

TESIS DEFENDIDA POR  
JOSÉ ANGEL OLIVAS VALDEZ  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez  
*Director del Comité*

---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
*Miembro del Comité*

---

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla  
*Miembro del Comité*

---

Dr. Marco Linné Unzueta Bustamante  
*Miembro del Comité*

---

Dra. Carmen Paniagua Chavez  
*Coordinador del programa de posgrado en  
con orientación en Acuicultura*

---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales  
*Director de Estudios de Posgrado*

15 de Septiembre de 2008

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

---

**EVALUACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA DEL CAMARÓN CULTIVADO EN BAJA  
CALIFORNIA Y EFECTO DEL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) A  
DIFERENTES SALINIDADES**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

**JOSÉ ÁNGEL OLIVAS VALDEZ**

Ensenada, Baja California, México, Septiembre del 2008.

**RESUMEN** de la tesis de **José Ángel Olivas Valdez**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS en Acuicultura y Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Agosto del 2008.

**Determinación de la carga parasitaria del camarón cultivado en Baja California y efecto del virus de la mancha blanca (WSSV) a diferentes salinidades.**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Jorge A. Cáceres Martínez

Se estudió la carga parasitaria del camarón cultivado en Baja California, México; el estudio se efectuó en siete granjas de camarón *Litopenaeus vannamei* ubicadas en los municipios de Ensenada y Mexicali, B. C. en ellas, se determinó la carga parasitaria mediante análisis en fresco de los tejidos (branquias, hepatopáncreas e intestino). Se encontraron adheridas a las branquias de los camarones bacterias filamentosas tipo *Leucothrix* y protozoos coloniales peritricos tipo *Zoothamnium* y *Epistylis* principalmente. Se observó un incremento en la prevalencia desde el inicio del cultivo hacia la parte final (P= 22% inicio y P= 100% final) así como un aumento en el grado de severidad GS=1.3 y GS=3.2 comienzo del cultivo y final del cultivo respectivamente. Además se encontraron otros simbiontes como rotíferos (*Philodina*), diatomeas (*Nitzschia*) y algas verde azules coloniales ocasionalmente adheridos a la superficie corporal incluyendo la cámara branquial de los camarones. Además se encontraron lesiones en el tejido branquial como melanosis, necrosis e infiltración hemocítica. Dichas lesiones es probables que se hayan relacionado con la presencia de epibiontes encontrados sobre las branquias, mas un efecto sumado de condiciones ambientales en detrimento hacia la parte final del ciclo de cultivo. Los análisis histopatológicos revelaron la presencia del IHNV (Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa) en camarones de todas las granjas. Sin embargo no se encontró daño severo en los tejidos ocasionado con su presencia.(P=0-30% y GS=1.2). Además se observaron problemas bacterianos en una de las granjas estudiadas, los cuales influyeron en las sobrevivencia al final del cultivo y estos a su vez posiblemente estuvieron influenciados por las condiciones de calidad del agua empleada en el cultivo. A nivel histológico se encontraron inclusiones granulosas refringentes en epitelio de los túbulos del hepatopáncreas sin existir referencias de diagnósticos en anteriores reportes por lo que para llegar a una clasificación serán necesarios mayores estudios.

Se realizó un bioensayo de infección con camarón *L. vannamei* en estadio de juveniles ( $2.0 \pm 0.5$  g) a los cuales se les inyectó el Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y se les expuso a diferentes concentraciones de salinidad (0, 15, 30, 45 y 60 g/L<sup>-1</sup> de salinidad). Se evaluó la concentración osmótica de la hemolinfa y el desarrollo de la infección viral mediante histopatología. Los organismos alcanzaron una fase avanzada de infección después de 36 h.p.i. (horas post inyección) con presencia de organismos muertos a partir de 30 h.p.i. El virus fue detectado en los tejidos de organismos inyectados a las 9:45 h.p.i. mediante PCR e histopatología. Los organismos sometido a a bajas salinidades (0 y 15 g/L<sup>-1</sup>), fueron poco afectados en su capacidad osmorreguladora, en tanto tratamientos con salinidades de 30, 45 y 60 g/L<sup>-1</sup> fueron fuertemente afectados en su capacidad osmorreguladora. Se discuten los resultados en torno a las diferencias encontradas.

