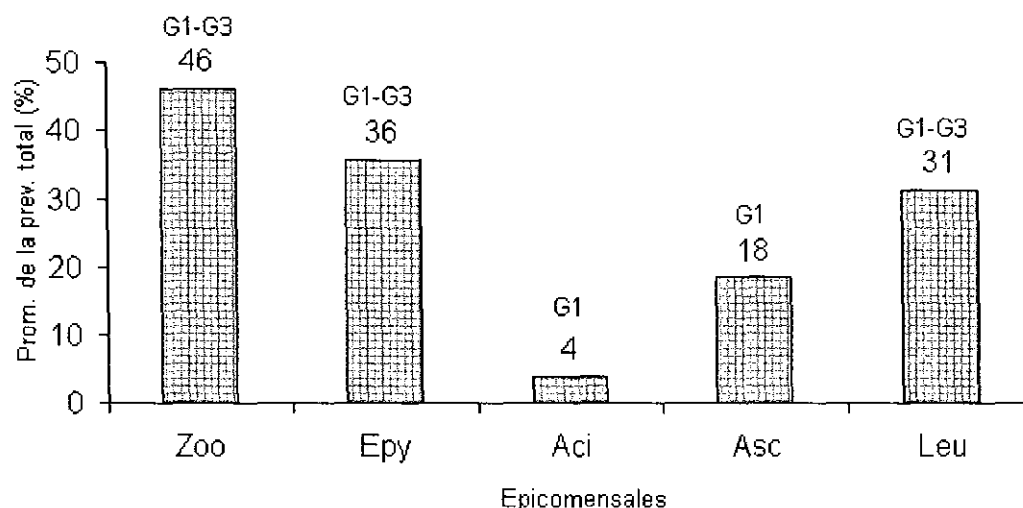
Nunca se enviaron muestras para confirmar por histopatología o por técnicas de PCR si las observaciones de la técnica presuntiva eran reales o no y a que se debían.

### Bacterias

Durante el programa de vigilancia mediante análisis en fresco no se observaron nódulos hemocíticos en hepatopáncreas o erosiones bacterianas del caparazón que dieran indicios de infecciones severas por bacterias.

## Epicomensales

Los organismos epicomensales estuvieron presentes durante todo el ciclo de cultivo. *Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp., *Leucothrix mucor*, *Ascophrys* sp. y *Acineta* sp. fueron detectados al menos en un período del ciclo de cultivo. Las tres primeras especies predominaron en cuanto a la prevalencia y abundancia de organismos en las branquias de los camarones analizados (grafica 3).

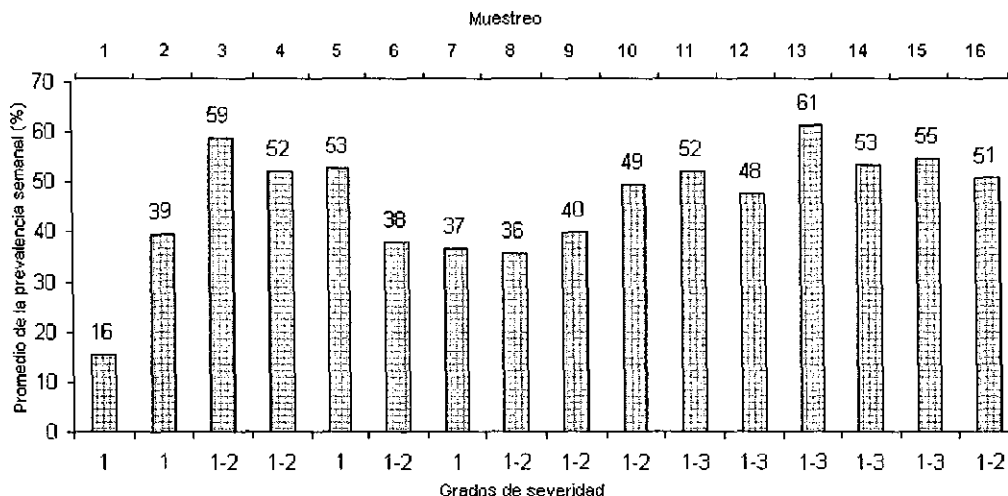


Grafica 3. Promedio de la prevalencia total de epicomensales en los seis estanques en estudio.

Es importante mencionar que *Acineta* sp. presentó un brote repentino en los estanques 4, 6, 11, y 16 durante el muestreo 13 (23 Agosto), presentando grado de severidad 3 y 4. Esta especie no fue detectada en el estanque 18 durante todo el ciclo de cultivo. *Ascophrys* sp. fue detectado en todos los estanques en grado de severidad 1 principalmente, aunque se llegaron a encontrar camarones en grado dos.

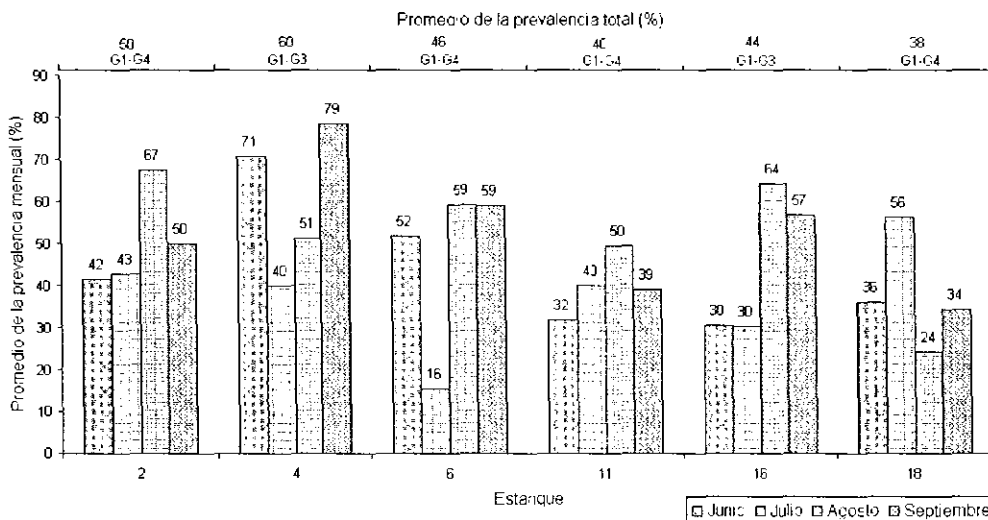
### *Zoothamnium* sp.

El promedio de la prevalencia semanal de *Zoothamnium* sp. varió en el período de estudio de 16% (semana uno – 3 de junio) a 61% (semana 13 – 23 de agosto). El resto del ciclo se mantuvo oscilando entre estos dos valores (grafica 4).



Grafica 4. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad semanales de *Zoothamnium* sp. en los seis estanques en estudio.

Esta especie resultó ser el epicomensal “predominante” durante todo el ciclo de cultivo pues se determinó una prevalencia total de 46 % en G1 y G2 principalmente, aunque se encontraron algunos camarones con infestaciones mas graves, diagnosticándose grados de severidad de 3 y 4. En la grafica 5 se muestra el promedio de la prevalencia total y mensual por estanque y grado de severidad total, así también se observa cual de los estanques resultaron con las mayores prevalencias.



Grafica 5. Promedio de la prevalencia total, mensual y grados de severidad de *Zoothamnium* sp. en branquias de camarones de los seis estanques en estudio.

Con estos resultados se sabe que esta afectación se encuentra en los seis estanques en estudio durante todo el ciclo de cultivo. El promedio de la prevalencia mensual (PPM) más alto se reporta en el estanque 4, durante el mes de Septiembre (79 %). El PPM menor se observó en el estanque 6 (16 %), en el mes de Julio.

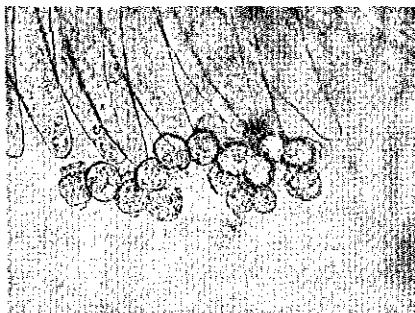
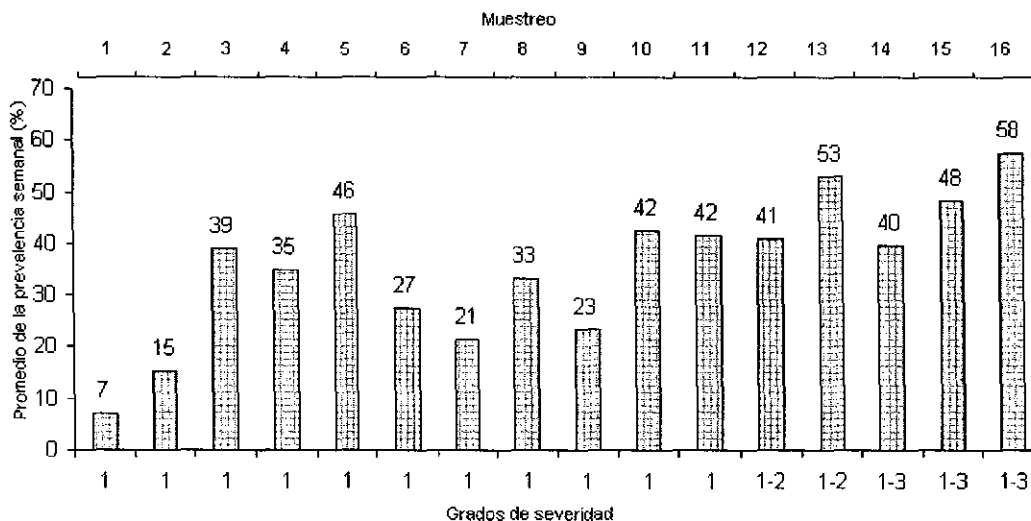


Figura 16. *Zoothamnium* sp. en branquias de camarones cultivados. Fotografía tomada a 40X mediante análisis en fresco.

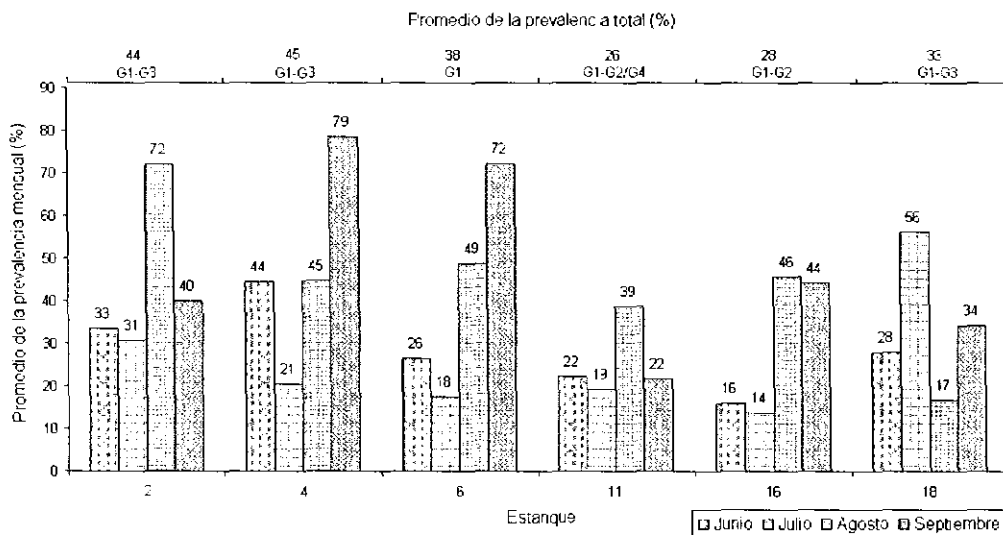
#### *Epistylis* sp.

Del muestreo de la semana uno a la tres, hubo un incremento de 7 a 39% en el promedio de la prevalencia semanal de los seis estanques en estudio (PPS-SEE). El PPS-SEE se mantuvo entre 35 y 46 % durante el muestreo tres, cuatro y cinco. Observándose un decremento en la prevalencia de 46% en la semana 5 a 21% durante el muestreo seis y siete. El PPS-SEE se mantuvo oscilando de 21 a 33 % durante el muestreo siete, ocho y nueve. En el muestreo diez se presentó un incremento a 42 %. Entre el muestreo diez, once y doce el PPS-SEE se mantuvo oscilando entre 41 y 42 %. Los muestreos número trece y dieciséis presentaron el PPS-SEE más altos (53 y 58 %, respectivamente). Durante el muestreo catorce, quince y dieciséis, el PPS-SEE se observa en incremento (grafica 6).



Grafica 6. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad de *Epistylis* sp. en los seis estanques en estudio conforme al tiempo.

*Epistylis* sp. resultó tener la segunda prevalencia más alta (en cuanto a organismos epicomensales) durante todo el ciclo de cultivo. El promedio de la prevalencia total de esta especie en los seis estanques en estudio, fue de 36 % en G1 y G2 principalmente, y en algunos camarones en G3. El promedio total de prevalencia de *Epistylis* sp. en el estanque 2 fue de 44 % en G1, G2 y G3, en el estanque 4 fue de 45 % en G1, G2 y G3, observándose como el de mayor prevalencia. En el estanque 6 fue de 38 % en G1, solamente. En el estanque 11 fue (prevalencia total más baja) de 26 % en G1 y G2 principalmente, encontrándose también camarones en G4, en el estanque 16 fue de 28 % en G1 y G2, en el estanque 18 fue de 33 % en G1, G2 y G3 (grafica 7).



Grafica 7. Promedio de la prevalencia total y grados de severidad de *Epistylis* sp. en los seis estanques en estudio.

En el estanque 2, 4 y 18 se diagnosticaron camarones en G3. Sólo en el estanque 11 se encontraron camarones con grado de severidad de 4. Así también, se observa como los estanques 2, 4 y 6 de 11 Ha cada uno, presentan mayores prevalencias que los estanques 11, 16 y 18 con 1.5 Ha de superficie cada uno.

El promedio de la prevalencia mensual mayor de esta especie fue en el estanque 4 en el mes de Septiembre (79 %), seguido del estanque 6 en mismo mes (72 %) y por último en el estanque 2 en el mes de Agosto (72 %). Estos fueron los promedios de la prevalencia más altos durante todo el ciclo de cultivo (ver grafica 7). Los promedios de prevalencia más bajos se dieron en el estanque 16 en los meses de junio y julio (16 y 14 % respectivamente), seguidos del estanque 18 en el mes de Agosto (17 %) (grafica 7).

En la grafica 7 se observa claramente que los estanques 11, 16 y 18, que son estanques pequeños de 1.5 Ha, prevaleció menos este epicomensal. Reinterando lo observado en *Zoothamnium* sp., pues se presentaron mayores promedios de la prevalencia total en los estanques 2, 4 y 6 (estanques grandes, 11 Ha de espejo de agua).

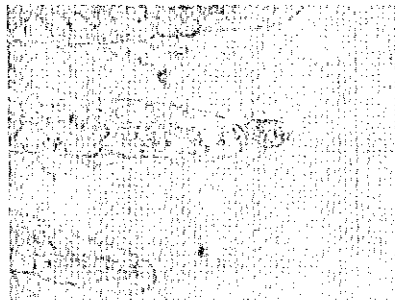
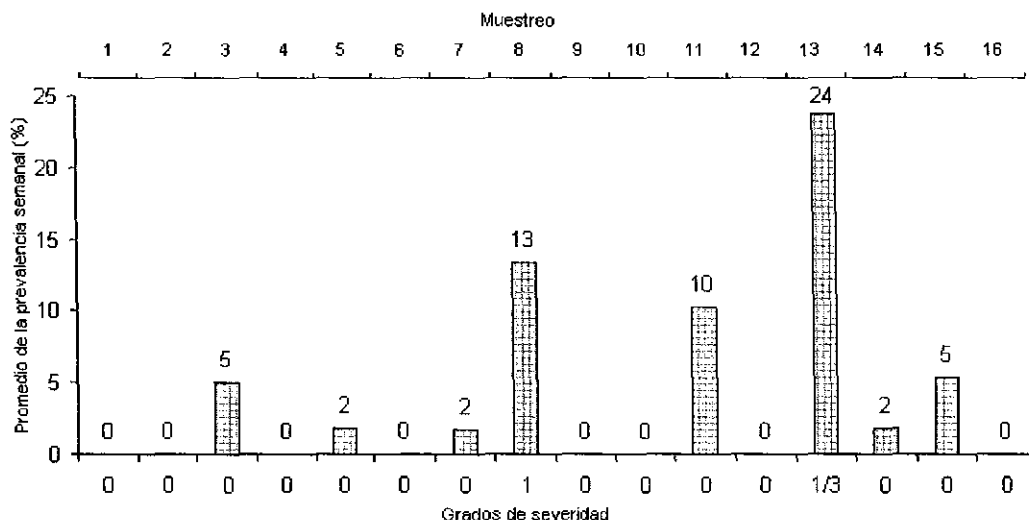


Figura 17. *Epistylis* sp. en branquias de camarones cultivados. Fotografía tomada a 40X mediante análisis en fresco.

Con estos resultados se observa claramente que en el mes de Julio se reportan los promedios de las prevalencias mensuales más bajos, observándose un incremento en el promedio de la prevalencia mensual en el mes de Agosto (grafica 7).

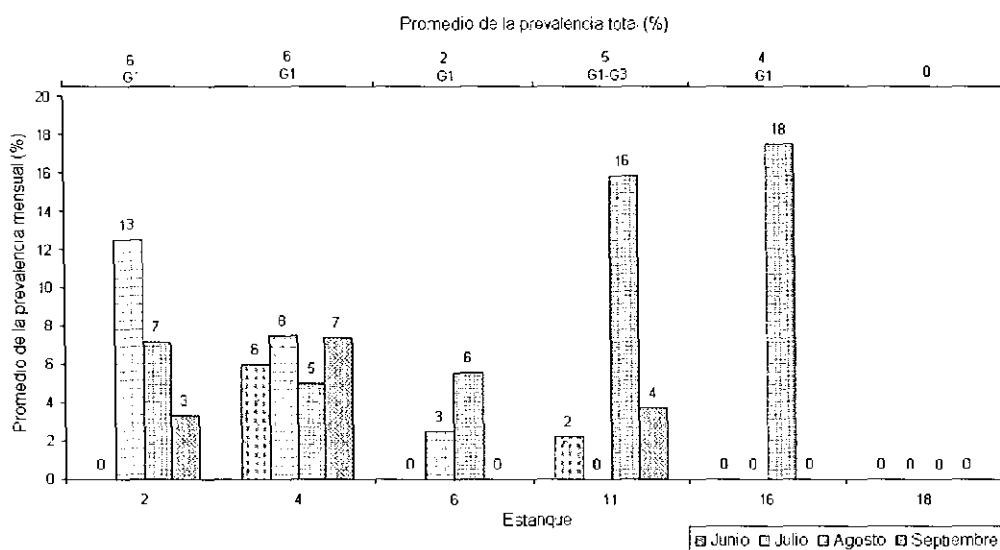
#### *Acineta* sp.

El promedio de prevalencia de *Acineta* sp.. durante las 16 semanas de muestreo fue muy irregular variando de cero en los muestreos 1,2,4,6 ,9, 10,12 y 16 y presentándose una prevalencia de 2 a 24 en el resto de los muestreos (gráfica 8).



Grafica 8. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad de *Acineta* sp. en los seis estanques en estudio a través del tiempo.

*Acineta* sp. resultó ser el organismo epicomensal con menor prevalencia durante el ciclo de cultivo. El promedio de la prevalencia total de esta especie en los seis estanques en estudio, fue de 4 % presentándose con un grado de severidad de 1 (G1) principalmente, pero llegándose a encontrar algunos camarones en G2 y G3 dentro del estanque 16. El promedio de la prevalencia de *Acineta* sp. en el estanque 2 fue de 6 % en G1, en el estanque 4 fue de 6 % en G1, observándose como el estanque de mayor prevalencia. En el estanque 6 fue de 2 % en G1, en el estanque 11 fue de 5 % en G1, en el estanque 16 fue de 4 % en G1 principalmente, encontrándose camarones en G2 y G3, y en el estanque 18 no se encontró presencia de este epicomensal (grafica 9).





Grafica 9. Promedio de la prevalencia total, mensual y grados de severidad de *Acineta* sp. en branquias de camarones de los seis estanques en estudio.

Los resultados de la gráfica indican que *Acineta* sp. prevaleció más en los estanques 2 y 4 y no se detectó presencia alguna de este epicomensal en el estanque 18. Solo en el estanque 11 se detectaron camarones con G2 y G3.

El promedio de la prevalencia mensual mayor de esta especie se calculó en el mes de Agosto en el estanque 16, mes en el cual, todos los estanques (excepto el 18), se observó la presencia de este epicomensal.

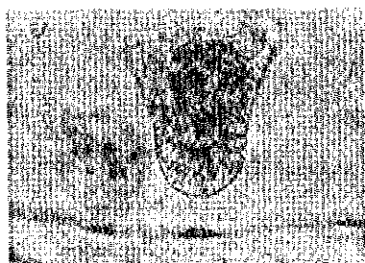
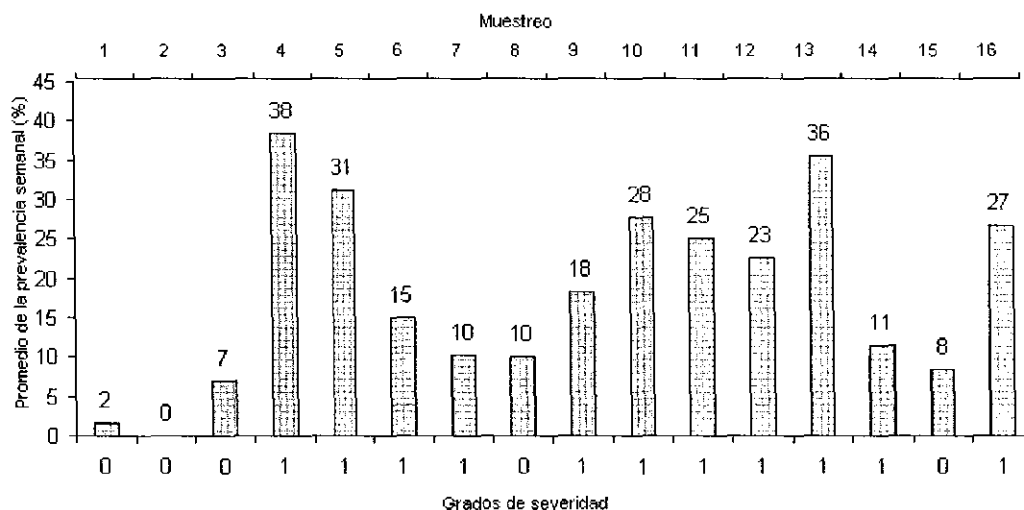


Figura 18. *Acineta* sp. en branquias de camarones. Fotografía tomada a 60X mediante análisis en fresco. Tomada de Morales, 2004.

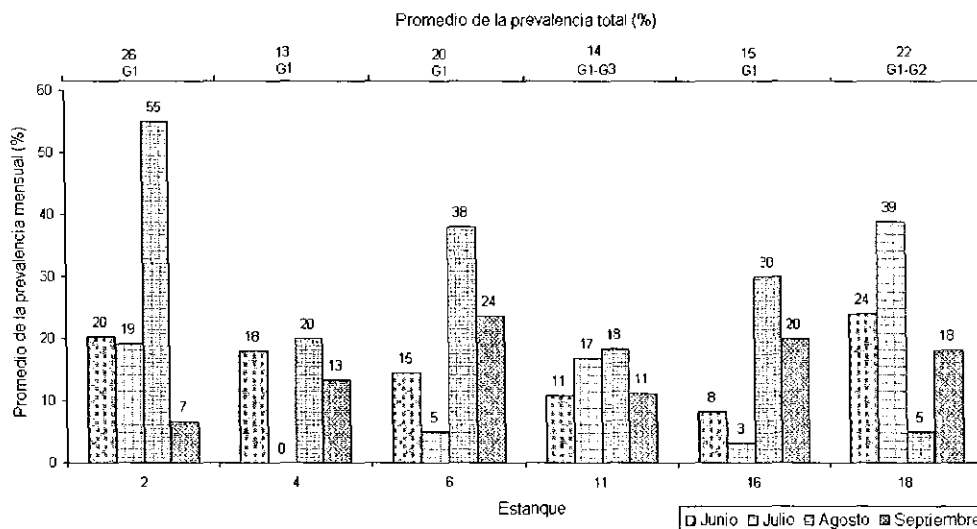
#### *Ascophrys* sp.

Los promedios de la prevalencia de *Ascophrys* sp. durante los 16 muestreos fueron muy variables mostrando una serie de altibajos a lo largo del ciclo. Las prevalencias más altas se presentaron en los muestreos 4 y 13 y los más bajos al inicio del ciclo de cultivo y en las semanas 14 y 15 (grafica 10).



Grafica 10. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad de *Ascophrys* sp. en los seis estanques en estudio a través del tiempo.

El promedio de la prevalencia total de *Ascophrys* sp. en los seis estanques en estudio fue de 18 % en G1 (ver grafica 3). El promedio de la prevalencia final del estanque 2 fue de 26 % en G1, en el estanque 4 fue de 13 % en G1, en el estanque 6 fue de 20 % en G1, en el estanque 11 fue de 14 % en G1 y G2 principalmente, encontrándose camarones en G3, en el 16 fue de 15 % en G1 y en el 18 fue de 22 % en G1 y G2 (grafica 11).



Grafica 11. Promedio de la prevalencia total, mensual y grados de severidad de *Ascophrys* sp. en branquias de camarones de los seis estanques en estudio.

*Ascophrys* sp. resultó ser el cuarto epicomensal que predominó durante el ciclo de cultivo, que se presentó en los seis estanques muestreados, que la prevalencia más alta se presentó en el mes de agosto en todos los estanques con excepción del 18.

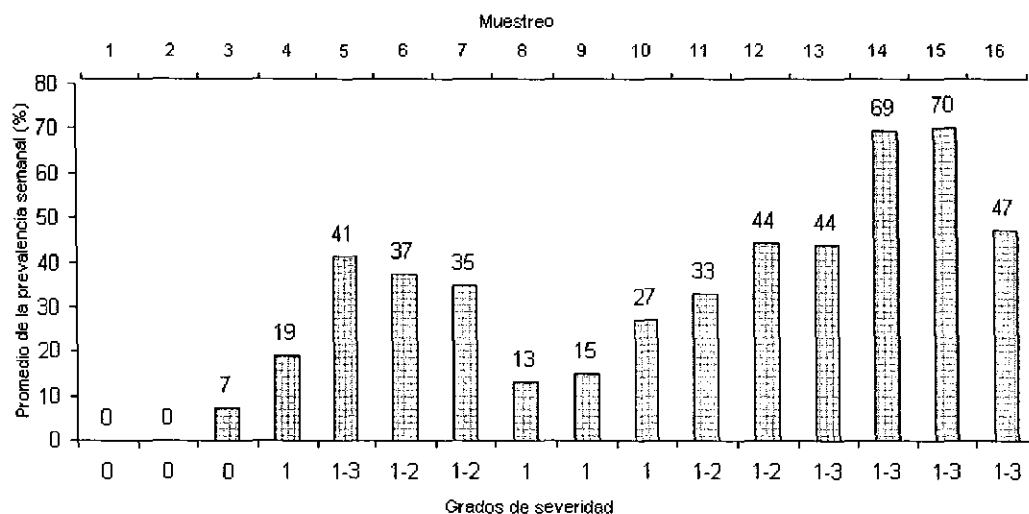
Los resultados indican que esta infestación se encontró en los seis estanques en estudio. Calculándose el promedio de la prevalencia mensual más alto en el mes de Agosto, en el estanque 2 (55 %). El mes de Julio fue el que presentó los promedios de la prevalencia más bajos, en los estanques 4, 6 y 16 (0, 5 y 3 % respectivamente). No se observó un patrón muy claro del comportamiento de este epicomensal a través del tiempo (grafica 11).



Figura 19. Muestra de branquias; se observa el *Ascophrys* sp. causando mecanización en las dendobranquias. Fotografía tomada a 40X mediante análisis en fresco. Tomada de Morales, 2004.

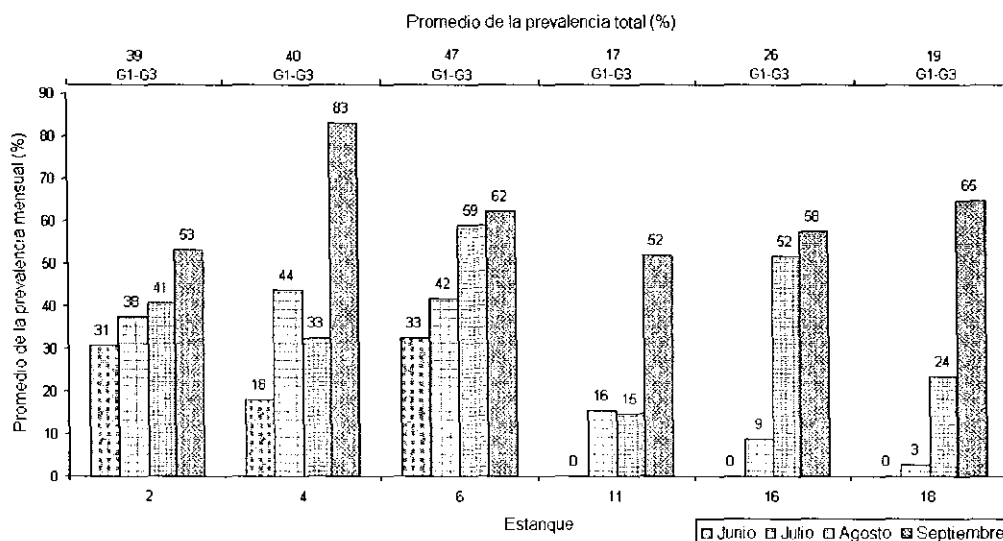
### *Leucothrix mucor*

El promedio de la prevalencia semanal de *Leucothrix mucor* presentó una alternancia de altas y bajas prevalencias a lo largo del ciclo, una subida del muestreo 3 al 5 para descender en los muestreos 6 al 9 y empezar el ascenso en la semana 10 hasta la 14 para bajar otra vez en el muestro 16 (grafica 12).



Grafica 12. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad de *Leucothrix mucor* en los seis estanques en estudio durante el tiempo.

El promedio de la prevalencia total de *Leucothrix mucor* en los seis estanques en estudio fue de 31 % en G1, G2 y G3. El promedio de prevalencia total del estanque 2 fue de 39 % en G1, G2 y G3, en el estanque 4 fue de 40 % en G1, G2 y G3, en el estanque 6 fue de 47 % en G1, G2 y G3, en el estanque 11 fue de 17 % en G1, G2 y G3, en el estanque 16 en G1, G2 y G3 y en el estanque 18 fue de 19 % en G1, G2 y G3 (grafica 13).



Grafica 13. Promedio de la prevalencia total, mensual y grados de severidad de *Leucothrix mucor* en branquias de camarones de los seis estanques en estudio.

Estos resultados indican que *Leucothrix mucor* se encuentra en todos los estanques en estudio. Aquí también surge algo interesante, en la Grafica 13, se observa un claro agrupamiento de variables. Quedando como Grupo 1 los estanques 2, 4 y 6 (estanques grandes), y en Grupo 2 los estanques 11, 16 y 18 (estanques pequeños). Esta grafica nos indica que esta bacteria filamentososa se encuentra en mayor prevalencia en las branquias de camarones cultivados en estanques del grupo 1. Resultados compartidos entre los tres epicomensales *Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp. y *Leucothrix mucor*.

El estanque 4 en el mes de Septiembre se presentó el promedio de la prevalencia mensual más alto (83 %). En la grafica 13, se observa claramente que conforme el ciclo de cultivo fue avanzando, el promedio de la prevalencia mensual fue en aumento.

Con estos resultados se sabe que los camarones de los estanques 2, 4 y 6, presentaron bacterias filamentosas durante todo el ciclo de cultivo. Difiriendo de los estanques 11, 16 y 18, los cuales durante el mes de junio no se observó presencia alguna de *Leucothrix mucor*.

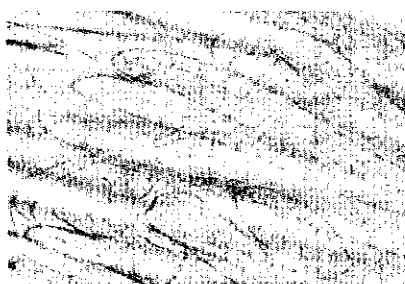
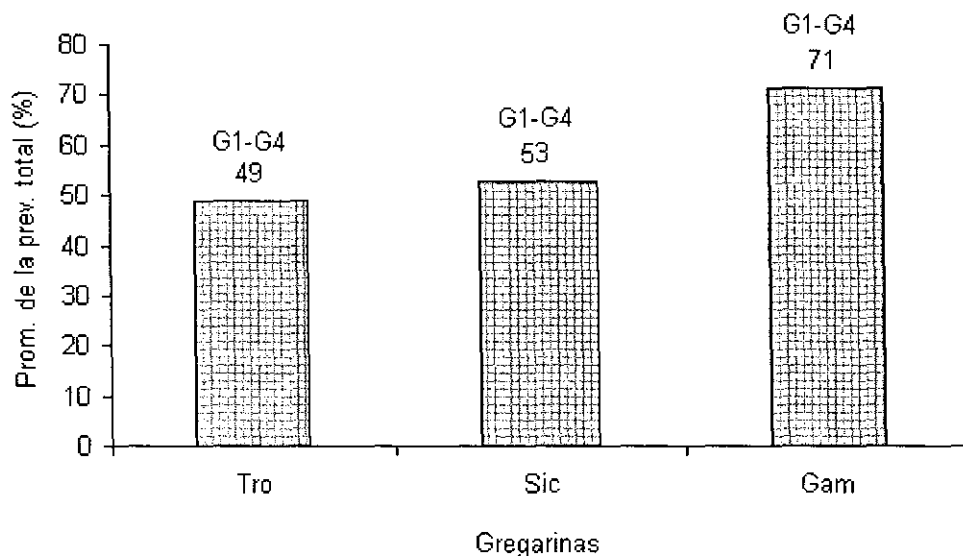


Figura 20. *Leucothrix mucor* en branquias de camarones. Fotografía tomada a 40X mediante análisis en fresco. Tomada de Morales, 2004.

## Gregarinas

Los gregarinidos en sus diferentes estadios (trofozoítos, sicigias y gametocistos) fueron encontrados durante todo el ciclo de cultivo. Los gametocistos presentaron el promedio de la prevalencia total más alto, el cual fue de 71 por ciento (grafica 14).

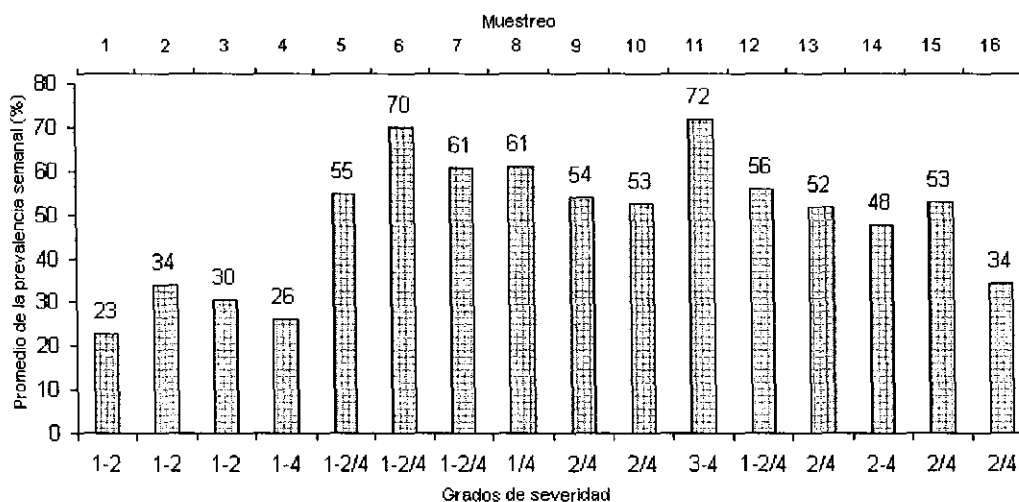


Grafica 14. Promedio de la prevalencia total de gregarinas en diferentes estadios en los seis estanques en estudio.

La parasitosis por gregarinas en intestino estuvo presente durante todo el ciclo de cultivo, el comportamiento de las gregarinas en sus diferentes estadios se expone a continuación.

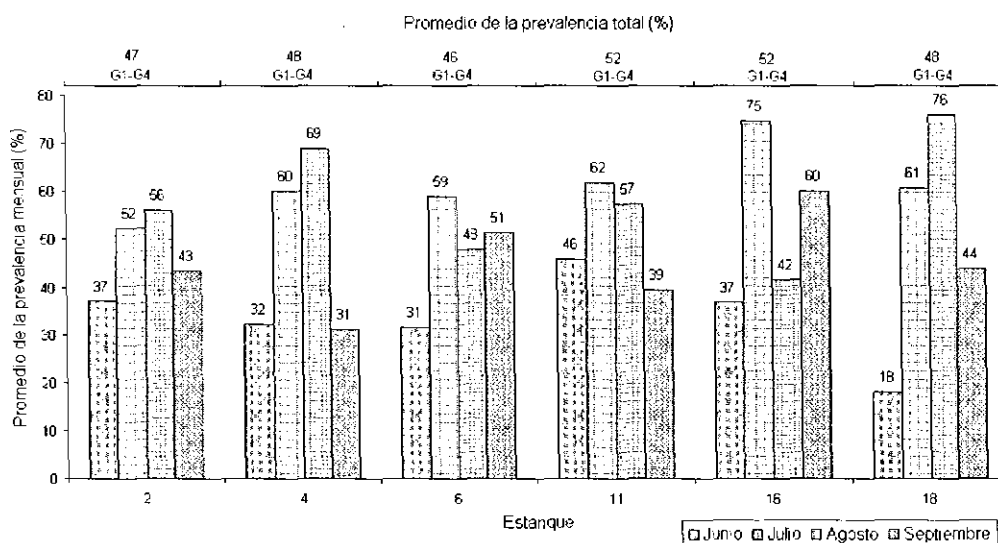
## Trofozoítos

El promedio de la prevalencia semanal de los seis estanques en estudio durante los muestreos uno a cuatro, se mantuvo entre 23 y 34 por ciento para incrementarse a 55 y 70% en los muestreos cinco y seis, posteriormente se mantuvieron arriba de 50% hasta el muestreo 16 que bajó a 34% (grafica 15).



Grafica 15. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad semanales de trofozoítos en los seis estanques en estudio.

El promedio de la prevalencia total de trofozoítos en los seis estanques en estudio fue de 49 % desde G1 hasta G4, en los cuales, se observaron prevalencias de 47, 48, 46, 52, 52 y 48 en los estanques 2,4,6,11,16 y 18 respectivamente (gráfica 16). Los meses de menor prevalencia fueron en el mes de junio al inicio del cultivo y los de mayor prevalencia fueron en julio y agosto. En el estanque 18 (mes de Junio) se presentó el promedio de la prevalencia mensual más bajo (18 %), con una variación hasta del 58 % con respecto al mes de Agosto en el mismo estanque que fue de 76 %.



Grafica 16. Promedio de la prevalencia total, mensual y grados de severidad de trofozoítos en intestinos de camarones en los seis estanques en estudio.

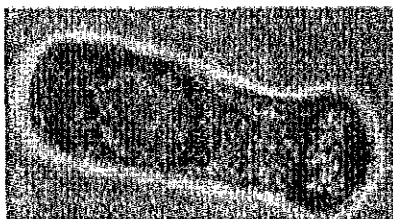
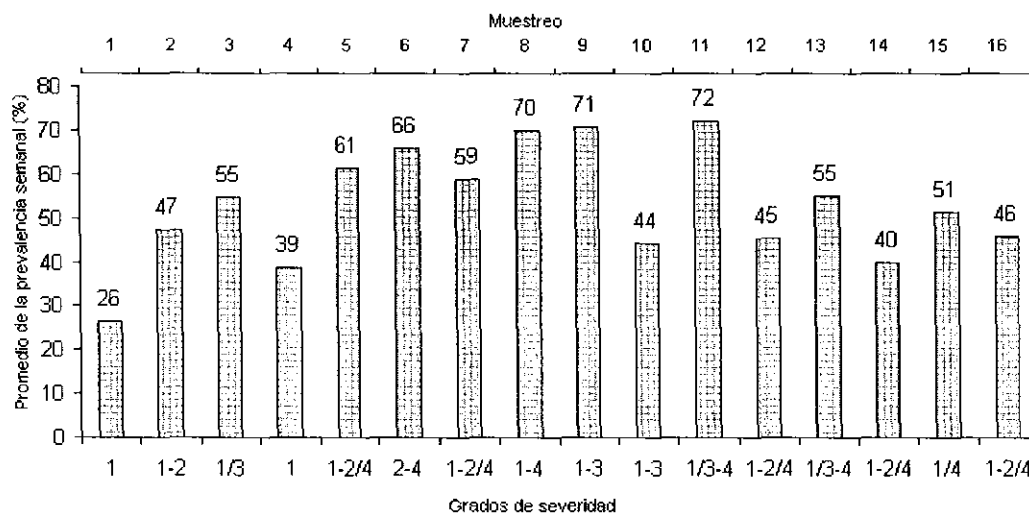


Figura 21. Gregarina en estadio de trofozoito. Fotografía tomada a 60X mediante análisis en fresco. Tomada de Morales, 2004.

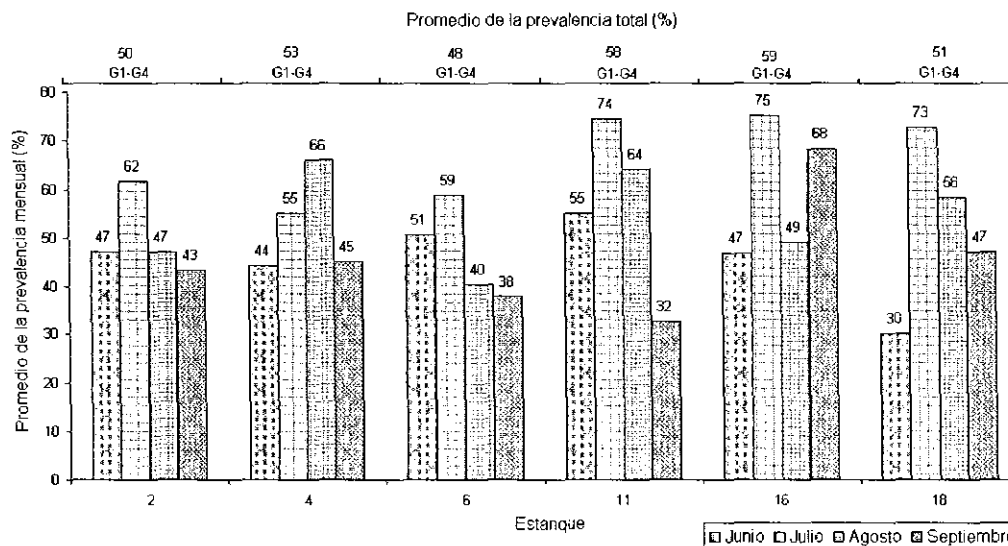
### Sicigias

La presencia de sicigias mostró un patrón de altibajos muy semejante al de los trofozoitos, siendo los primeros cuatro muestreos ligeramente más altos (de 26 a 55%) que en el caso de los trofozoitos (23 a 34), la prevalencia aumenta igualmente a partir del muestreo cinco y se mantiene arriba de 60% hasta el muestreo nueve para bajar en el 10 a 44% y volver a subir a 72% en el muestreo once. Posteriormente se mantiene entre 40 y 55% en los muestreos 12 a 16 (gráfica 17).



Gráfica 17. Promedio de la prevalencia semanal y grados de severidad semanales de sicigias en los seis estanques en estudio.

El promedio de la prevalencia total de las sicigias de cuatro y más divisiones en los seis estanques en estudio fue de 53 %. Los promedios de las prevalencias por estanque variaron de 48 a 58% en grados G1 a G4 (gráfica 18).



Grafica 18. Promedio de la prevalencia total y grados de severidad de sicigias en intestinos de camarones de los seis estanques en estudio.

Los promedios de las prevalencias más altas se calcularon durante el mes de julio en todos los estanques (excepto estanque 4). Los estanques 11, 16 y 18, presentaron los promedios de las prevalencias más altos (74 %, 75 % y 73 %, respectivamente). Los estanques 11 y 18, presentaron los promedios de las prevalencias mensuales más bajos (32 % (septiembre) y 30 % (junio), respectivamente) (ver grafica 18).