**Palabras Clave:** camarón, *L. vannamei*, epibiontes, IHNV, WSSV, baja salinidad

**ABSTRACT** of the thesis presented by **JOSÉ ANGEL OLIVAS VALDEZ** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree with orientation in AQUACULTURE. Ensenada, Baja California, México, september of 2008.

**Determination of the parasitic load in the shrimp culture in Baja California and effect of the White Spot Syndrome Virus (WSSV) to different salinities.**

A study was carried out to determine the parasitic load of the shrimp culture in Baja California, Mexico. The study became in seven farms of shrimp *Litopenaeus vannamei* located in the municipalities of Ensenada and Mexicali, B.C. these farms used three different saline environments. The study included fresh tissue samples, histopathologic testing, and specific molecular tests for White Spot Syndrome Virus (WSSV).

Colonies of the peritrichous protozoan *Zoothamnium* sp. were found attached to gills in shrimp grown in marine environments (with salinity of 35.9 ups) with prevalence ranging from 0 to 80% and a severity range of 1 to 2 (P=0-80%, GS=1-2), where the filamentous bacteria *Leucothrix* sp. (P=0-50%, GS=1-3) was also found. In cultured shrimps with groundwater (salinity of 1.6 ups), the epibionts associated to the gills were diatoms (P=0-20%, GS=1-2) and rotifers (P=0-40%, GS=1-2). And shrimps, where river-derived water was used (salinity ranging from 0.8 to 5.3 ups), colonial euglenoid algae (P=0-100% GS=1-2), peritrichous protozoa *Epistylis* sp. (P=0-100%, GS= 1-3) and filamentous bacteria *Leucothrix* sp. (P= 0-100, GS=1-3) were found, with branchials epibions. Histopathologic tests revealed melanosis, necrosis and hemocytic infiltration in gills, associated to epibionts and environmental conditions. Furthermore Cowdry type "A" inclusion bodies related to Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV), were also observed in shrimp of all of the farms studied (P= 2-36 % y GS=1-2). The histopathologic test performed on the shrimp hepatopancreas revealed the presence of bacterial infections (P=15-69%, GS= 1-4). Inclusions with multiple eosinophilic spheres in their interior were found in the epithelium of the tubules. Specific molecular tests for white spot virus were negative.

An accumulated mortality rate of 90% showed up in the farm that used groundwater. In the rest of the farms accumulated mortality ranged between 10 and 64 %. In general, a pattern of increase in symbionts and pathogens was observed towards the end of the cultivation cycle as well as a decrease in the concentration of dissolved oxygen, showing the critical point to which production is exposed. From an ecologic point of view, the fact that different species of symbionts were found in the different environments that were studied indicates that shrimp gills are a readily available ecological niche that under cultivation conditions can impose a disadvantage for the production and survival of shrimp.

A bio-test of infection with shrimp *L. vannamei* was realized (2,0 ±0.5 g) to which became injected with the White Spot Syndrome Virus (WSSV) and it was exposed to them to different concentrations from salinity (0, 15, 30, 45 and 60 g/L<sup>-1</sup> of salinity). One evaluated the osmotic concentration of hemolymph and the development of the viral infection by means of histopathology. The organisms reached a phase infection outpost after 36 h.p.i. (hours post injection) with organisms died from 30 h.p.i. The virus was detected in tissues of organisms injected to the 9:45 h.p.i. by PCR and histopathology. The shrimp a low salinities (0 and 15 g/L<sup>-1</sup>), were little affected in their osmoregulatory capacity, as much treatments with salinities of 30, 45 and 60 g/L<sup>-1</sup> strongly were affected in their osmoregulatory capacity. Are discussed results around the found differences.

**Keywords:** shrimp, *L. vannamei*, epibionts, IHHNV, WSSV, low salinity.

## *Dedicatoria*

### *A mis Padres, Alicia y Ángel*

Por brindarme siempre su amor, porque para mi no hay mayor orgullo que sentirme parte de ustedes. Mis viejos, sirva este trabajo como un tributo a todo su esfuerzo por sacarnos adelante.

### *A mi esposa, Mabel*

Por tu incondicional apoyo, porque has sido mi inspiración en todo lo que emprendo y porque de muchas formas este trabajo también es tuyo.

### *A mis hermanos, Cruz, Josefina, Marisela y Miguel*

Por sus constantes porras, porque a donde quiera que vaya los llevaré siempre conmigo.