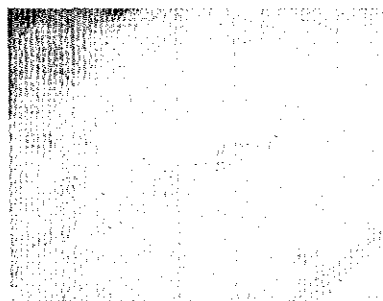
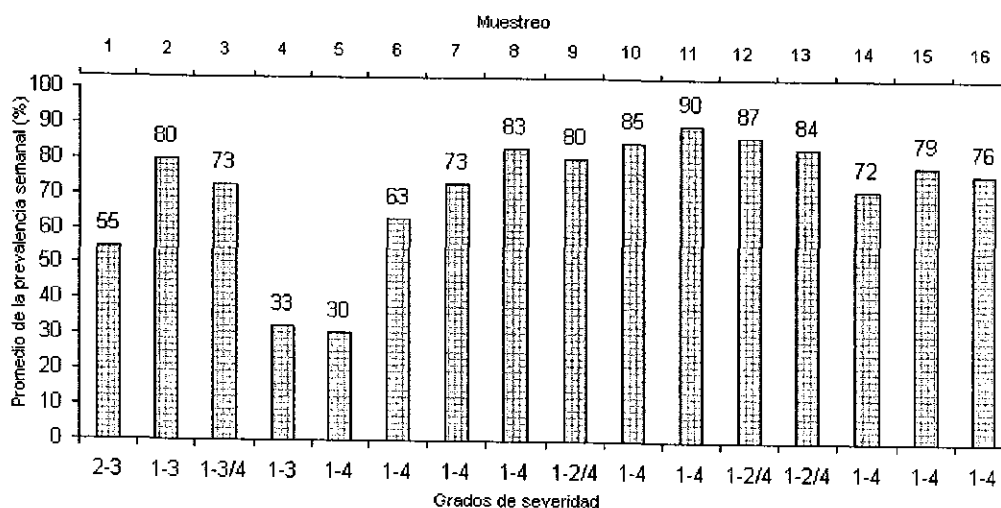


Figura 22. Gregarina en estadio de sicigia en intestino de camarones cultivados. Fotografía tomada a 40X mediante análisis en fresco.

### Gametocistos

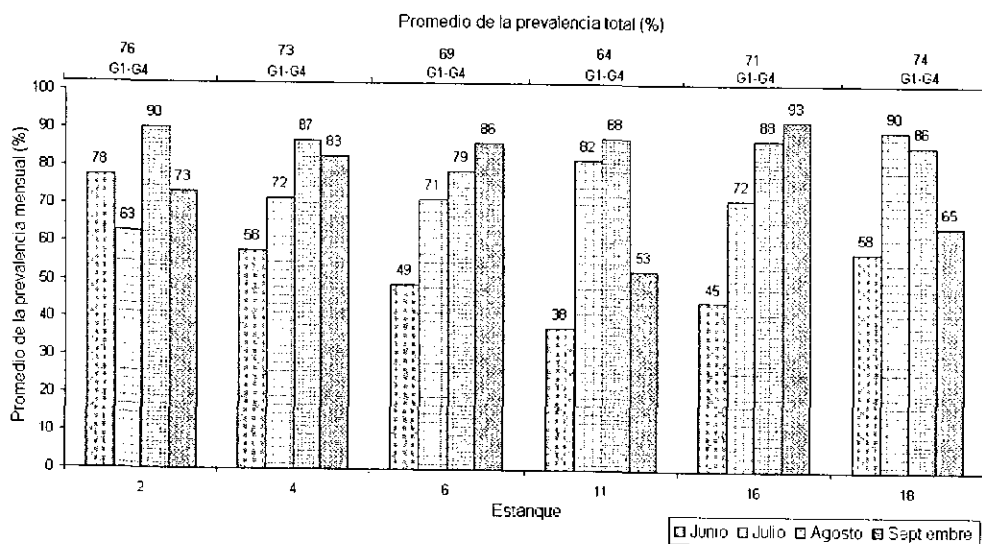
En el caso de las prevalencias de los gametocistos, éstas fueron más altas que la de los trofozoitos y zicigias y se mantuvieron arriba de 70% en todos los muestreos con excepción de los muestreos 1, 4, 5 y 6 en los que se presentaron prevalencias de 55, 33, 30 y 63% respectivamente.





Grafica 19. Promedio de la prevalencia semanal de gametocistos en los seis estanques en estudio.

Los resultados del promedio de prevalencia total de gametocistos en los seis estanques en estudio, revelan un 71 % en G1, G2, G3 y G4. Los promedios mensuales por estanque variaron de 69 a 76%. Los meses de mayor prevalencia variaron en los distintos estanques pero se observa una tendencia a ser mayor conforme avanza el tiempo de cultivo.



Grafica 20. Promedio de la prevalencia total de gametocistos en intestinos de camarones de los seis estanques en estudio.

En la grafica 20, se observa que el mes de Agosto y Junio se presentaron los promedios de las prevalencias más altos y bajos, respectivamente.

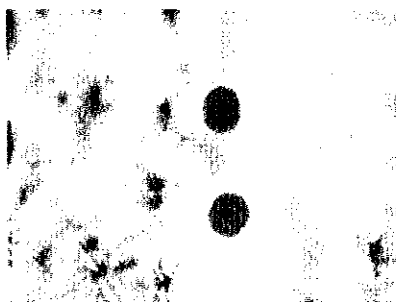


Figura 23. Gregarinas enquistadas en estadio de gametocisto en ciego posterior de intestino de camarones cultivados. Fotografía tomada a 40X mediante análisis en fresco.

### **TINCIÓN RÁPIDA**

Durante el período de vigilancia y monitoreo (1 de Junio-23 de Septiembre) no se observaron camarones con los signos de infección por WSSV. Aún así, se realizaron pruebas rápidas con tinción hematoxilina-eosina de Mayer-Bennet en camarones que presentaron; coloración rojiza (expansión de los cromatóforos rojos) y flacidez, sin embargo no se encontraron núcleos hipertrofiados con cuerpos de inclusión característicos de WSSV.

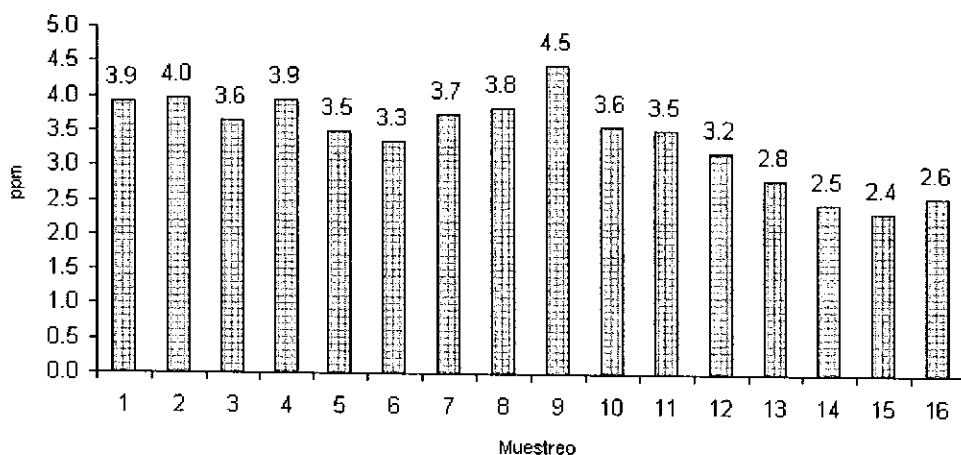
En un estudio paralelo, se detectó en el estanque 23 la presencia de DNA viral de WSSV mediante técnicas de PCR, poco antes de finalizar el período de vigilancia y monitoreo mediante análisis en fresco. Desafortunadamente por cuestiones de bioseguridad no se obtuvo el permiso requerido para iniciar con el programa de vigilancia y monitoreo mediante análisis en fresco otra vez.

La granja comenzó con la cosecha el 15 de Septiembre en el estanque 23. Los encargados de la granja suspendieron los muestreos patológicos el 23 de Septiembre debido que la cosecha había iniciado.

## VARIABLES FISICOQUÍMICAS

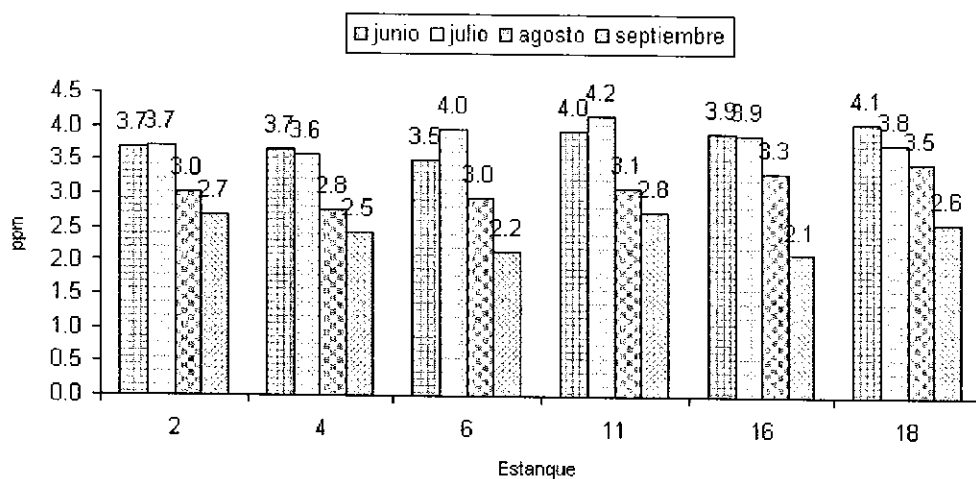
### Oxígeno disuelto matutino (5 am)

Los niveles de oxígeno disuelto matutinos promedio más altos, se presentaron durante los primeros nueve muestreos (correspondiendo a los meses de junio y julio). Posterior al muestreo nueve, los niveles de oxígeno disuelto matutino fueron en decremento (meses de agosto y septiembre) (grafica 21).



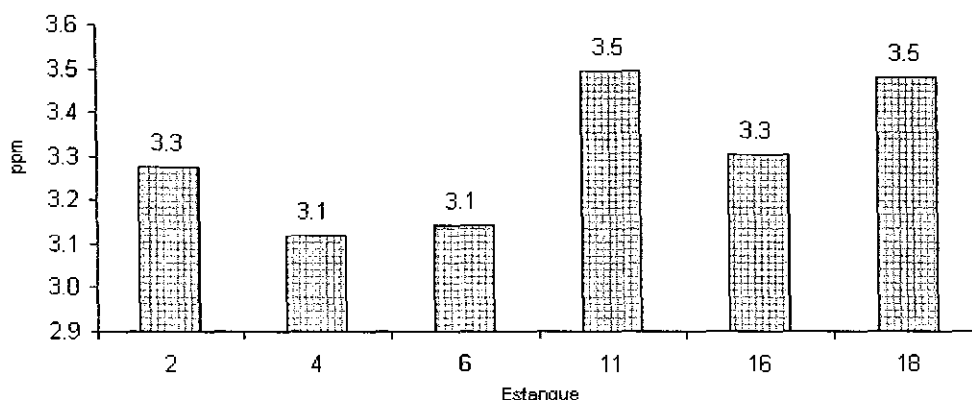
Grafica 21. Promedio semanal del oxígeno disuelto matutino de los seis estanques en estudio.

En la grafica 22 se observa que en los meses de junio y julio se presentaron los niveles de oxígeno disuelto matutino más altos. Por lo contrario, durante el mes de septiembre se presentaron los niveles de oxígeno disuelto matutino más bajos.



Grafica 22. Promedio mensual de oxígeno disuelto matutino en los seis estanques en estudio.

Los estanques 2, 4 y 6 presentaron el promedio total de oxígeno disuelto vespertino más bajo. Estos estanques, como ya se había mencionado anteriormente, son de 6.5 Ha. Difiriendo de los estanques 11, 16 y 18, que son de 1.5 Ha (grafica 23).

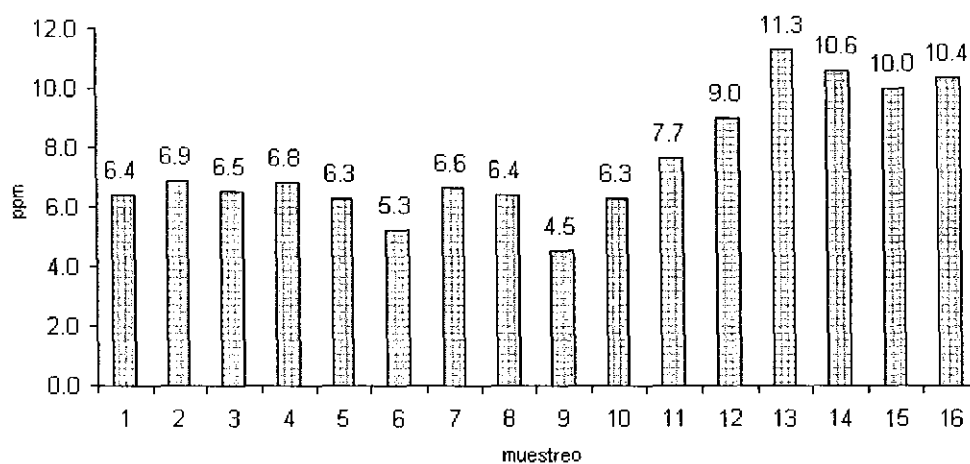


Grafica 23. Promedio total de oxígeno disuelto matutino en los seis estanques en estudio.

Al realizar el ANOVA de una vía, se observan diferencias significativas entre las concentraciones de oxígeno disuelto matutino ( $P=0.008$ ) en los diferentes estanques. En la tabla 5 se muestran cuales estanques presentaron estas diferencias.

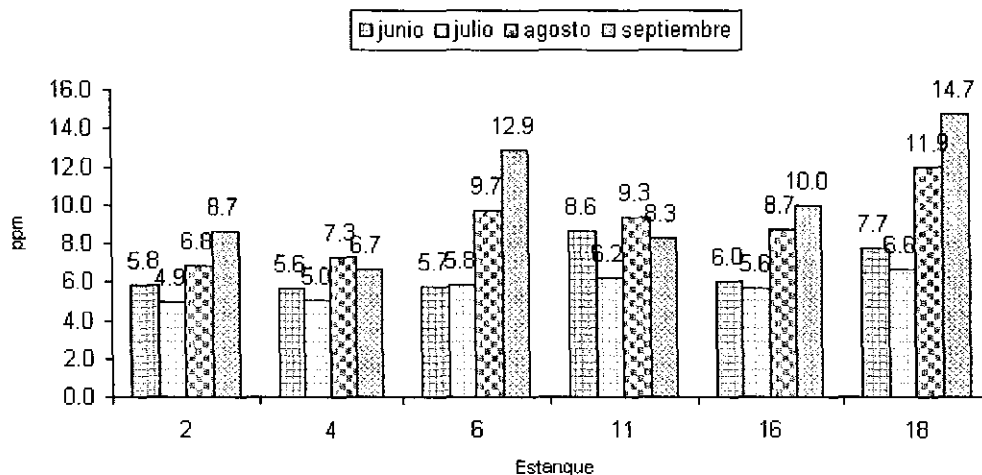
### Oxígeno disuelto vespertino (5 pm)

Los niveles medios de oxígeno disuelto vespertino más bajos se presentaron durante los primeros diez muestreos (correspondiendo a junio, julio y una fecha de agosto). Estos niveles se mantuvieron entre 6.3 y 6.9 ppm (excepto el muestreo seis y nueve) los cuales fueron los más bajos niveles durante el período de cultivo, siendo estos de 5.3 y 4.5 ppm respectivamente. Los niveles de oxígeno disuelto más altos se presentaron durante los últimos muestreos (agosto y septiembre) (grafica 24).



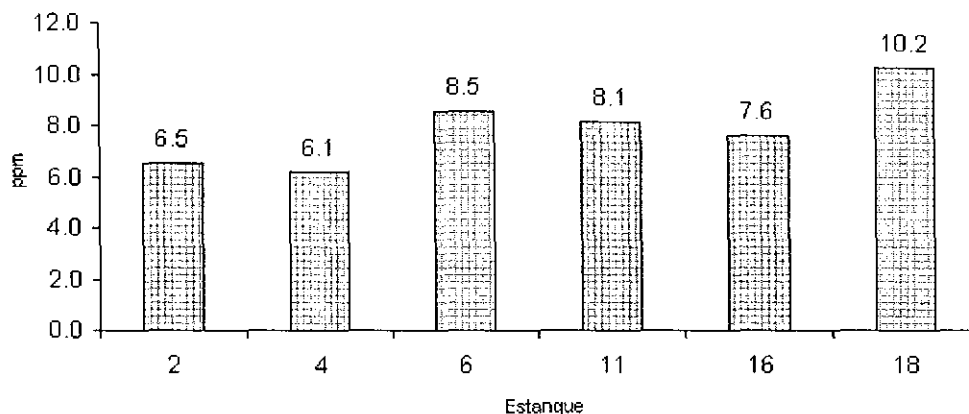
Grafica 24. Promedio semanal de oxígeno disuelto vespertino de los seis estanques en estudio.

En la grafica 25 se observa que en los meses de junio y julio se presentaron los niveles de oxígeno disuelto matutino más bajos (excepto estanque 11). Por el contrario, durante los meses de agosto y septiembre se presentaron los niveles de oxígeno disuelto matutino más altos (grafica 25).



Grafica 25. Promedio mensual de oxígeno disuelto vespertino en los seis estanques en estudio.

Los estanques 2 y 4 presentaron los promedios totales de oxígeno disuelto vespertino más bajos. Se observa que los estanques 11, 16 y 18, presentaron promedios totales de oxígeno disuelto vespertino altos. El estanque 6 se salió del patrón esperado entre la comparación de estanques de 6.5 Ha y 1.5 Ha, presentando un alto promedio total de oxígeno disuelto vespertino (grafica 26).

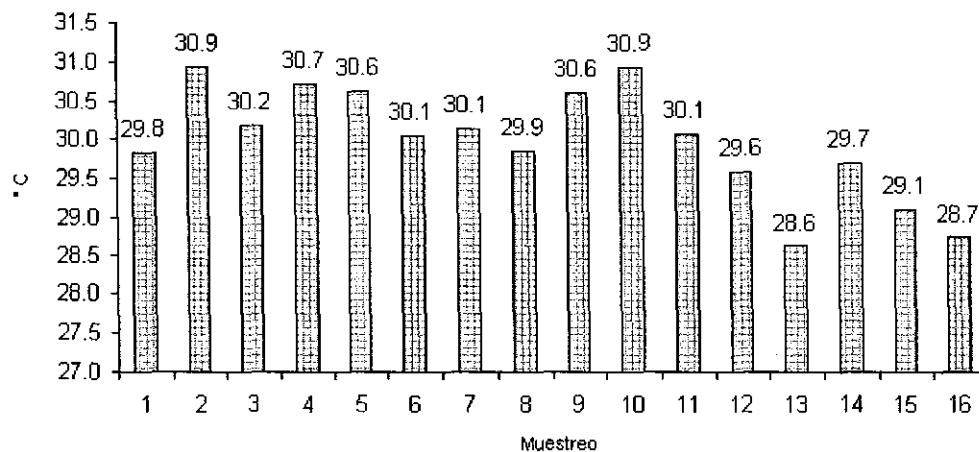


Grafica 26. Promedio total de oxígeno disuelto vespertino en los seis estanques en estudio.

Al realizar el ANOVA de una vía, se observan diferencias significativas entre las concentraciones de oxígeno disuelto vespertino ( $P < 0.001$ ) en los diferentes estanques. Los estanques 2, 4, 6 y 16 presentaron diferencias con respecto a los estanques 11 y 18 (Tabla 5).

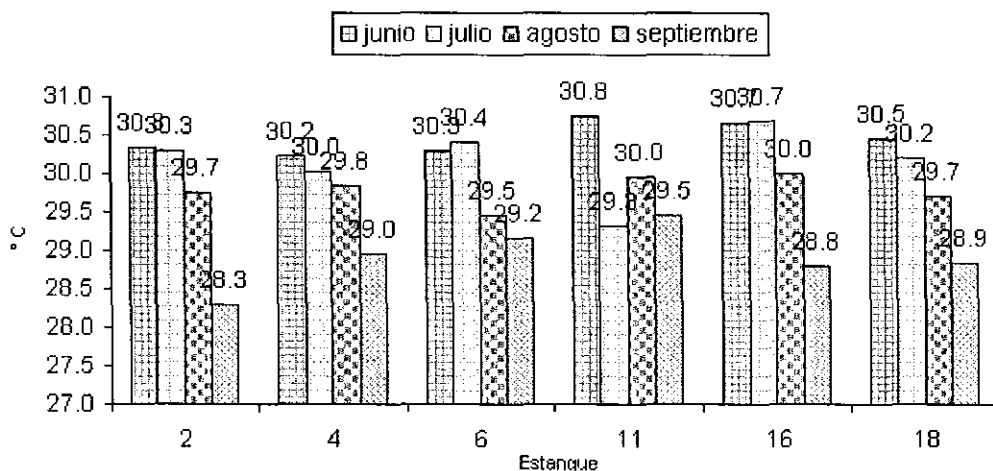
### Temperatura matutina (5 am)

El promedio semanal de la temperatura matutina, varió en los meses de cultivo de 28.6 a 30.9 °C (diferencia 2.3°C). En el muestreo trece (23 de Agosto) se presentó el promedio semanal más bajo de la temperatura matutina de los seis estanques en estudio (28.6 °C) (grafica 27). En esta fecha se observaron los más altos PPS-SEE de organismos epicomensales. Así también, durante esta fecha se detectó un incremento brusco en la prevalencia y abundancia de *Acineta* sp. En todos los estanques (excepto en el 18).



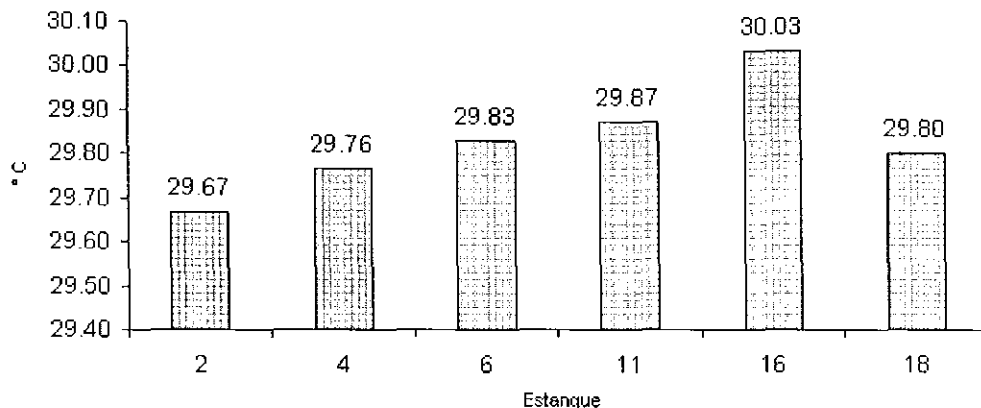
Grafica 27. Promedio semanal de la temperatura matutina de los seis estanques en estudio.

En la grafica 28 se observa que durante los meses de junio y julio se presentaron los mayores promedios mensuales de la temperatura matutina. Por el contrario, durante los meses de agosto y septiembre se presentaron los promedios mensuales más bajos de la temperatura matutina (excepto estanque 11) (grafica 28). En el estanque 2 se presentó el promedio mensual más bajo en el mes de septiembre (28.3 °C).



Grafica 28. Promedio mensual de la temperatura matutina en los seis estanques en estudio.

Los estanques 2 y 4 presentaron los promedios totales de temperatura matutina más bajos en los seis estanques en estudio (grafica 29). Por el contrario, los estanques 11 y 16 presentaron los promedios más altos



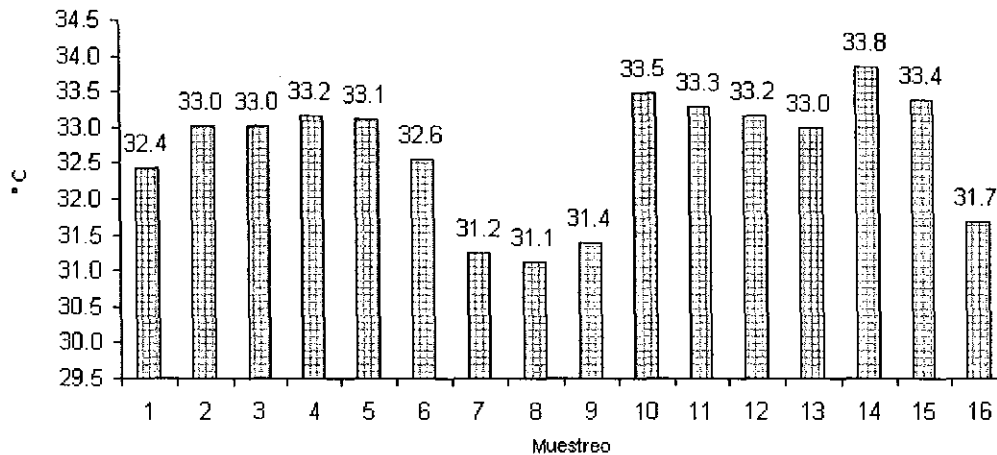
Grafica 29. Promedio total de la temperatura matutina en los seis estanques en estudio.

Al realizar el ANOVA de una vía, no se observan diferencias significativas entre la temperatura matutina de los estanques ( $P > 0.05$ ).

**Temperatura vespertina (5 pm)**

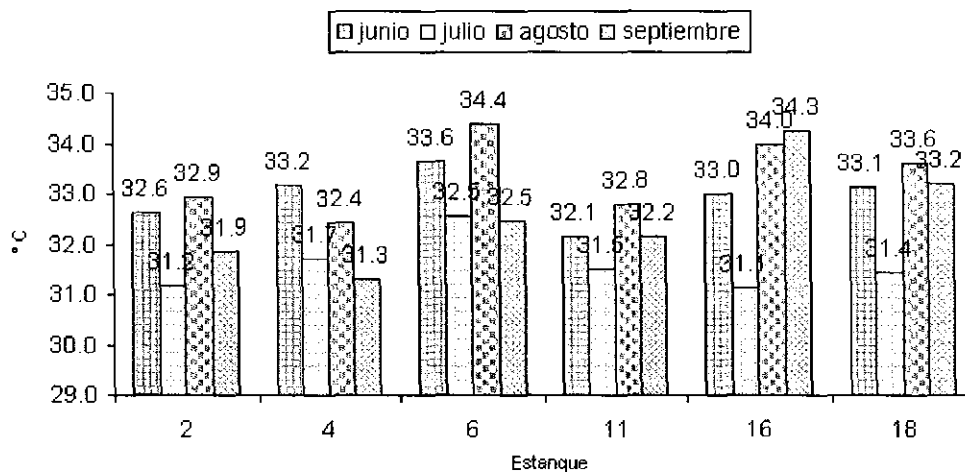
Los promedios semanales de temperatura vespertina en los meses muestreados varió de 31.8 a 33.8 (2.7°C de diferencia). En los muestreos 7, 8 y 9, se presentaron los promedios semanales más bajos de la temperatura vespertina de los seis estanques en estudio (correspondiendo al mes de julio). Durante los muestreos 10, 11, 12, 13, 14 y

15, se presentaron los promedios semanales más altos de la temperatura vespertina de los seis estanques en estudio (correspondiendo a los meses de agosto y septiembre).



Grafica 30. Promedio semanal de la temperatura vespertina de los seis estanques en estudio.

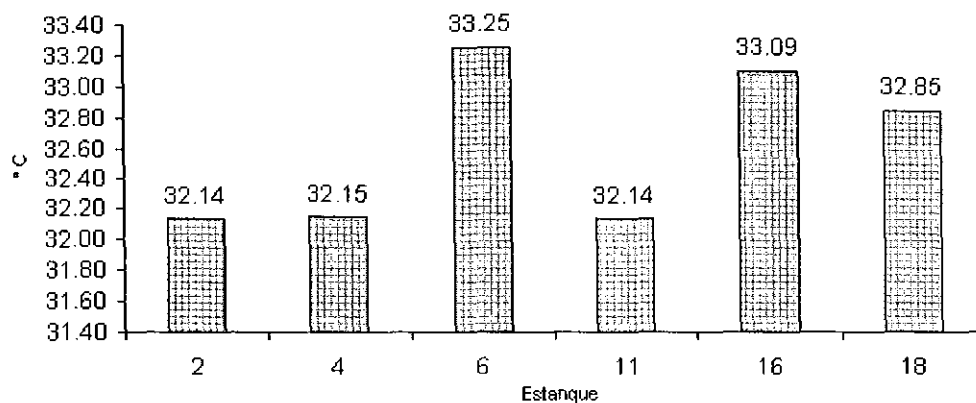
En la grafica 31 se observa que durante los meses de junio y agosto se presentaron los promedios mensuales más altos de la temperatura vespertina en los seis estanques en estudio (excepto estanque 16). Los promedios mensuales más bajos se presentaron durante los meses de julio y septiembre (grafica 31).



Grafica 31. Promedio mensual de la temperatura vespertina en los seis estanques en estudio.



Los estanques 2, 4 y 11 presentaron los promedios totales más bajos de temperatura vespertina en los seis estanques en estudio (grafica 32). Por el contrario, los estanques 6, 16 y 18 presentaron los promedios más altos.

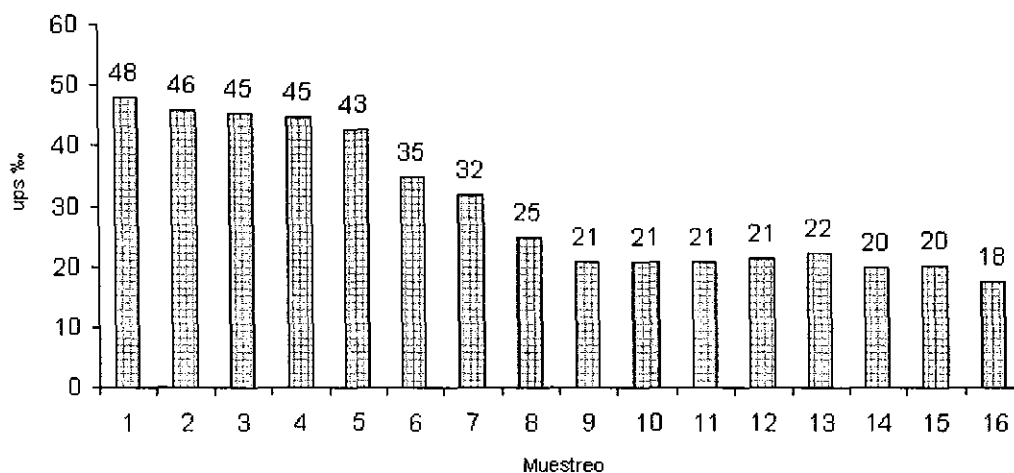


Grafica 32. Promedio total de la temperatura vespertina en los seis estanques en estudio.

Al realizar el ANOVA de una vía, se observan diferencias significativas entre los estanques ( $P < 0.001$ ). Donde los estanques 2, 4, 6 y 16 presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a los estanques 11 y 18, que fueron los que presentaron temperaturas altas (Tabla 5).

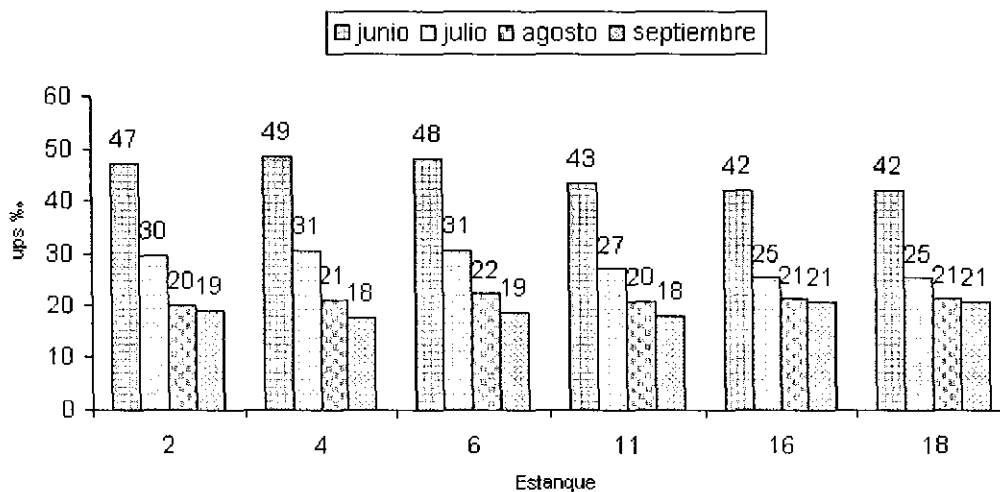
### Salinidad

Durante los primeros cinco muestreos se presentaron los promedios semanales más altos de salinidad, de 48 a 43 ppm. Estos muestreos corresponden al mes de junio. En los muestreos 6, 7 y 8 (julio) los promedios semanales presentaron un decremento en la salinidad de 22 ppm (grafica 33). La salinidad se mantuvo en 21 ppm (promedio) durante los muestreos 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 (agosto).



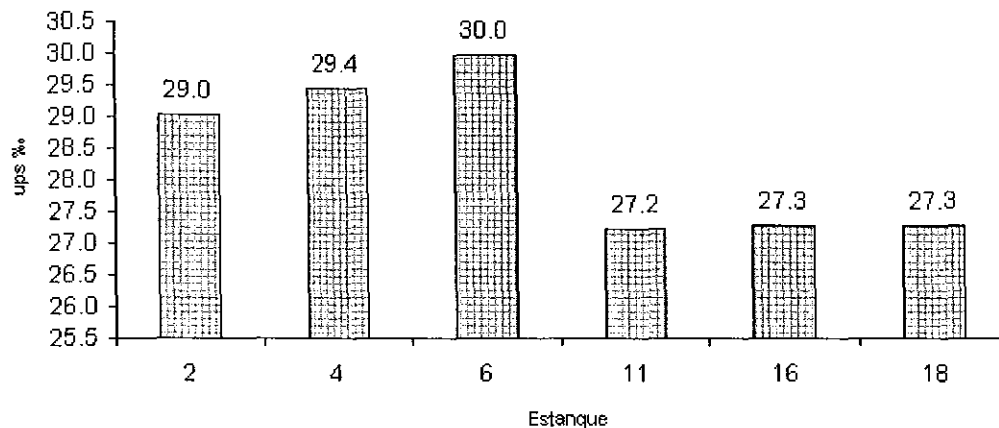
Grafica 33. Promedio semanal de salinidad de los seis estanques en estudio.

En la grafica 34 se observa que durante el mes de junio se presentaron los promedios mensuales más altos de salinidad en los seis estanques en estudio. Durante los meses de agosto y septiembre se presentaron los promedios más bajos de salinidad.



Grafica 34. Promedio mensual de salinidad en los seis estanques en estudio.

Los estanques 2, 4 y 6, presentaron los promedios totales de la salinidad más altos (29, 29.4 y 30 % respectivamente) en los seis estanques en estudio. Por el contrario, los estanques pequeños presentaron los promedios totales más bajos (grafica 35).



Grafica 35. Promedio total de salinidad en los seis estanques en estudio.

El ANOVA de una vía realizado, reveló diferencias significativas entre los estanques ( $P < 0.001$ ). Donde el estanque 6, presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a los estanques 11, 16 y 18 (Tabla 5).

### ANÁLISIS MULTIVARIADO

El análisis de los componentes principales de la prevalencia de las infecciones e infestaciones, en camarones de los seis estanques estudiados mostró tendencias temporales entre los meses de estudio. El eje 1 representó el 31% del total de la variabilidad de los datos y el eje 2 el 19%. En la figura 24a se observan cuatro agrupaciones, cada una de ellas asociada a diferentes grupos de agentes patológicos o a epibiontes (figura 24b). Los datos del grupo I (junio en su mayoría) se ordenaron en la parte izquierda inferior y son los datos asociados a las mayores prevalencias de deformación tubular y los datos del grupo II (junio, agosto y septiembre) se ordenaron en la parte derecha de la figura 24a, como resultado de la mayor prevalencia de los epicomensales *Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp., *Leucothrix mucor* y *Ascophrys* sp. Los datos del grupo III (julio y agosto) se ordenaron entre el grupo II y IV (en la parte central), en el cual no destaca la prevalencia de alguna afectación en particular. Los datos del grupo cuatro (julio y agosto) se ordenaron en la parte superior de la figura 24a, por haber presentado mayor prevalencia de gregarinas (trofozoitos, sicigias y gametocistos).

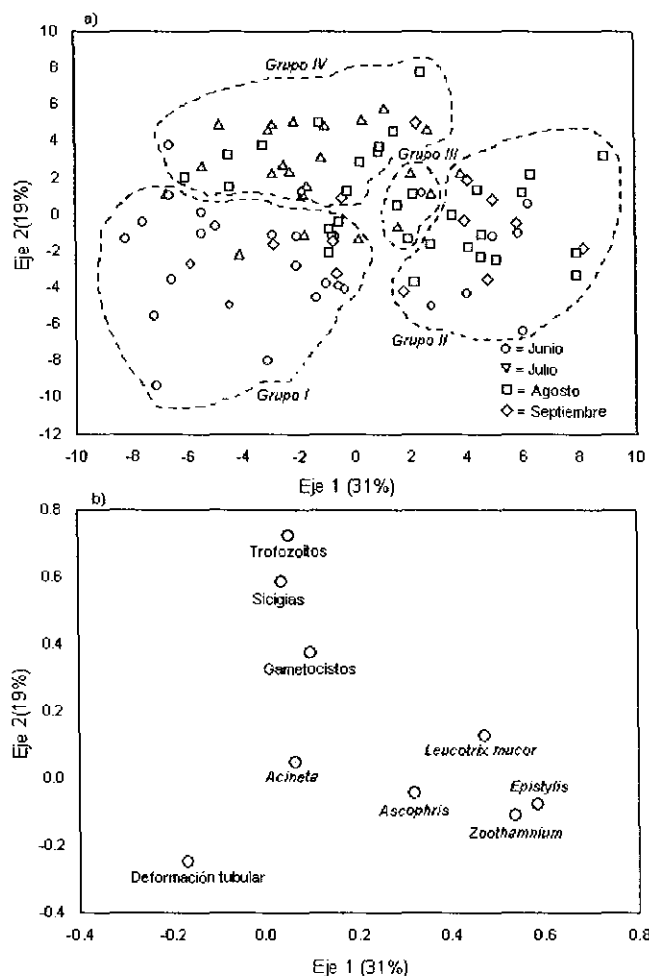


Figura 24. (a) PCA- ordenación de datos (muestras) basado en la prevalencia de los agentes patógenos o epibiontes de los seis estanques durante el período de estudio. Los círculos indican los muestreos del mes de junio; los triángulos los muestreos del mes de julio; los cuadrados los muestreos del mes de agosto y los rombos indican los muestreos del mes de septiembre. (b) PCA- ordenación de las variables biológicas.

De esta manera se observa sobre el eje 1 que, durante el mes de junio se presentaron las prevalencias más altas de deformación tubular en hepatopáncreas (-0.16). Durante los meses de agosto y septiembre se presentaron las prevalencias más altas de los organismos epicomensales *Zoothamnium* sp. (0.53), *Epistylis* sp. (0.58) y *Leucothrix mucor* (0.47). Mientras que sobre el eje 2 se observa que durante los meses de julio y agosto se presentaron las prevalencias más altas de la gregarina *Nematopsis* en trofozoito (0.67), sicigia (0.54) y gametocisto (0.32).

El PCA realizado con las variables fisicoquímicas de los seis estanques estudiados mostró tendencias temporales entre los meses de estudio. Los ejes 1 y 2 explican en 47 y 23% de la variabilidad de los datos, respectivamente. En la figura 25a se observan tres agrupaciones, cada una de ellas asociada a diferente parámetro fisicoquímico

(figura 25b). Los datos del grupo I (junio) se ordenaron en la parte izquierda superior y los datos del grupo II (julio) se ordenaron en la parte izquierda inferior, datos asociados a los mayores niveles de salinidad, temperatura matutina y oxígeno matutino. Los datos del grupo III (agosto y septiembre) se ordenaron en la parte central y derecha, como resultado de las mayores concentraciones de oxígeno vespertino.

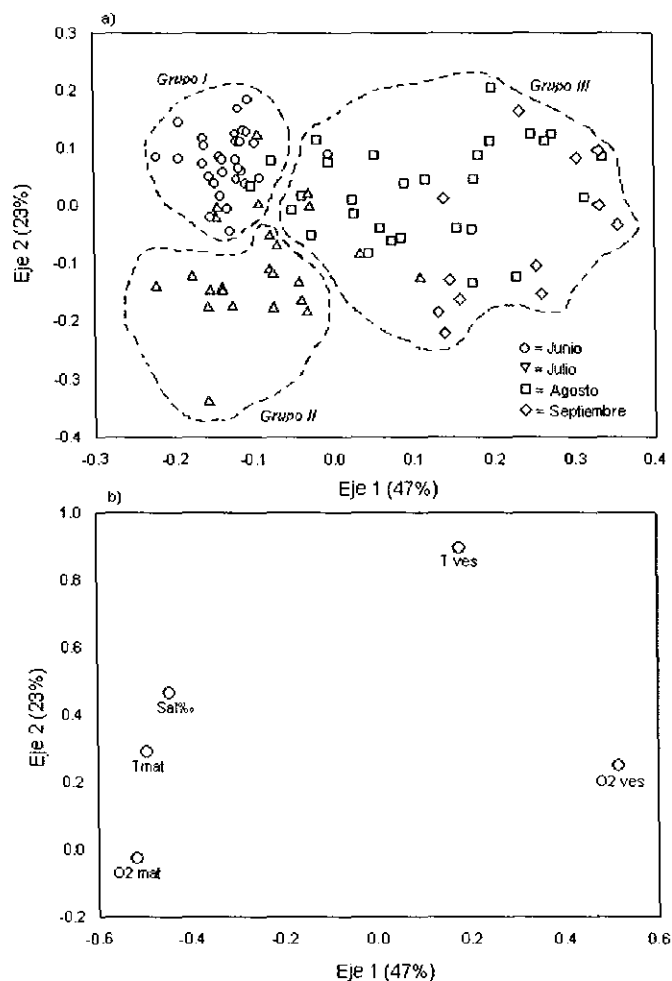


Figura 25. (a) PCA- ordenación de los datos (muestras) basado en las variables fisicoquímicas de los seis estanques durante el período de estudio. Los círculos indican los muestreos del mes de junio; los triángulos los muestreos del mes de julio; los cuadrados los muestreos del mes de agosto y los rombos los muestreos del mes de septiembre. (b) PCA- ordenación de las variables fisicoquímicas.

De esta manera se observa sobre el eje 1 que, durante los meses de Junio y Julio se presentaron los niveles más altos de salinidad (-0.43), temperatura matutina (-0.49) y oxígeno matutino (-0.52) (figura 25a y 25b). Durante los meses de agosto y septiembre se presentaron los niveles más altos de oxígeno vespertino durante el período de estudio (0.52). Mientras que sobre el eje 2 se observa que durante los meses de junio,

agosto y septiembre se presentaron los niveles más altos de temperatura vespertina (0.85).

### Correlación de los resultados de PCA (Biológicos y Físicoquímicos)

Se encontró una correlación relativamente baja ( $r_s = 0.48$ ,  $P < 0.01$ ) y significativa entre el eje 1 de los parámetros físicoquímicos y el eje 1 de los datos de la prevalencia (figura 6) Esto sugiere una tendencia de que la prevalencia de los organismos epicomensales (eje 1, figura 4b) aumenta con el incremento de los niveles de oxígeno vespertino y con la disminución de la salinidad, temperatura matutina y oxígeno matutino (eje 1, figura 5b).

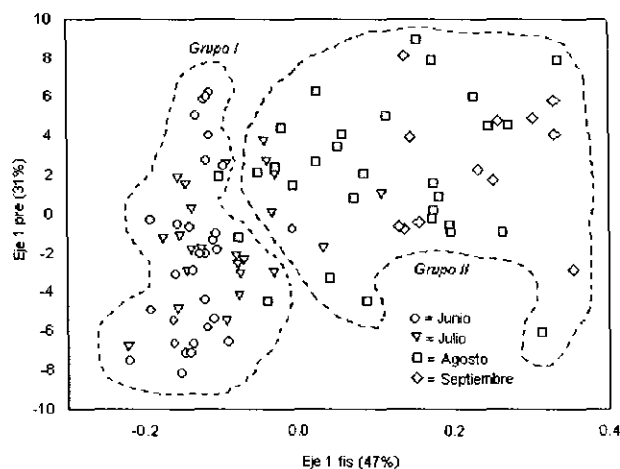


Figura 26. Correlación de resultados del PCA (Ejes 1) biológicos y físicoquímicos.

En la figura 6 se observa que los datos se ordenaron de una manera estacional. Los meses de junio y julio (grupo I = verano, secas) están más relacionados con niveles de oxígeno vespertino relativamente bajos pero con niveles de salinidad, temperatura matutina y oxígeno matutino más altos y prevalencias de organismos epicomensales más bajas. Y por otro lado, los meses de agosto y septiembre (grupo II = lluvias) están relacionados con prevalencias de organismos epicomensales más altas y con bajos niveles de salinidad, temperatura matutina y oxígeno matutino pero con niveles de oxígeno vespertino relativamente altos.

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Análisis de varianza (ANOVA)

El ANOVA realizado en cada una de las variables biológicas mostró que las diferencias en los valores de las medias entre los estanques, no son significativas (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de el análisis de varianza de los valores biológicos entre los estanques.

<b>Biológico vs Estanque</b>	2	4	6	11	16	18
D. Tubular	60.389 <sup>a</sup>	59.236 <sup>a</sup>	52.973 <sup>a</sup>	57.100 <sup>a</sup>	66.204 <sup>a</sup>	52.487 <sup>a</sup>
Zoothamnium	45.737 <sup>a</sup>	54.005 <sup>a</sup>	39.150 <sup>a</sup>	39.702 <sup>a</sup>	38.310 <sup>a</sup>	41.799 <sup>a</sup>
Epistylis	40.701 <sup>a</sup>	33.611 <sup>a</sup>	26.627 <sup>a</sup>	26.091 <sup>a</sup>	23.194 <sup>a</sup>	35.966 <sup>a</sup>
Acineta	6.548 <sup>a</sup>	5.000 <sup>a</sup>	0.833 <sup>a</sup>	3.704 <sup>a</sup>	0.000 <sup>a</sup>	0.000 <sup>a</sup>
Ascophrys	29.070 <sup>a</sup>	8.333 <sup>a</sup>	17.576 <sup>a</sup>	13.773 <sup>a</sup>	11.968 <sup>a</sup>	24.590 <sup>a</sup>
L. mucor	34.725 <sup>a</sup>	30.417 <sup>a</sup>	40.605 <sup>a</sup>	8.423 <sup>a</sup>	14.306 <sup>a</sup>	7.593 <sup>a</sup>
M. orgánica	50.815 <sup>a</sup>	57.593 <sup>a</sup>	60.731 <sup>a</sup>	36.591 <sup>a</sup>	56.921 <sup>a</sup>	62.275 <sup>a</sup>
Gametocistos	75.869 <sup>a</sup>	71.273 <sup>a</sup>	62.216 <sup>a</sup>	65.536 <sup>a</sup>	64.236 <sup>a</sup>	76.971 <sup>a</sup>
Trofozoitos	44.870 <sup>a</sup>	50.556 <sup>a</sup>	45.933 <sup>a</sup>	54.729 <sup>a</sup>	52.454 <sup>a</sup>	48.267 <sup>a</sup>
Sicigas	49.161 <sup>a</sup>	52.963 <sup>a</sup>	51.442 <sup>a</sup>	64.034 <sup>a</sup>	58.495 <sup>a</sup>	51.429 <sup>a</sup>

☼ Superíndices (<sup>abc</sup>) = Diferencias significativas encontradas entre los valores de las medias entre los estanques.

El ANOVA realizado en cada una de las variables biológicas mostró que las diferencias en los valores de las medias entre los 6 estanques, no son significativas ( $P > 0.05$ ) (Tabla 4).

Los resultados del ANOVA realizado en los valores de las medias de oxígeno, temperatura y salinidad de los estanques estudiados, muestra que hay diferencias significativas (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de el análisis de varianza de los valores fisicoquímicos entre los estanques.

<b>Fisicoquímico vs Estanque</b>	2	4	6	11	16	18
Oxígeno matutino	3.565 <sup>a</sup>	3.685 <sup>ab</sup>	3.581 <sup>a</sup>	3.844 <sup>ab</sup>	3.801 <sup>ab</sup>	4.001 <sup>b</sup>
Oxígeno vespertino	5.471 <sup>a</sup>	5.522 <sup>a</sup>	6.211 <sup>a</sup>	7.742 <sup>b</sup>	6.242 <sup>a</sup>	8.120 <sup>b</sup>
Temperatura mat.	30.287 <sup>a</sup>	30.239 <sup>a</sup>	30.246 <sup>a</sup>	30.164 <sup>a</sup>	30.583 <sup>a</sup>	30.251 <sup>a</sup>
Temperatura vesp.	32.224 <sup>a</sup>	32.533 <sup>ab</sup>	33.451 <sup>c</sup>	32.104 <sup>a</sup>	32.906 <sup>bc</sup>	32.406 <sup>ab</sup>
Salinidad	34.548 <sup>abc</sup>	35.940 <sup>ac</sup>	36.000 <sup>a</sup>	32.095 <sup>b</sup>	30.762 <sup>b</sup>	32.298 <sup>bc</sup>

☼ Superíndices (<sup>abc</sup>) = Diferencias significativas encontradas entre los valores de las medias entre los estanques.

Los resultados del ANOVA realizado en los valores de las medias de oxígeno, temperatura y salinidad de los estanques estudiados, muestra que hay diferencias significativas (Tabla 5).

En el caso del oxígeno matutino, las diferencias más significativas es entre los oxígenos de los estanques 2 y 6 con el oxígeno del estanque 18, así mismo no hay diferencia significativa en los estanques 4, 11 y 16 con el estanque 18 ( $p < 0.05$ ).

En el caso del oxígeno vespertino por ejemplo, se observa que no hay diferencia significativa en los estanques 2, 4, 6 y 16; mientras que los estanques 11 y 18 presentaron los datos de oxígeno más altos, siendo significativamente diferentes a los anteriores ( $p < 0.05$ ).

No se observan diferencias significativas en las temperaturas matutinas, mientras que en las vespertinas no hay diferencias significativas entre las temperaturas de los estanques 2, 4, 11 y 18 pero si hay diferencia significativa con las temperaturas más altas de los estanques 6 y 16 ( $P < 0.05$ ).

Si se relacionan los datos de las tablas 4 y 5 para encontrar efectos de los parámetros ambientales en las prevalencias de los patógenos y parásitos encontrados, se observa que debido a que no hay diferencias significativas en los parámetros biológicos, los cambios y diferencias significativas de la salinidad, oxígeno y temperatura no influyeron en las mismas.

## **HISTOPATOLOGÍA**

Se analizaron organismos de 19 de los 23 estanques de la granja, en cada estanque se colectaron 6 camarones de manera dirigida (camarones con señales clínicas de enfermedades) por lo que se analizaron un total de 115 organismos. Cinco estanques (1, 2, 10, 12 y 16) presentaron camarones con patologías causadas por WSSV y 5 estanques (3, 6, 7, 12 y 13) presentaron NHP. El estanque 12 presentó camarones con patologías causadas por ambos patógenos. En el estanque 1 y 2, se detectó la presencia de camarones con haplosporidiosis en el hepatopáncreas y microsporidiosis en el músculo y corazón. En todos los estanques se encontraron camarones con gregarinidos en el intestino (al menos en algún estadio de vida). Los organismos epicomensales estuvieron presentes en todos los estanques.

### **Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV)**

El Virus del Síndrome de la Mancha Blanca presentó los característicos cuerpos de inclusión tipo Cowdry A y cuerpos de inclusión maduros señalados por Lightner (1996) en diversos órganos y tejidos. Estos cuerpos de inclusión fueron acompañados en ocasiones por la presencia de núcleos hipertrofiados, ligera inflamación representada por infiltración hemocítica, numerosos núcleos picnóticos o con cariorrexis (lo que significa necrosis o muerte celular). El grado de severidad de la infección en las células y tejidos varió de grado 1 a grado 4. La Tabla 6 señala la presencia de WSSV en los estanques, la prevalencia y el grado de severidad observado en cada órgano y tejido. La grafica 36 muestra la prevalencia y grados de severidad de WSSV en estómago de camarones en los estanques afectados.



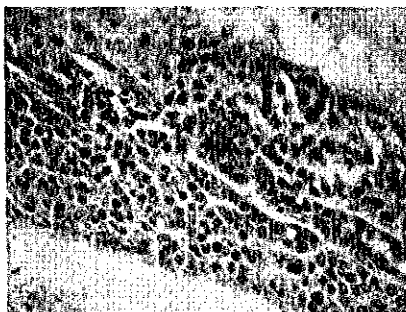
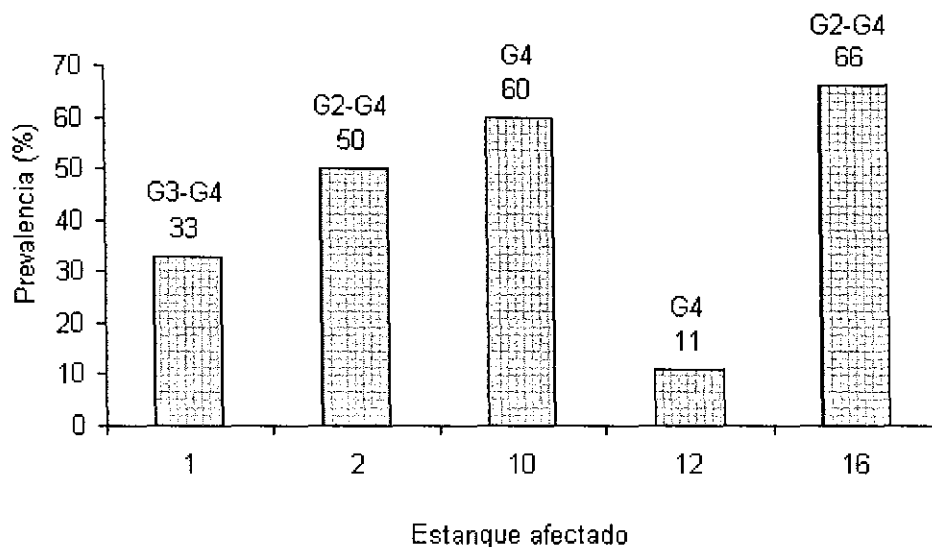


Figura 27. Virus de la mancha blanca (WSSV) en tejido conectivo del estómago de camarones cultivados. Fotografía tomada a 60X. Tinción hematoxilina-eosina de Mayer-Bennett.

Tabla 6. Prevalencia del virus de la mancha blanca observado en muestras de camarón al momento de la cosecha, tipo de tejidos y órganos que afectó y grado de severidad.

<b>Prevalencia del virus de la mancha blanca (WSSV) en camarones cultivados.</b>					
No. de estanque	1	2	10	12	16
% prevalencia	33 %	50 %	60 %	11 %	66 %
<b>Grado de severidad (GS) en diferentes órganos y tejidos de camarones cultivados.</b>					
No. de estanque	1	2	10	12	16
Epitelio estomacal	G3 – G4	G2, G3 y G4	G4	G4	G2, G3 y G4
Tejido conectivo estomacal	G1	G0	G0	G0	G0
Intestino	G1 – G3	G1 – G3	G3 y G4	G2	G1 y G3
Órgano linfoide	G4	G1 – G3	G4	G0	G3
Tejido hematopoyetico	G1	G1 – G3	G1	G0	G2
Branquias	G2	G2 – G4	G1, G2 y G4	G3	G1
Epitelio cuticular	G0	G0	G0	G2	G1

En el estanque 12, 2 camarones no infectados por el virus, presentaron núcleos picnóticos. En cuatro camarones no infectados por WSSV se observaron infiltraciones hemocíticas en branquias, acompañadas de núcleos cariorrexicos. En el estanque 16 se observó un camarón con esferoides ectópicos derivados del órgano linfoide cercanos a la región de el hepatopáncreas.



Grafica 36. Prevalencia y grados de severidad de WSSV en estómago de camarones en los estanques afectados.

#### Hepatopancreatitis necrotizante (NHP por sus siglas en Inglés)

De los 19 estanques muestreados, solamente las muestras de los estanques 3, 6, 7, 12 y 13 tuvieron el hepatopáncreas afectado por NHP. La enfermedad estuvo caracterizada por la presencia de bacterias del tipo de las rickettsias (basofilicas, gram negativas) en células hipertrofiadas del epitelio de el hepatopáncreas, presencia de granulomas, nódulos hemocíticos, áreas melanizadas y necrosis de los túbulos. La tabla 3 muestra los daños observados, las prevalencias y grados de severidad.

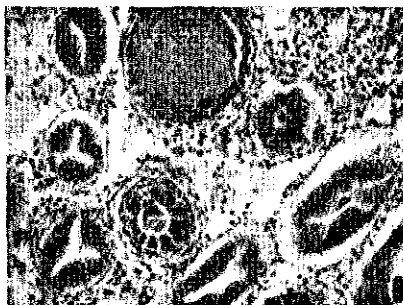
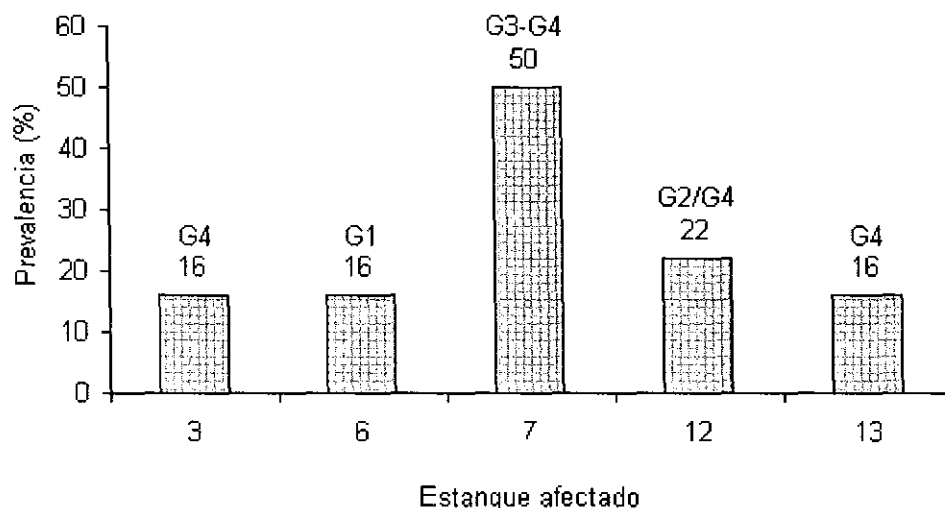


Figura 28. Hepatopancreatitis necrotizante (NHP) en hepatopáncreas de camarones cultivados. Fotografía tomada a 60X. Tinción hematoxilina-eosina de Mayer-Bennet.

Tabla 7. Organismos afectados por la Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP encontrado en las muestras tomadas durante la cosecha).

No. de estanque	Daños observados, grado de severidad y prevalencia (%)
3	Un camarón con la infección característica de NHP en fase crónica en G4. Presencia de nódulos hemocíticos, zonas con marcada melanización y necrosis de los túbulos. Calculándose una prevalencia de 16 %.
6	Un camarón con la infección característica de NHP. El camarón se detectó en G1 de severidad de infección. El hepatopáncreas presentó nodúlos hemocíticos y necrosis de los túbulos. Calculándose una prevalencia de 16%.
7	Tres camarones con la infección característica de NHP en fase crónica. Un camarón presentó G3 de severidad de la infección y dos camarones presentaron G4. Los camarones infectados por la NHP, presentaron diferentes patologías como; gran cantidad de nódulos hemocíticos, zonas con marcada melanización y necrosis de los túbulos del hepatopáncreas, calculándose una prevalencia de 50 %. Un camarón no infectado por NHP presentó dos grandes granulomas .
12	Dos camarones con la infección característica de NHP en fase aguda. Un camarón presentó G2 de severidad de la infección y el otro camarón G4. Los camarones infectados por NHP, presentaron patologías como; formación de granulomas dentro del hepatopáncreas, gran cantidad de nódulos hemocíticos, zonas con marcada melanización e infiltración hemocítica en el tejido conectivo del hepatopáncreas. Calculándose una prevalencia de 22%.
13	Un camarón con la infección característica de NHP en fase crónica. El G4 de severidad de la infección causó que el hepatopáncreas presentara diferentes patologías como; nódulos hemocíticos, necrosis de los túbulos e infiltración hemocítica en el tejido conectivo del hepatopáncreas. Calculándose una prevalencia de 16%.



Grafica 37. Prevalencia y grados de severidad de NHP en hepatopáncreas de camarones de los estanques afectados.

#### Otras patologías en hepatopáncreas de camarones no infectados por NHP

Los estanques 1, 8, 9, 10, 11, 16 y 18, presentaron patologías como granulomas, nódulos hemocíticos, desprendimiento celular y fagolisosomas. Una descripción breve de la situación en cada uno de los estanques se explica en la tabla 4.

Tabla 8. Diversas patologías observadas en el hepatopáncreas de camarones colectados durante la cosecha y analizados por histopatología.

No. De estanque	Diversas patologías observadas en hepatopáncreas
1	Tres camarones con granulomas en el hepatopáncreas. En uno de ellos, se detectó desprendimiento celular de los túbulos del hepatopáncreas, fagolisosomas y nódulos hemocíticos. Se detectó la presencia de un camarón con haplosporidios en hepatopáncreas y microsporidios en músculo y corazón.
8	Un camarón con nódulos hemocíticos y melanización en hepatopáncreas.
9	Cinco camarones con patologías en el hepatopáncreas. En dos de ellos, se detectó desprendimiento celular en los túbulos del hepatopáncreas. Otro camarón presentó nódulos hemocíticos y necrosis. Y otros dos camarones presentaron granulomas y en uno de ellos nódulos hemocíticos.
10	Tres camarones con patologías en hepatopáncreas. Un camarón se observó con nódulos hemocíticos y fagolisosomas. En otro camarón se detectaron granulomas. Y en el último se observaron solo fagolisosomas
11	Tres camarones con patologías en hepatopáncreas. Dos

	camarones del estanque presentaron nódulos hemocíticos y melanización. En el otro se detectaron granulomas.
16	Cuatro camarones con patologías en hepatopáncreas. En el primer camarón se detectaron nódulos hemocíticos. En el segundo, se detectaron fagolisosomas e inflamación. En el tercero y cuarto se observó desprendimiento celular de los túbulos del hepatopáncreas.

### Haplosporidios y microsporidios

En el estanque 1 se detectó la presencia de un camarón con haplosporidios en hepatopáncreas y microsporidios en músculo y corazón. En el estanque 2 se detectó un camarón con haplosporidios en hepatopáncreas y microsporidios en músculo. Esta infección causada por ambos parásitos, se observó de forma conjunta en ambos estanques.



Figura 29. Microsporidios en músculo de camarones cultivados. Fotografía tomada a 60X. Tinción hematoxilina-eosina de Mayer-Bennett.

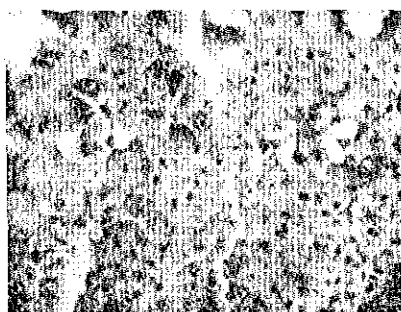


Figura 30. Haplosporidios en hepatopáncreas de camarones cultivados. Fotografía tomada a 60X. Tinción hematoxilina-eosina de Mayer-Bennett.

### Gregarinas

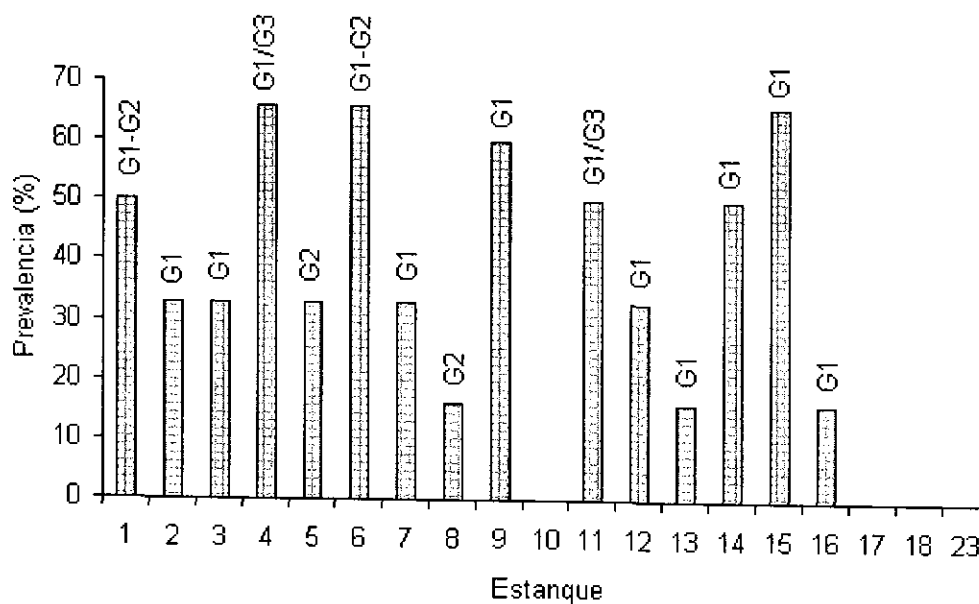
Las gregarinas estuvieron presentes en intestinos de camarones de todos los estanques, al menos en algún estadio de desarrollo (esporozoito, trofozoito, sicigia o gametocisto). Los esporozoitos tuvieron una prevalencia de 84%, trofozoitos de 78%, sicigias 73% y gametocistos 84%. En las graficas 38, 39 y 40 se observa la prevalencia

y grado de severidad de los trofozoitos, sicigias y gregarinas, respectivamente. Los trofozoitos fueron encontrados en algunos estanques causando desprendimiento del epitelio del intestino (exfoliación epitelial).



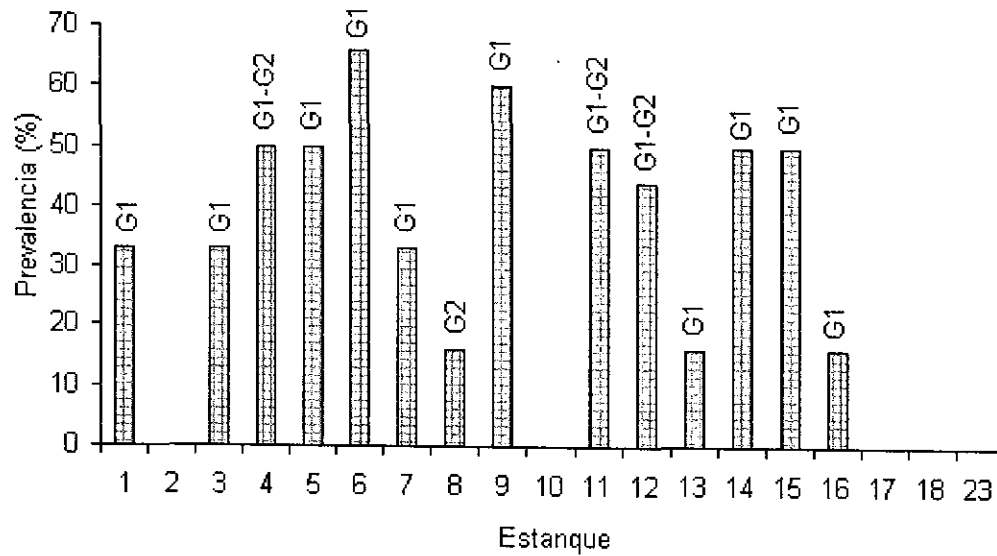
Figura 31. Grado severo de infección de gregarinas en intestino de camarones cultivados. Fotografía tomada a 10X. Tinción hematoxilina-eosina de Mayer-Bennett.

Trofozoitos



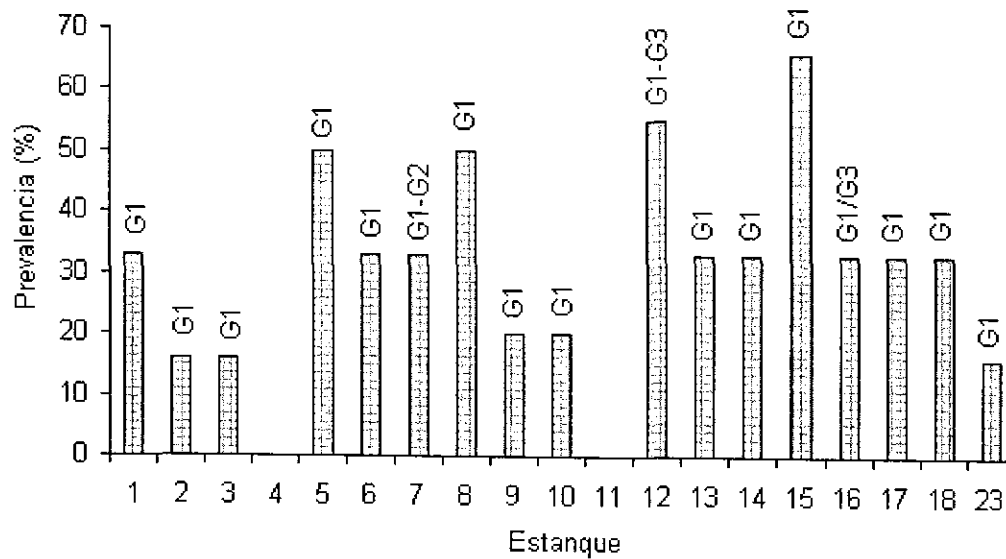
Grafica 38. Prevalencia y grados de severidad de trofozoitos en intestinos de camarones de los estanques en estudio.

## Sicigias



Grafica 39. Prevalencia y grados de severidad de sicigias en intestinos de camarones de los estanques en estudio.

## Gametocistos

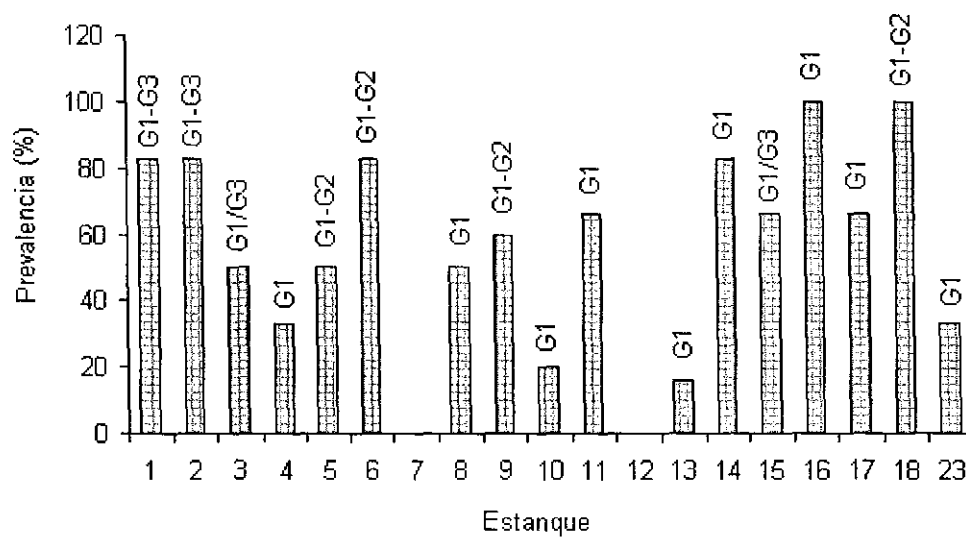


Grafica 40. Prevalencia y grados de severidad de gametocistos en ciego posterior de camarones de los estanques en estudio.

## Epicomensales

Los organismos epicomensales estuvieron presentes en todos los estanques. *Zoothamnium* sp. reportó una prevalencia de 87% en branquias y 62% en cutícula. *Acineta* sp. reporta un 31% en branquias. Se detectó la presencia de un organismo epicomensal no identificado (posiblemente bodo) en un par de estanques. En la grafica 41 y 42 se observa la presencia de *Zoothamnium* sp. y *Acineta* sp. en branquias de camarones en los 19 estanques analizados.

### *Zoothamnium* sp.

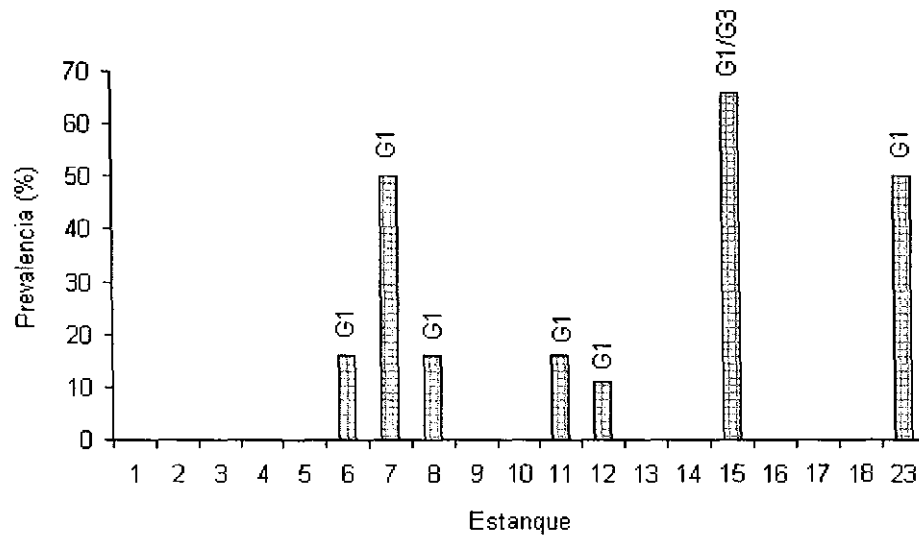


Grafica 41. Prevalencia y grado de severidad de *Zoothamnium* sp. en branquias de camarones de los estanques en estudio.



Figura 32. *Zoothamnium* sp. en branquias de camarones cultivados. Fotografía tomada a 40X. Tinción hematoxilina-eosina de Mayer-Bennett.



*Acineta* sp.

Grafica 42. Prevalencia y grado de severidad de *Acineta* sp. en branquias de camarones de los estanques analizados.



Figura 33. *Acineta* sp. en branquias de camarones cultivados. Fotografía tomada a 40X. Tinción hematoxilina-eosina de Mayer-Bennett.

## DISCUSIÓN

Además de la literatura internacional que recomienda de manera general la aplicación de programas de vigilancia y monitoreo de las enfermedades en granjas para un buen manejo de la salud de los organismos bajo cultivo, no se encontró ningún trabajo como el presente estudio para realizar comparaciones de los resultados.

Para establecer un programa de vigilancia y monitoreo de enfermedades en una granja, no existe ninguna receta ni guía específica para elaborarla, pues depende de muchos factores (sistema de cultivo, tamaño de la granja, número y tamaño de los estanques, personal con el que se cuenta, antecedentes de enfermedades en la granja y en la zona, densidad de cultivo, facilidades de laboratorio de diagnóstico etc.). Lo anterior indica que en cada granja debe haber una persona encargada exclusivamente de analizar toda esta información para establecer su propio programa. Debe contar además con personal de apoyo para realizar los análisis de nivel I.

Para que un sistema de vigilancia y monitoreo a nivel granja sea efectivo, se deben cubrir además cinco aspectos: a) el personal debe conocer las características normales (estado saludable) de los organismos en cuanto a comportamiento (nado, alimentación, crecimiento etc) y las características anatómicas externas normales del camarón. En consecuencia, debe conocer también las características opuestas (señales clínicas) para poder detectar a un organismo enfermo, así como saber qué microorganismos patógenos y parásitos los pueden afectar; b) Es básico también que el encargado de la salud de los camarones en la granja este enterado diariamente de los parámetros ambientales del estanque, de las tasas de recambios de agua y de los datos de alimentación para poder determinar la presencia de factores estresantes que puedan ocasionar una reducción en la respuesta inmune de los camarones; c) se debe implementar un programa de vigilancia y monitoreo adecuado a las características de la granja; d) la vigilancia y el monitoreo debe ser permanente durante todo el ciclo de cultivo.

Con el fin de poder demostrar si dándoles seguimiento a unos cuantos estanques se podía detectar el inicio de un brote de enfermedades, se seleccionaron solamente 6 estanques al azar y se tenía la intención de muestrear aquellos otros en los que se observaran señales clínicas. A pesar de que los técnicos encargados de la empresa en la que se desarrolló este trabajo, habían proporcionado en los inicios del proyecto su total apoyo para la realización de este estudio, por razones de bioseguridad, no se permitió realizar muestreos en los estanques sospechosos, sino que solamente se permitió trabajar con los seis estanques establecidos en el protocolo del estudio. Este tipo de restricciones pudieron haber ocasionado la pérdida de información valiosa para detectar brotes de enfermedades en otros estanques. Afortunadamente, la granja implementó un buen número de buenas practicas de manejo y medidas de bioseguridad de tal manera que aparentemente durante todo el ciclo de cultivo hasta la fecha en que se detectó el primer estanque con organismos infectados con mancha blanca y se decidió la cosecha, no hubo problemas severos en la granja y no fueron necesarios muestreos extras a los programados.

La granja cuenta con sus propios patólogos, los cuales colectan semanalmente 3 organismos de cada estanque. Si se sigue la tabla de Amos (1987), se considera que

este no es un número representativo de la población de organismos de los estanques por lo que la información que proporciona dicho muestreo no es válida para tomar decisiones. Sin embargo, los responsables de la granja se basaron en estos datos para aplicar medidas de control, por ejemplo aplicación de antibióticos. Como ya se mencionó anteriormente, debido a que aparentemente no tuvieron problemas graves durante el ciclo, no se observaron efectos negativos en los resultados de producción hasta la fecha en que se terminó el estudio. Este personal se encarga además de tomar las muestras de calidad de agua y sedimento, así como también de los análisis bacteriológicos, por lo que es prácticamente imposible que puedan realizar más muestreos de camarón para su análisis presuntivo. Se sugiere que el responsable de la granja encargue a una sola persona del programa de vigilancia y monitoreo mediante análisis en fresco para que este sea más efectivo.

El diseño del programa de vigilancia y monitoreo realizado en este estudio consistió en darle seguimiento al estado de salud de las poblaciones de camarón, en seis estanques ( $6/23=26\%$ ) seleccionados al azar por medio del método de muestreo espacial sugerido por Cameron (2002) durante todo el ciclo hasta la cosecha. Se considera que esta es una metodología adecuada para seleccionar estanques al azar y seis es un número representativo que puede indicar posibles brotes de enfermedades en esta granja. El tamaño de muestra de 10 organismos por estanque por semana se considera adecuado para un programa de vigilancia (aportando un 95% de confianza y asumiendo una prevalencia del 20%), sin embargo, lo más recomendable era muestrear 30 organismos para garantizar que de haber una prevalencia del 10% de una enfermedad, se hubiera detectado el brote. En un programa de vigilancia, el patólogo junto con el responsable de la granja tienen que decidir la rigurosidad del sistema de vigilancia, tomando en cuenta antecedentes de enfermedades y su impacto en la producción, el número de estanques, los antecedentes de la zona y de granjas cercanas, el número de patólogos con los que se cuenta, los costos de la vigilancia y el monitoreo etc.

La periodicidad del muestreo en cada estanque fue semanal, lo cual se considera apropiado para el programa de vigilancia de solamente seis estanques y un patólogo, siempre y cuando no se observaran señales externas de enfermedades ni de resultados presuntivos de algún brote de enfermedad. El programa de vigilancia y monitoreo se tuvo que adecuar a las reglas de la granja y solo se permitió tomar muestra un solo día a la semana, día en el cual los patólogos de la granja realizaban sus muestreos para los mismos fines. Los patólogos de la granja siempre elegían los organismos primero, tomando los camarones con señales clínicas más adecuadas para el diagnóstico en fresco. En caso de presentarse alguna señal o algún resultado presuntivo, el patólogo debe contar con la libertad de hacer otro muestreo cuando lo considere necesario (en esta ocasión no al azar sino muestreo dirigido, es decir colecta de organismos con señales clínicas) para verificar el estado de salud y en su caso actuar de manera oportuna enviando muestras para los niveles de diagnóstico II y/o III y tomar medidas de bioseguridad más estrictas para ese o esos estanques. En este caso, no se contaba con la libertad de tomar más muestras además de las señaladas en el protocolo aceptado por el responsable de la granja. Debido a que no se presentaron problemas durante el estudio, el programa no pasó de ser de vigilancia a monitoreo.

En estudios posteriores, sería importante determinar si en lugar de que la vigilancia se llevara a cabo siempre en los mismos estanques a lo largo de todo el ciclo, este número

representativo de 6 estanques fuera quincenalmente diferente, utilizando el mismo sistema de selección de Cameron (2002) hasta que se encuentre algún brote y la vigilancia se transforme en ese o esos estanques en monitoreo fijo.

El aumento del intervalo de tiempo de muestreo (de semanal a quincenal) y el aumento de estanques a muestrear puede ser una herramienta para mejorar el diseño del programa de vigilancia. Posiblemente el muestrear la mitad de los estanques (12) en la granja en una semana (utilizando el mismo tamaño de muestra = 10) y en la próxima semana muestrear la otra mitad (11 estanques) puede dar información suficientemente representativa y adecuada para saber la condición real de la salud de los camarones de todos los estanques de la granja. Es muy importante, que el muestreo sea adecuado (totalmente al azar y en diferentes puntos del estanque) para que la información manejada sea representativa. Esto es debido a que el tamaño de muestra ideal para las poblaciones en cultivo debe ser de 30 asumiendo una prevalencia del 10% (Amos, 1987), lo cual es prácticamente imposible para solo un patólogo.

Un problema que indican los productores, es que se les piden muchos organismos en los muestreos para analizar su estado de salud y que con ello están perdiendo dinero al final del ciclo ya que estos organismos tienen que ser sacrificados. En el estudio se realizaron 16 muestreos semanales, pero cada estanque fue muestreado de 4 a 5 veces por mes, lo que significan 50 camarones sacrificados mensualmente, estos multiplicados por los 4 meses del ciclo de cultivo dan un total de 200 camarones por estanque, lo cual es insignificante para las poblaciones que tienen los estanques y sobre todo por la valiosa información que se puede obtener. Por lo tanto los productores deben evaluar a conciencia y apreciar los beneficios económicos que trae consigo un programa de vigilancia adecuado para su tipo de granja.

El programa de vigilancia y monitoreo se inició el día 3 de junio y los últimos muestreos se hicieron el 8, 14 y 23 de septiembre. En un estudio paralelo al presente, se realizaron muestreos para determinar el virus de la mancha blanca mediante técnicas de PCR en 19 estanques. Con fecha de 15 de Septiembre, se detectó la presencia del virus y se les indicó a los responsables que fueran organizando la cosecha ya que estaban a tiempo de obtener una buena producción sin mayores riesgos. Sin embargo por decisión del dueño de la granja, el cultivo se extendió 15 días más para alcanzar una mejor talla. Desgraciadamente, durante el mes de octubre la Secretaría de Salud reportó casos de diarrea, fiebre y vómito en humanos causados por el consumo de camarón procedente de la laguna Huizache-Caimanero. Debido a esto, las autoridades de Salud Pública no permitieron la pesca de camarones provenientes de esta laguna y la cosecha de las granjas de cultivo aledañas a esta zona costera. La granja en estudio tuvo que detener la cosecha cuando la Secretaría de Salud hizo oficial la veda precautoria. En el intervalo de la veda, la temperatura del agua de los estanques bajó considerablemente (4 grados aproximadamente). Este cambio de temperatura fue suficiente para estresar a los camarones y como ya se les había detectado WSSV, se disparó la epizootia presentándose altas mortalidades. Si se hubiera cosechado en el momento que se les señaló posiblemente no hubieran tenido las pérdidas observadas. El programa de vigilancia y monitoreo presuntivo de este trabajo se realizó hasta la fecha de cosecha y posteriormente se inició la colecta de organismos para realizar análisis histopatológicos.

Los parámetros de calidad del agua fueron tomados diariamente y en el caso de la temperatura y oxígeno disuelto, se tomaban en la mañana (5 am) y en la tarde (5 pm). Sin embargo ésta información no se nos dio y solamente se nos proporcionó el promedio semanal para poder realizar el análisis multivariado, por lo que se perdió información valiosa, debido a que al promediar los siete días de la semana, no se reconocen los cambios repentinos que surgen en los estanques a través de la semana. Sin duda alguna, es recomendable trabajar con los parámetros diarios de calidad de agua, alimentación y patológicos para establecer las relaciones entre unos y otros y poder diagnosticar con mayor precisión posibles efectos negativos en la salud de los organismos bajo condiciones de estrés.

No obstante lo anterior, se realizó un análisis de varianza para determinar si con esta información se podían observar diferencias en los parámetros ambientales más importantes en los estanques estudiados y ver si estos cambios pudieron haber afectado la presencia o ausencia de los patógenos y simbioses observados.

Los resultados mostraron que a pesar de que si hubo diferencias significativas en los parámetros ambientales, estos no influenciaron en la prevalencia de los organismos ya que el ANOVA aplicado a la prevalencia de los organismos no mostró diferencias significativas. De aquí se desprende que al menos durante el período de estudio, los cambios en los parámetros ambientales no fueron tan drásticos como para disparar algún patógeno, parásito o simbiote. Lo anterior se confirma porque después de que se terminó el estudio y los camarones no fueron cosechados a tiempo, las temperaturas bajaron drásticamente y fue cuando se presentaron los brotes de mancha blanca ocasionando altas mortalidades.

Mediante análisis en fresco no se detectaron problemas bacterianos, sin embargo para que un programa de vigilancia Nivel I este completo, se debe contar con un programa de análisis bacteriológico de hepatopáncreas, hemolinfa, agua y sedimento. Este trabajo no abarcó tales análisis, pero los técnicos de la granja tomaban muestras semanalmente (3 organismos por estanque) y se tiene conocimiento de la aplicación de antibióticos después de realizar concentraciones mínimas inhibitorias de la bacteria. No se proporcionó mayor información.

De acuerdo a Morales y Chávez (1999) y Morales (2004), el análisis en fresco de los camarones puede indicar de manera presuntiva la presencia de NHP mediante la observación de la deformación de los túbulos del hepatopáncreas, en este estudio se detectaron desde el primer muestreo con niveles de prevalencia promedios de 92% y manteniéndose altos durante 11 de los 16 muestreos (gráfica 1) por lo tanto, se debieron coleccionar muestras desde sus inicios para enviarlos a analizar mediante histopatología o técnicas de biología molecular para su confirmación y poder aplicar un método de control apropiado. En el esquema 1 (anexo 4) se muestra el plan de vigilancia que se debió haber seguido para confirmar la presencia de NHP. En el presente estudio se presentaron promedios de la prevalencia semanal altos de deformación tubular durante los tres primeros muestreos del 3 al 16 de junio (83 – 92%), por el contrario, durante los próximos tres muestreos del 23 de junio al 6 de julio la prevalencia promedio bajó drásticamente (25 – 51%). La baja repentina en la prevalencia, pudo ser debida a la aplicación de algún antibacteriano en los estanques. Lo anterior no se puede corroborar debido a que los técnicos de la granja no aceptaron

dar información acerca de los tipos de antibióticos, dosis y frecuencia que se aplicaron a los camarones y a que no se hicieron análisis histopatológicos antes y después de la aplicación de los antibióticos. En los estanques 4, 6, 11 y 18 el día 23 de agosto se detectó la presencia de camarones con los túbulos del hepatopáncreas estrangulados y muy atrofiados en grado 3, aunque el hepatopáncreas no presentó la reducción de tamaño y necrosis que señala Lightner (1996); Lightner *et al.*, (1999). La presencia de NHP se confirmó al final del ciclo mediante el análisis histopatológico realizado en los organismos colectados durante la cosecha. Sin embargo, aparentemente si este problema se presentó desde sus inicios, no ocasionó graves pérdidas en la población dado que las sobrevivencias fueron altas en todos los estanques (62% promedio) para el 23 de septiembre fecha en que se terminaron los análisis en fresco. De haberse enviado muestras para hacer análisis histopatológico se hubieran hecho conclusiones mas acertadas y se sabría si ese diagnostico presuntivo fue acertado o no.

Las alteraciones micronanatómicas del hepatopáncreas, características de la presencia de una enfermedad como la necrosis hepatopancreatica (NHP) observada histológicamente corresponde con las descripciones de (Lightner, 1996). Fue común encontrar camarones en fase crónica de la enfermedad, presentando el hepatopáncreas con gran cantidad de nódulos hemocíticos, granulomas, inflamación, marcada melanización y necrosis, por lo que una parte de la mortalidad presentada durante la veda precautoria (octubre) puede ser asociada a la presencia de esta alfa proteo bacteria. La presencia de NHP en 5 de los 19 estanques diagnosticados, reporta un promedio de la prevalencia de 26%. Lightner (1996) reporta que altas temperaturas (>29 a 31 °C) y elevadas salinidades (20 a 40 ppm) durante largos períodos favorecen al desarrollo de NHP. En el presente estudio, las altas salinidades y elevadas temperaturas fueron reportadas durante los meses de junio y julio, tiempo el cual no se pudo comprobar por histología la presencia de esta enfermedad. Frelier (1992) sugiere que el mecanismo de transmisión de esta bacteria intracelular tal vez requiere de un hospedero intermediario debido que no fue posible infectar camarones experimentalmente por contacto con el agua y por alimentación con hepatopáncreas infectados (disecado) con la bacteria. Este mismo autor excluye el mecanismo de transmisión oral para este patógeno, aunque comenta que el bajo número de camarones examinados durante su experimento dificultó una buena interpretación de los resultados. Datos de brotes espontáneos de NHP sugieren que temperaturas de 29°C por períodos de 50 días (aprox.) favorecen al desarrollo de la enfermedad (Frelier, 1992).

Durante el ciclo de cultivo se observó la presencia de *Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp., *Acineta* sp., *Ascophrys* sp., *Leucothrix mucor* en niveles de severidad de G1 a G4. La descripción de estos epibiontes corresponden a las descripciones de Conroy (1990) y Lightner (1996). El único que puede ser un patógeno invasivo y provocar una reacción del sistema de defensa de los camarones afectados, es *Ascophrys* sp. (Lightner, 1996), los demás son epibiontes que solamente ocasionan daños si hay una alta prevalencia y una severidad G3-G4 en conjunto con mala calidad de agua, especialmente bajas concentraciones de oxígeno y altos niveles de materia orgánica en suspensión.

El promedio de la prevalencia total más bajo de epicomensales en branquias de camarones cultivados en estanques de 1.5 Ha hace suponer que los recambios de agua son más efectivos en estanques pequeños y que existe mayor cantidad de materia

orgánica disuelta en el agua de estanques grandes de 11 Ha, razón por la cual el número de epicomensales es mayor. La presencia de éstos epicomensales durante el estudio no se consideró de alto riesgo para los camarones a pesar que se encontraron en ocasiones en grados 3 y 4. Lo anterior debido a que los camarones estaban continuamente creciendo y por lo tanto desprendiéndose de los mismos durante la muda. Sin embargo, severidades de 3 y 4 pueden estresar a los camarones sobre todo en los momentos de más bajos niveles de oxígeno y en consecuencia afectar su sistema inmunológico haciéndolos más susceptibles a enfermedades.

*Zoothamnium* sp. fue el protozooario ciliado más prevaleciente en las branquias de camarones durante el período de estudio, presentando un promedio de la prevalencia total de 46% con mayor abundancia en los meses de agosto y septiembre (excepto estanque 18). Se ha registrado la presencia de *Zoothamnium* sp. y *Epistylis* sp. en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* cultivado en el estado de Texas (Johnson, 1990). Este mismo autor refiere la presencia de *Epistylis* sp. muy pocas veces en branquias, datos que difieren del presente estudio debido que este protozooario ciliado sin mionema contráctil, se presentó en las branquias de camarones blancos durante todo el período de estudio. *Acineta* sp. fue el protozooario epicomensal que se detectó muy pocas veces en las branquias, reportando el promedio de la prevalencia semanal más alto el día 23 de agosto (24%) y la abundancia mayor en los estanques 6, 11 y 16, pudiéndose clasificar como un evento casual y repentino, lo anterior coincide con lo reportado por Conroy (1990) y Aguado *et al.*, (1995). Un muestreo anterior (16 de agosto) se reporta el promedio de la prevalencia semanal más alto de materia orgánica en branquias (75%) factor que de alguna forma pudo tener influencia indirecta con el aumento en la prevalencia y abundancia de los organismos epicomensales. El decremento de la temperatura y el aumento de materia orgánica en branquias durante esas fechas, hacen suponer que fueron factores que estresaron al camarón haciéndolo más susceptible a infestaciones más graves por organismos epicomensales (Sniensko, 1973). *Ascophrys* sp. fue el único protozooario apostomado reportado en branquias de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* cultivado durante el período de estudio, este epicomensal elipsoide reportó el promedio de la prevalencia semanal más alto el día 23 de junio. No se puede atribuir su presencia a factores medio ambientales. La bacteria filamentosa *Leucothrix mucor* reportó un promedio de la prevalencia total de 31% con mayor abundancia durante los meses de Agosto y Septiembre. Los promedios de la prevalencia semanales más altos de esta bacteria epicomensal se reportaron del 31 de Agosto al 08 de Septiembre, haciendo suponer que el promedio semanal bajo de la temperatura matutina (28.6%) y las salinidades promedio de 20 ppm reportadas durante esas fechas tuvieron alguna influencia indirecta con el aumento en la infestación. Conroy (1990) sugiere que temperaturas de 20 – 25°C favorecen la contaminación por *Leucothrix mucor*, rangos que difieren con el presente estudio, debido que una temperatura de 28°C fue suficiente para favorecer una mayor infestación. Brock y Main (1992) reportaron que el incremento en los recambios de agua, decremento de la densidad de animales y el uso de una alimentación balanceada, son los factores básicos que pueden alterar la abundancia de los organismos epicomensales. MPEDA/NACA (2003) reportan que un recambio de agua del 10% cada vez es ideal para prevenir cambios repentinos en la calidad del agua de los estanques, como cambios en la concentración de fitoplancton, pH, salinidad y por consiguiente minimizar el estrés en el camarón durante los recambios de agua, en el presente estudio no se proporcionaron los niveles y el tiempo de recambios de agua utilizados durante el ciclo

de cultivo, aunque se sabe que fue una practica comúnmente usada, especialmente en estanques con bajos niveles de oxígeno disuelto y gran cantidad de nutrientes en el agua. Las altas prevalencias y grados de severidad por organismos epicomensales que presentaron los camarones durante el período de estudio, indican que estos epibiontes encontraron las condiciones adecuadas (bajas salinidades, bajas temperaturas y oxígenos y altas concentraciones de nutrientes disueltos en el agua) para su reproducción y desarrollo; pero debido a la naturaleza de este estudio, se requiere continuar estas investigaciones bajo condiciones controladas para determinar de manera precisa la relación existente entre las infestaciones por organismos epicomensales y las variables fisicoquímicas del agua.

La morfología de las gregarinas encontradas en el intestino de *Litopenaeus vannamei* en cultivo corresponden con las descripciones de (Feigenbaum, 1975) para *Nematopsis* sp. en *Litopenaeus vannamei* procedentes del complejo lagunar Huizache-Caimanero en el estado de Sinaloa. El análisis separado de los diferentes estadios de desarrollo de las gregarinas (trofozoito, sicigias y gametocistos) indican que no hay diferencias de su presencia durante el ciclo de cultivo sino que se presentan con las mismas tendencias de prevalencia y severidad, lo cual es indicativo de la secuencia de transformaciones que sufren las gregarinas en su ciclo de vida sin marcadas preferencias estacionales.

Los promedios de la prevalencia semanales más bajos de trofozoítos y sicigias reportados en el inicio del programa de vigilancia (3 de junio) hace suponer el comienzo de la infestación, cuatro semanas más tarde la abundancia y el promedio de la prevalencia semanal aumentó considerablemente, asumiendo que las altas prevalencias de camarones infestados por este protozooario parásito en los estanques de cultivo, puede corresponderse con el aumento de la carga orgánica de estos sistemas acuáticos, creando condiciones de eutroficación favorables para el desarrollo de organismos invertebrados, tales como poliquetos y moluscos bivalvos, que están registrados como hospederos intermediarios de las gregarinas del género *Nematopsis* (Lightner, 1996). Feigenbaum (1975) refiere la presencia de los moluscos *Rangla mendica* y *Tagelus affinis* en el complejo lagunar Huizache-Caimanero, donde tal vez estos bivalvos actúen como hospederos intermediarios de la gregarina en este citado ambiente. En el presente estudio no se determinó la presencia de estos hospederos, pero dado que la granja se abastece de agua de este mismo sistema lagunar existe la posibilidad de que también se encuentren instalados en los estanques de cultivo.

El promedio de la prevalencia total más alto de trofozoítos y sicigias en camarones cultivados en estanques de 1.5 Ha hace suponer una mayor abundancia de hospederos intermediarios por unidad de área. Reyes (2004) encontró una correlación lineal positiva entre el grado de severidad promedio de *Nematopsis* sp. y la severidad promedio de trofozoítos, sicigias y gametocistos sustentando el desarrollo ininterrumpido del ciclo de vida de *Nematopsis* en camarones blancos *Litopenaeus vannamei* cultivados en el estado de Sinaloa. En el presente estudio no se correlacionaron los grados de severidad de los diferentes estadios de vida, pero si se observó un desarrollo ininterrumpido del ciclo de vida de *Nematopsis* en los camarones cultivados. Durante el período de estudio se constató que los estadios de trofozoítos y sicigias de *Nematopsis* tuvieron una tendencia a aumentar durante el mes de Junio, en tanto el estadio de gametocisto se comportó de una manera diferente. Este comportamiento, puede estar relacionado con la secuencia de las trasformaciones que



ocurren durante el ciclo de reproducción sexual y asexual de este género de gregarina, que se inicia con la entrada de los esporozoitos al estómago e intestino medio del camarón, donde se transforman en trofozoitos; posteriormente se desprenden llamándose esporandinos y es cuando ocurre el proceso de asociación denominado gamonte en sicigia, que culmina con el enquistamiento de estos esporandinos que se transforman en gametocistos (Kudo, 1969 y Levine, 1971).

Los altos grados de severidad que presentaron los camarones durante el período de estudio permite suponer que estos protozoarios parásitos encontraron en los estanques las condiciones adecuadas para su desarrollo; lo que hace pensar que a mayor carga parasitaria por gregarinas, se incrementan las lesiones en el intestino medio y posterior; haciendo mención principalmente a los trofozoitos (por sus órganos de fijación) seguidos de los gametocistos (que se asocian a estallamiento y taponamiento del ano) y en último lugar las sicigias, por presentarse en forma de vida libre en el intestino (Bower, 1996). Sprague (1954) reportó que *Nematopsis penaeus* es el único posible ejemplo de gregarina potencialmente patógena, la cual es capaz de provocar daños a nivel del epitelio intestinal en ejemplares de *Litopenaeus aztecus* fuertemente infectados. Las lesiones histológicas observadas en el intestino de *Litopenaeus vannamei*, asociadas al incremento del grado de severidad por *Nematopsis* coinciden con las descripciones realizadas por Lightner (1996) para esta especie. Brock y Main (1992) reportaron que los mecanismos potenciales de control de las gregarinas incluyen la destrucción y remoción de los hospederos intermediarios del sedimento de los estanques entre los ciclos de cultivo o la administración de los niveles recomendados de cal para la destrucción del poliqueto *Polydora*. Fajer et al (2005) reportó la efectividad del uso de Elancoban™ en alimento medicado a concentraciones de 5.5 y 6 g kg<sup>-1</sup> reduciendo en un 92% y 94% respectivamente, el número de gametocistos en *Litopenaeus vannamei* sin inducir mortalidad.

La temperatura del agua afecta la productividad natural de los ecosistemas acuáticos y afecta directa o indirectamente todas las variables de la calidad del agua. Los camarones son organismos poiquiloterms, por lo que la temperatura corporal de los crustáceos cambia debido a los cambios diarios y estacionales de la temperatura del agua. En el presente estudio (del 3 de junio al 23 de septiembre), el intervalo promedio registrado durante el período de vigilancia y monitoreo fue de 28.6 – 33.8 °C, estos datos están en el orden de los valores sugeridos como óptimos por Boyd (1998), por lo que se puede afirmar que durante este período la temperatura no tuvo efectos graves en los camarones.

Boyd (1998) sugiere que si los niveles de oxígeno disuelto son consistentemente bajos, los animales acuáticos no comerán o no crecerán bien y serán más susceptibles a enfermedades. Los resultados de este estudio indican que por la mañana es cuando se presentan los peores niveles de oxígeno, lo cual es de esperarse, ya que durante la noche se reduce la actividad fotosintética. En general, durante los meses de junio y julio se presentaron mejores niveles de oxígeno disuelto por la mañana, mientras que en agosto y septiembre los promedios de oxígeno matutino fueron bajos. Sin embargo, aparentemente hasta la fecha en que se terminó el programa de vigilancia y monitoreo en los estanques seleccionados, estas bajas de oxígeno no ocasionaron estrés importante pues las sobrevivencias hasta esta fecha fueron de 70%. Se recomienda que en temporadas en las que se puedan combinar factores de estrés, especialmente

de altas o muy bajas temperaturas, se coloquen aireadores para eliminar el efecto estresante de este parámetro ambiental.

Los resultados de la salinidad indican que durante el verano es cuando se presentan los niveles de salinidad más altos y durante la temporada de lluvias (julio, agosto y septiembre) los niveles de salinidad bajan debido a los escurrimientos superficiales y aportes de lluvia directa a los sistemas (Arredondo et al 1998). *Litopenaeus vannamei* es una especie euryhalina (Menz et al., 1980 y Stern et al., 1990) de tal manera que aparentemente la salinidad no fue un parámetro que afectara de manera importante a los camarones. Lo anterior se corrobora con las altas producciones que estas granjas han tenido en años anteriores con las mismas salinidades.

La granja en estudio presentó dos períodos de cosecha debida a la veda precautoria que la Secretaria de Salud implementó debido a la presencia de la bacteria *Vibrio parahemolyticus* (nh+) que es patógena para los humanos y que se encontró en camarones procedentes del complejo lagunar Huizache-Caimanero. La veda inició oficialmente el día 6 de octubre, aunque los reportes epidemiológicos de la Secretaria de Salud fueron con dos semanas de anterioridad. El primer período de cosecha se realizó antes de la veda del 15 de septiembre al 2 de octubre en nueve estanques (7, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 23) reportándose una sobrevivencia promedio alta (70%). Debido a la veda precautoria, la cosecha de los restantes 14 estanques (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 21 y 22) tuvo que esperar desde el 2 de octubre hasta el 8 de noviembre terminándose el 16 de noviembre, reportándose una sobrevivencia promedio baja (26%).

Los resultados del estudio histopatológico, mostraron la presencia del virus de la mancha blanca. La morfología del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) encontrado en el epitelio y tejido conectivo del estómago, intestino, branquias, glándula antenal, órgano linfoide y epitelio cuticular de *Litopenaeus vannamei*, corresponden con las descripciones de (Lightner, 1996). Los grados de infección más severos se encontraron principalmente en el tejido epitelial del estómago, sugiriendo un modo de transmisión horizontal (Lightner, 1996) mediante la liberación de patógenos por organismos enfermos y tomados vía oral por camarones sanos (Álvarez et al 1988). Este patógeno también fue encontrado en el tejido hematopoiético (encargado de producción de hemocitos) afectando el sistema inmunológico del camarón (Bachere, 2000). Le Moullac et al (2000) reportan que la actividad mitótica de los hemocitos se ve reducida durante el invierno, lo cual aunado a la llegada de WSSV al tejido hematopoiético, probablemente fueron factores que tuvieron alguna influencia indirecta con la baja resistencia (Álvarez et al 1988) del camarón a los patógenos.

El promedio de la prevalencia total del virus WSSV reportado (26% = 5/19 estanques) mediante el análisis histopatológico hace suponer que el decremento de la temperatura promedio (24°C) y oxígeno matutino promedio (2.5 mg·l<sup>-1</sup>) durante la veda precautoria (mes de octubre) fueron factores que estresaron al camarón y detonaron el brote de mancha blanca, por lo que gran parte de la mortalidad presentada pudiera estar asociada a la presencia de este virus. La baja en los niveles de oxígeno disuelto y baja temperatura reportada durante el mes de octubre, ocasionaron que el camarón redujera el tiempo de respiración. Newman (2004) sugiere que cualquier disturbio en el balance fisiológico puede ser considerado como estrés, sin importar si es externo o

interno. El estrés es un fenómeno normal y natural y es imposible que la vida exista sin él. En su forma benevolente que promueve procesos de evolución e induce habilidades a las especies para su sobrevivencia. En su forma malevolente, el estrés debilita a los animales hasta el punto en el que los procesos fisiológicos no son lo suficientemente rápidos para proteger al hospedero contra los ataques de organismos patógenos.

Los estanques pudieron ser infectados a través del agua o zooplancton, los cuales son reportados por ser portadores potenciales de WSSV (Lo *et al.*, 1996). Las granjas aledañas a la del estudio tuvieron presencia de mancha blanca casi a los inicios del ciclo de cultivo, por lo tanto se observó en ellas la presencia de gaviotas consumiendo al camarón enfermo que se orilla en los estanques. Estas aves son un vector potencial debido a que en numerosas ocasiones vuelan con el camarón enfermo y suele suceder de manera muy común que lo sueltan en otros estanques, ocasionando con ello la dispersión de la enfermedad. A pesar de lo anterior, los camarones de la granja no mostraron señales de la enfermedad sino hasta el final del ciclo, lo que indica que la granja aplicó un buen número de buenas prácticas de manejo y medidas de bioseguridad, las cuales retardaron ya sea la introducción y/o el desarrollo de las enfermedades. En el esquema 2 (anexo 5) se muestra un ejemplo del plan de vigilancia mediante tinción rápida para detectar WSSV e iniciar el programa de monitoreo.

Las infecciones virales comúnmente vienen acompañadas de infestaciones secundarias por epicomensales y bacterias filamentosas, las cuales pueden ser la última causa de muerte en camarones severamente afectados por la infección viral inicial (Brock 1992 y Lightner 1996). Autores como (Jonhson, 1975; Lightner, 1988, 1993, 1996; Brock, 1992) sugieren que los estanques de cultivo de camarón sirven como hospederos de organismos parásitos y epicomensales. En general, los estanques de cría de camarones estudiados, sirvieron como hospederos de organismos parásitos (*Nematopsis*) y epicomensales (*Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp. y *Leucothrix mucor*, principalmente) durante el período de estudio. Desafortunadamente durante el intervalo del tiempo de veda (octubre), tiempo el cual se presentó la mortalidad, no se registró la presencia de estos organismos epicomensales y endoparásitos en conjunto con la presencia WSSV o algún otro agente infeccioso. Los resultados histopatológicos reportan enfermedades mixtas en un estanque (12) causadas por dos agentes infecciosos (WSSV y NHP) donde fue encontrado un camarón con grado 4 de severidad de infección causada por WSSV en el epitelio estomacal y grado 4 de severidad de infección causada por NHP. Este camarón no presentó infestaciones por epicomensales y bacterias filamentosas.

Los resultados histopatológicos confirman la presencia de haplosporidios (Lightner, 1996). Este parásito intracelular se detectó en dos estanques (1 y 2), en los cuales también se detectó la presencia de microsporidios y WSSV. La presencia de microsporidios se ha observado comúnmente en poblaciones silvestres de camarón, donde se han reportado altas prevalencias de infección. Estos parásitos ocasionalmente son la causa de serias epizootias en la camaronicultura, pero no es común que la mayor parte de la enfermedad sea debida a microsporidios (Lightner, 1996). Este mismo autor sugiere que probablemente es debido a que el hospedero intermediario que necesita este protozooario parásito para completar su ciclo de vida es depredador del camarón (pez) y estos, son normalmente excluidos de los estanques de cultivo. Sin embargo las infecciones por microsporidios se consideran un problema en la

camaronicultura debido que, aunque causan bajas mortalidades, modifican físicamente el tejido muscular del camarón con infecciones avanzadas disminuyendo su valor comercial. En el caso de los haplosporidios, las infecciones son muy raras debido a que los huéspedes intermediarios normalmente no se encuentran en los estanques de cultivo (Lightner, 1996).

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:**

1. No existen trabajos que reporten los métodos y criterios que se deben aplicar para llevar a cabo un sistema de vigilancia y monitoreo en las granjas de camarón. Se recomienda llevar a cabo más estudios para establecer las metodologías y establecer criterios generales catalogados según los diferentes tipos de granjas (lo cual también falta por establecer) que sirvan de guía a los encargados de la salud de los camarones.
2. Se requiere que los productores estén conscientes de la importancia de los programas de vigilancia y monitoreo para obtener la cooperación total durante el desarrollo de estudios.
3. Para que un programa de vigilancia y monitoreo de la salud se lleve a cabo de manera eficiente se deben contemplar los siguientes aspectos:
  - a. Contar con un técnico capacitado en patología de camarones para que se encargue del programa de vigilancia y monitoreo. No se le podrán asignar otras tareas debido a que el programa debe ser permanente y exige toda la atención. El número de técnicos de apoyo depende del tamaño de la granja y de la estrategia del programa de vigilancia y monitoreo que se establezca.
  - b. Capacitación de todo el personal de la granja para que conozca las características normales (estado saludable) y las características de enfermedades (señales clínicas) de organismos enfermos y puedan cooperar con el técnico a cargo en la observación del estado de salud de las poblaciones de camarón de los distintos estanques.
  - c. El responsable de la salud de los camarones debe implementar un programa de vigilancia y monitoreo de acuerdo a las características de la granja (sistema de cultivo, tamaño de la granja, número y tamaño de estanques, de los antecedentes de enfermedades de la granja y de la zona en la que se encuentra enclavada, de los costos del sistema de vigilancia y monitoreo, calidad de agua etc.).
  - d. El encargado de la salud de los camarones en la granja debe estar enterado diariamente de los cambios que se presenten en los parámetros ambientales de cada estanque, de los recambios de agua y de los datos de alimentación para poder determinar la presencia de factores estresantes que puedan ocasionar una reducción en la respuesta inmune de los camarones y en consecuencia ocasionar el brote de una enfermedad.
  - e. El programa de vigilancia y monitoreo debe ser permanente durante todo el ciclo de cultivo.
4. La selección de estanques al azar, para iniciar el sistema de vigilancia se considera apropiado y se puede recomendar como parte de la metodología para establecer un programa de vigilancia.

5. El programa de monitoreo se establece cuando se han detectado brotes de enfermedades en los estanques, por lo que el seguimiento de la enfermedad para evaluar la prevalencia y la severidad depende de la situación de cada estanque, de la enfermedad, de la virulencia del patógeno etc. Por lo anterior, es necesario que el responsable sea un técnico entrenado en aspectos de patología del camarón, además de mantener una actualización constante sobre investigaciones de las enfermedades tanto conocidas como nuevas y las innovaciones en los métodos de diagnóstico adaptables a las granjas.
6. En el presente estudio no se llevó un programa de monitoreo dado que no se presentaron brotes de enfermedades virales sino hasta el inicio de la cosecha.
7. Se considera que 26% de los estanques seleccionados en este estudio es un número que representa al total de los estanques de la granja. Sin embargo, se recomienda que para el programa de vigilancia, la totalidad de los estanques sean muestreados por lo que se propone establecer un programa de 12 estanques en la primer semana y 11 estanques en la próxima, para poder determinar el estado de salud de los camarones en todos los estanques, lo que significa que cada estanque será muestreado quincenalmente.
8. El tamaño de muestra de 10 organismos por estanque se considera adecuado para el programa de vigilancia de esta granja (50 organismos por mes x 4 meses de cultivo = 200 organismos por estanque). No se recomienda un número menor a este. Se considera que 30 organismos es el tamaño de muestra mas adecuado tomando en consideración una prevalencia del 10% (150 organismos por mes x 4 meses = 600 camarones por estanque). Este número de organismos sacrificados no se considera una pérdida sino una ganancia en información útil para resguardar la salud de las poblaciones de los estanques.
9. En el caso de la granja en estudio, un patólogo a cargo no es suficiente para llevar a cabo los análisis presuntivos y darle seguimiento a la salud de los camarones. Se requiere al menos uno para análisis en fresco y otro para bacteriología. Los patólogos no podrán hacerse cargo de otras tareas.
10. Para que el programa de vigilancia funcione, es necesario que cuando se determine mediante análisis presuntivo una posibilidad de infección o infestación, se envíen muestras para realizar análisis en los niveles de diagnóstico II y III y confirmar el brote de enfermedades. De otra manera, los esfuerzos y costos realizados durante la vigilancia a nivel presuntivo son inútiles.
11. Se diagnosticó la presencia de deformidades de los túbulos del hepatopáncreas a lo largo de todo el ciclo con altas prevalencias. De manera presuntiva se supone probablemente la presencia de NHP. Se recomienda confirmar mediante análisis histopatológicos y/o mediante técnicas de biología molecular la presencia de estos patógenos desde el primer informe de deformación tubular para poder confirmar la presencia de esta bacteria y tomar medidas de control apropiadas. En este estudio no se realizaron este tipo de análisis por lo que no se confirmó la presencia de este patógeno sino hasta la cosecha en que se realizaron análisis histopatológicos.
12. Se diagnosticó la presencia de gregarinas desde el inicio del ciclo de cultivo con altas prevalencias, aunque estas no representaron un problema grave para la producción. Sin embargo, se recomienda la aplicación de Elancoban a concentraciones de 5.5 y 6 g kg<sup>-1</sup> para reducir su presencia y minimizar posibles efectos estresantes o daños histopatológicos. Así también, se recomienda

verificar la presencia de moluscos en el estanque ya que se supone son huéspedes intermediarios y aplicar molusquicidas para eliminarlos.

13. Los epibiontes encontrados durante todo el ciclo de cultivo no representaron ningún problema grave para los camarones durante el ciclo de cultivo. Sin embargo, se recomienda mantenerlos con bajas prevalencias debido a que en presencia de bajos niveles de oxígeno pueden ocasionar un estrés mayor.
14. Se recomienda que una vez que se han detectado enfermedades con alta virulencia como el virus de la mancha blanca, se le dé un seguimiento estricto a la prevalencia y a la severidad de los daños para decidir si se sigue con el ciclo de cultivo o se realizan cosechas parciales o totales de los estanques afectados.
15. Se recomienda no llegar a las fechas de cambios drásticos de temperatura cuando se ha detectado WSSV en las poblaciones de camarón.
16. Las técnicas de diagnóstico presuntivo de Nivel I (análisis en fresco) permiten la detección temprana de infestaciones por parásitos y epibiontes, detecta cambios en el comportamiento tales como anorexia, nado errático, camarones flotando o en las orillas de los estanques e indica señales clínicas que demuestran estrés y/o alguna enfermedad. Es importante implementar técnicas básicas de bacteriología en el programa de vigilancia para detectar concentraciones altas de bacterias en hepatopáncreas y hemolinfa y llevar a cabo su control mediante la aplicación de antibióticos. Las técnicas de tinción rápida no son lo suficientemente sensibles para detectar en sus inicios enfermedades tales como WSSV, TSV y YHV por lo que es necesario que se implementen técnicas más sensibles tales como anticuerpos monoclonales.
17. Las técnicas de diagnóstico presuntivo Nivel I son importantes y básicas pero no son efectivas si no se pasa a los niveles II y III y no se realiza un programa de vigilancia y monitoreo adecuados.

## LITERATURA CITADA

Aguado, N. G. y Bashirullah, K. M. 1995. Epibiontes y parásitos protozoarios de camarones peneidos de la región oriental de Venezuela. Biol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente 34 (1 & 2): pp. 49 – 58.

Alceste-Oliviero, C. 2001. Regional review of Aquaculture Status and Development Trends in the Latin America and the Caribbean. International Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. 23 - 32 pp.

Álvarez, P.P. 1998. Enfermedades producidas por parásitos en peces. 215-316. In: Patología en Acuicultura. J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (Editores). Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura. Mundi Prensa Libros, Madrid. Pp. 550.

Amos, K.H. 1985. Procedures for Detection and Identification of Certain Fish Pathogens. 3<sup>rd</sup> Edition, Fish health Section, American Fisheries Society. Corvallis, Oregón.

Arredondo, J.L. 1998. Calidad del agua en la acuicultura. Conceptos y Aplicaciones. A.G.T. Editor, S.A. Mexico, DF.

Ayala-Castañares, A., Gutierrez, M. y Malpica, M. 1970. Informe final de los estudios de Geología Marina en las regiones de Yavaros, Son., Huizache y Caimanero, Sin., y Agibampo, Sin., durante la primera etapa. Informe Depto. Cienc. Del Mar y Limnol. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México. Pp.3-190.

Bachere, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture 191: pp 3 – 11.

Bower, S.M. 1996. Sinopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish: Gregarine disease of penaeid shimp. URL. [http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/gregdpsp\\_e.htm](http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/gregdpsp_e.htm)

Boyd, C. E. y Tucker, C. S. 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer Academic Publishers. U.S. pp: 87 – 121.

Brock, T. D. 1966. Mode of Filamentous Growth of *Leucothrix mucor* on Pure Culture and in Nature, as Studied by Tritiated Thymidine Autoradiography. American Society for Microbiology. Journal of Bacteriology, Mar., 1967, 985-990 pp.

Brock, J. A. 1992. A Guide to the common problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. The World Aquaculture Society, Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70803 USA. 242 pp.

Bruce, L. D., Redman, R. M., Lightner, D. V. 1994. Application of gene probes to determine target organs of a penaeid shrimp baculovirus using in situ hybridization. Aquaculture, 120. pp:45-51.

Bush, A. O., Lafferty K. D., Lotz, J. M. y Shostak, A. W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.*, revisited. *J. Parasitol.*, 83(4): 575-583.

Cameron, A. 2002. Survey Toolbox for Aquatic Animal Diseases. A Practical Manual and Software Package. ACIAR Monograph No. 94, 375 pp.

Chapa-Saldaña, H. y Soto-López, R. 1969. Resultados preliminares del estudio ecológico y pesquero de las lagunas litorales del Sur de Sinaloa, México. Simposio de Lagunas Costeras. Mem. Simp. Inter.. Lagunas Costeras. In: Ayala-Castañares, A. y Phleger, F.B. (Eds.) UNAM-UNESCO. Pp.653-662. Nov. 28-30.

Conroy, D. A. y Conroy, G. 1990. Manual de patología de los camarones peneidos. Macaray 2101-A, Estado Aragua, Venezuela.

Couch, J. A. 1978. Diseases, Parasites, and toxic responses of commercial penaeid shrimps of the gulf of Mexico and South Atlantic coast of North America. *Fishery Bulletin*: VOL. 76. (1): 1 – 44.

Chanratchakool, P., Turnbull, J. F., Funge, S. J., MacRae, I. H. y Limsuwan, C. 1998. Health Management in Shrimp Ponds. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok; Thailand: 95 – 106.

Chanratchakool, P. 1999. White Spot Syndrome Virus: Prevention and Health Management in Thailand. Pages: 119-121. In B. W. green, H.C. Clifford, M. McNamara, and G.M. Montañó, Editors, V Central American Symposium on Aquaculture, 18-20 August 1999, San Pedro sula, Honduras. Asociacion Nacional de Acuacultores de Honduras, Latin American Chapter of the World Aquaculture Society, and Pond Dynamics/Aquaculture Collaborative Research Support Program, Choluteca, Honduras.

Fajer-Ávila, E. J., Morales-Covarrubias, M. S., Abad-Rosales, S., Roque, A., Meza-Bojórquez, P. y Hernández-González, C. 2005. Effectiveness of oral Elancoban™ and Avimix-ST™ against *Nematopsis* (Apicomplexa: Porosporidae) gametocyst infecting the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Vol. 249; pp: 11 – 58.

FAO/NACA. 2001. Manual of Procedures for the Implementation of Asia Regional Technical Guidelines on Health Management for the Responsible Movement of Live Aquatic Animals. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 402. pp: 106.

Feigenbaum, D. L. 1975. Parasites of the commercial shrimp *Penaeus vannamei* Boone and *Penaeus brasiliensis* Latreille. *Bulletin of Marine Science*, 25(4): 491 – 514.

Frelier, P. F., Loy, J. K. y Kruppenbach, B. 1992. Transmission of Necrotizing Hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 44-48.

Gomez-Jimenez, Silvia, Chavez-Sanchez, M.C., Abad, S., Montoya, L. and Garcia-Gasca, A. (*enviado para publicación*). Ammonia efflux rates in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* experimentally infected with white spot syndrome virus (WSSV) at two salinities.



Greber, U. F. 2001. Signalling in viral entry. *Cell. Mol. Life Sci.* 59 pp: 608 – 626.

Hansson, K. W., Lightner, D. V., Mari, J., Bonami, J. R., Poulos, B. T. Mohoney, L. L., Redman, R. M. y Brock, J. A. 1999. The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas determination by histopatology and in situ hybridization usin YSV – specific cDNA probes. *Aquaculture* 171: 13 – 26.

Horowitz A. and Horowitz S., 2003. Alleviation and prevention of disease in shrimp farms in Central and South America: a Microbiological approach. UPAH Tech, Inc., Enviromental and Aquaculture Microbiology Consultants, 3666 Stoer Road, Shaker Heights, Ohio 44122, USA.

ISA. 2003. Instituto Sinaloense de Acuicultura. Anuario Acuícola. Gobierno del Estado de Sinaloa. CD-ROM.

Jia J., Wijkstrom, U., Subasinghe, R. y Barg, U. 2001. Aquaculture Development Beyond 2000: Global Prospects. International Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. 7 – 10 pp.

Johnson, S. K. 1990. Handbook of Shrimp Diseases Sea Grant Publ. No. TAMU-SG-90-601, Texas A&M Univ.

Kabata, Z. 1985. Parasites and Diseases of Fish Cultured in the Tropics. Taylor & Francis. London Philadelphia. 319 pp.

Kudo, R. R. 1969. Protozoología. Editorial C.E.C.S.A. México, pp: 492 – 591.

Levine, N. D. 1971. Uniform Terminology for the Protozoan Subphylum Apicomplexa. *J. Protozool.* 18 (2); pp. 352 – 355.

Le Moullac, G. y Haffner, P. 2000. Enviromental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191: pp. 121 – 131.

Lightner, D. V., Redman, R. M. y Bell, T. A. 1983. Observations on the Geographic Distribution, Pathogenesis and morphology of the Baculovirus form *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 32. pp: 209.233.

Lightner, D. V. 1988. Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. En: Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. C. J. Sinderman y D. V. Lightner (eds.) Elsevier, Amsterdam. pp: 8-127.

Lightner, D. V., Williams, R. R., Bell, T. A., Redman, R. M. y Perez, L. A. 1992. A collection of case documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. *ICES mar. Sci. Symp.*, 194: 97-105.

Lightner, D. V. 1993. Diseases of cultured Penaeid Shrimp. In: J. P. McVey Handbook of mariculture. CRC Press. Boca Raton, Florida. U.S.A. p.c. 393-486.

Lightner, D. V. y Redman, R. M. 1994. An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultures penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. *Aquaculture*, Issue 1, Vol. 122. pp: 9-18.

Lightner, D. V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 234 pp.

Lightner, D. V. y Pantoja, C. R. 1999. Manual para el diagnóstico en enfermedades en el camarón. Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, Tucson, Arizona 85721, USA

Lightner, D. V. y Pantoja C. R. 2001. Bioseguridad en el cultivo de camarones. Métodos para mejorar la camaronicultura en Centroamérica. Managua, Nicaragua. 123 – 164 pp.

Lightner, 2003. Exclusion of specific pathogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program. Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, Tucson, Arizona 85721, USA.

Martínez, L. C. 1999. Cultivo de Camarones Peneidos. Agt. Editor, S. A., México: 1 – 30 pp.

Menz, A., Blake, B.F. 1980. Experiments on the growth of *Penaeus vannamei* Boone. *J. exp.Mar. Biol.Ecol.*, 48:99-111.

Momoyama, K. y Sano, T. 1988. A method of experimental infection of karuma shrimp larvae, *Penaeus japonicus* Bate, with baculoviral gut gland necrosis (BMN) virus. *Journal of Fish Diseases*, 11. pp: 105-111.

Morales, M. S. y Chávez, M. C. 1999. Manual para la detección de enfermedades en camarones peneidos utilizando análisis en fresco. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Hermosillo, Sonora, México. 68 pp.

Morales, M. S. 2004. Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. México: Trillas. 122 pp.

Morales, M. S., Osuna, A. G., Garcia-Gasca, A., Lightner, D. V. y Mota-Urbina, J. C. (*en prensa*). Effects of unilateral ablation and hormone injection in female broodstock of *Penaeus vannamei* and relationship with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) caused by intracellular rickettsia-like bacterium. *Journal of Aquatic Animal Health*. Enviado 22 de enero de 2005.

MPEDA/NACA. 2003. Shrimp Health Management Extension Manual. Prepared by the network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA) and Marine Products Export Development Authority (MPEDA), India, in cooperation with the aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand; Siam Natural Resources Ltd., Bangkok, Thailand; and AusVet Animal Health Services, Australia. Published by the MPEDA, Cochin, India.

Newman, S. G. 2004. Management and Prevention of Stress in Aquaculture with focus on farmed shrimp. URL: <http://www.aqua-in-tech.com>

López-Portillo, J. y Ezcurra, E. 1989. Response of three mangroves to salinity in two geofoms. *Functional Ecology* 3: 651-669.

Office International des Epizooties (OIE). 2003. Manual of aquatic diagnostics tests. URL: <http://www.oie.com>

Overstreet, R. M., Stuck, K. C., Krol, R. A. y Hawkins, W. E. 1988. Experimental Infections with *Baculovirus penaei* in the White Shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) as a Bioassay. *Journal of the World Aquaculture Society*, 19. pp: 175-189.

Pérez, F.I. y Kensley, B. 1997. Panaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Key and diagnoses for the families and genera. *Memories du Museum Natinal D'histoire Naturelle*, 175: 1 – 233.

Phleger, F.B. y Ayala-Castañares, A. 1972. Ecology and development of two Coastal Lagoons in Northwest Mexico. *An. Inst. Biol. Natl. Autón. México. Ser. Cienc. Del Mar y Limnol.* Pp.1-20.

Reyes Corrales Luis Gustavo. 2004. Efecto de la carga parasitaria por gregarinas *Nematopsis* (Apicomplexa) sobre el crecimiento y factor de condición del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, bajo dos densidades de siembra; y lesiones intestinales asociadas. Tesis para obtener el título de Licenciado Biólogo Acuicultor. Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, Sinaloa. Pp. 60.

Sniensko, S. F. 1973. Diseases of fishes and their control in the U.S. In: *The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report*. Jansen, London, pp. 55 – 66.

Spague, V. 1954. protozoo. Galtsoff (Coordinator), *Gula of Mexico, Its Origin, waters and marine life*. U.S. Fish Wildlife Service., Fisheries Bulletin 256 pp.

Stern, S., Caniela, H., and Lettelier, E. 1990. Tolerance of postlarvae and juveniles *Penaeus vannamei* to low salinity. In: *Abstracts, World Aquaculture 90*, Halifax, Nova Scotia, Canada, T30. 12, National Research Council, Canada, Ottawa, Ontario.

Subasinghe, R. y Bernoth, E. M. 2001. Disease Control and Health Management. *Aquaculture development, health and wealth. International Conference on Aquaculture in the Third Millennium*, Bangkok, Thailand. 145 - 158 pp.

Wyban, J. A. y J. N. Sweeney. 1991. The Oceanic Institute Shrimp Manual – Intensive Shrimp Production Technology. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii. 158 pp.

Zar, J.H. 1996. Biostatistical Analysis. Third Edition. Department of Biological Sciences. Northern Illinois University. 694 pp.

Zarain, M. y Ascencio, F. 2001. Taura Syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture* 193: 1 – 9.





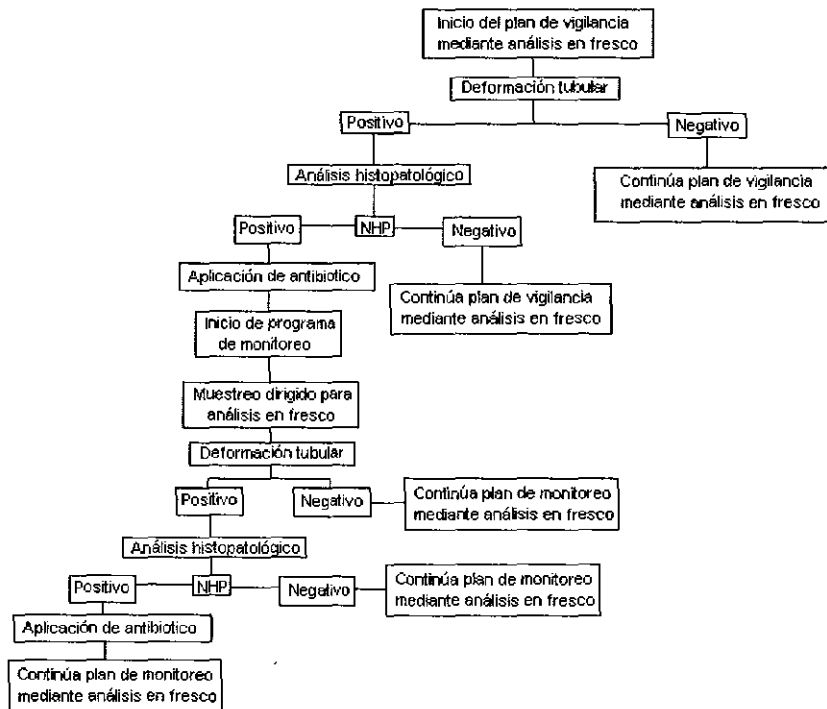
**ANEXO III**

Formato 3. Hoja de captura para análisis histopatológico

		Estanque 1						Estanque 2						Estanque 3					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
HP	NHP																		
	Gran																		
	Nod																		
	BP																		
	MBV																		
Est	WSSV																		
	Pic																		
	Car																		
	Infl																		
Bra	WSSV																		
	Infl																		
	Epi																		
G.Ant	WSSV																		
Cor	Micr																		
	Pic																		
	Car																		
O.Linf	WSSV																		
	Esf																		
Músc	Micr																		
	Bac																		
	Infl																		
T.Hem	WSSV																		
Int	Gre																		
	WSSV																		
	Infl																		

## ANEXO IV

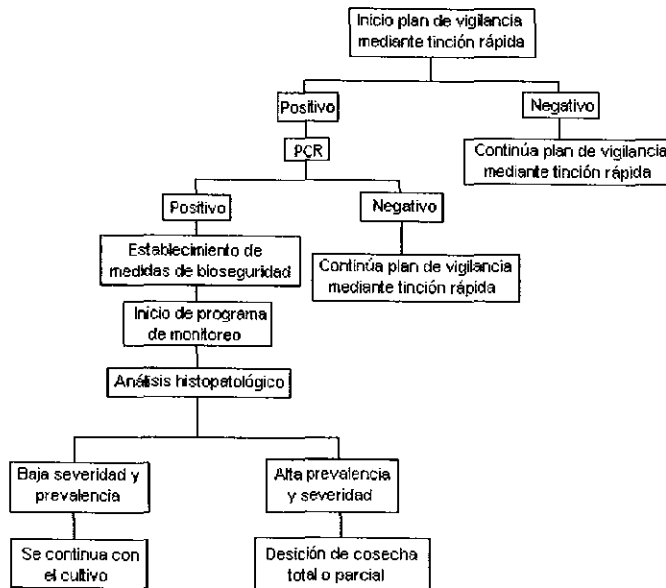
Esquema 1. Plan de vigilancia mediante análisis en fresco para detectar la presencia de NHP e iniciar el programa de monitoreo.





## ANEXO V

Esquema 2. Plan de vigilancia mediante tinción rápida para detectar WSSV e iniciar el programa de monitoreo.



## ANEXO VI

Prueba hematológica para detectar de manera rápida la presencia de YHV en camarones vivos.

Se toma una muestra de hemolinfa de los organismos sospechosos y se observa al microscopio para buscar hemocitos con núcleos atrofiados en inclusiones citoplasmáticas. La toma de hemolinfa en los camarones se realiza de la siguiente manera:

1. Se llena una jeringa de 1 ml con 0.5 ml de formalina al 10% preparada con agua de mar.
2. Se obtienen 0.5 ml de hemolinfa del corazón o del seno ventral, y se mezclan lentamente con la formalina.
3. Microscopia de rutina:
  - a. Se prepara un frotis (lámina delgada de la muestra) de la hemolinfa-formalina-agua de mar en un portaobjetos y se deja secar.
  - b. Se fija el frotis sumergiendo el portaobjetos en metanol al 100% durante cinco minutos y se deja secar al aire.
  - c. Se tiñe con tinción de Wright de tres a cinco minutos.
  - d. Se sumerge en agua destilada y se ajusta el pH de 6.2 a 6.8, de cinco a seis minutos.
  - e. Se tiñe en una solución de Giemsa con agua destilada 1:10, durante 30 minutos.
  - f. Se lava la lámina con agua destilada para eliminar el exceso de tinción.
  - g. Se diferencia la lámina con agua destilada y se ajusta a un pH de 6.2, de 15 a 30 minutos.
  - h. Se enjuaga bien la lámina en agua destilada; se seca y se añade una gota de resina; se cubre con un cubreobjetos.
  - i. Se examina bajo el microscopio a 40X o 60X. Se buscan hemocitos que tengan picnosis, cariorrexis y cuerpos de inclusión citoplásmicas perinucleares basofílicas.