### *A mis abuelos, Dolores y Pascuala*

El saber que los hago sentir orgullosos, ha sido un motor en mi vida que me ha permitido sacar fuerzas de donde pense que no existían.

### *A mis hijas, Leslie, Karen y Karime*

Las futuras profesionistas de la familia. Ánimo, el mundo está allí para ustedes.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CICESE, especialmente a la planta de investigadores del Departamento de Acuicultura, a quienes les estoy profundamente agradecido, por el apoyo brindado durante mi estancia en la institución.

Al CONACYT por otorgarme la beca, para la realización del doctorado.

A mi director de tesis Dr. Jorge A. Cáceres Martínez por su apoyo en la realización de este trabajo y miembros de mi comité Dr. Jorge de la Rosa Vélez (Q.E.P.D.), Dra. Beatriz Cordero Esquivel, Dr. Miguel Ángel del Río Portilla y Dr. Marco Linné Unzueta Bustamante que con sus valiosas contribuciones enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Rebeca Vásquez Yeomans del ISA-A.C. por su colaboración en el proyecto BC-2004-C01-032 apoyado por el Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del Estado de Baja California, parte del cual se desprende este trabajo.

A la Técnico del Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE. M. en C. Yanet Guerrero Rentarías. Por su valiosa ayuda en el procesamiento histológico de muestras, mantenimiento de organismos experimentales y colaboración en los bioensayos de infectología.

Al Técnico del Laboratorio de Genética del Departamento de Acuicultura del CICESE. M. en C. Omar Mendoza Porras. Por su ayuda en la estandarización de protocolos moleculares y recuperación de ADN de muestras almacenadas.

A los Técnicos de la Dirección de la División de Oceanología del CICESE. Francisco Javier Ponce Isguerra y José María Domínguez Olachea. Por su apoyo en el dibujo técnico-científico.

A las M. en C. Gissel Tinoco Orta, M. en C. Marcela del Rosario Saracco Álvarez y M. en C. Julieta del Carmen García López. Por su invaluable ayuda, durante el desarrollo del bioensayo de infectología.

A los productores, dueños de las granjas de camarón en el Valle de Mexicali y de la región de Ensenada. Quienes amablemente accedieron a facilitar sus instalaciones para este estudio.

A mi familia de acá Rubén González y Sofía Carrillo, Daniel, Chito, Charo, Momoy, Doris, Nacho y Omar pues sé que han vivido este esfuerzo como suyo.

A mis tíos, hermanos, primos y sobrinos por sus constantes porras. Comparto con ellos éste logro pues sé que ven en él, la coronación sus propios deseos de superación.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	1
I.1. Camaronicultura.....	1
I.2. <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	1
I.3. Cultivo de camarón.....	2
I. 4. Enfermedades del camarón.....	5
I.4.1 Enfermedades virales en el camarón de cultivo.....	6
I.4.2 Enfermedades bacterianas.....	8
1.4.3 Enfermedades causadas por protozoos.....	10
1.4.4 Enfermedades causadas por hongos.....	12
I.5. Justificación.....	14
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	17
II.1. Objetivo general.....	17
II.1.1. Objetivos particulares.....	17
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	18
III.1. Zona de estudio.....	18
III.1.1. Municipio de Ensenada.....	19
III.1.2. Municipio de Mexicali.....	19
III.2. Registro de variables ambientales.....	20
III.3. Muestreo de organismos.....	21
III.4. Análisis clínico.....	21
III.4.1. Análisis de branquias.....	21
III.4.2. Análisis de hepatopáncreas.....	22
III.4.3. Análisis de intestino medio y posterior.....	23
III. 5. Análisis histopatológico.....	24
III.6. Análisis mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	25
III.7. Bioensayo de infectología con WSSV.....	25
III.7. 1. Organismos experimentales.....	25
III.7.2. Preparación del inóculo viral.....	26

<b>CONTENIDO (continuación)</b>	<b>Página</b>
III.7.3. Bioensayo de infección con WSSV.....	27
III.7. 3.1. Determinación de osmolaridad.....	28
III. 8. Análisis estadístico.....	29
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
IV.1. Carga parasitaria de los camarones cultivados en Baja California.....	30
IV.1.2 Revisión en fresco de los camarones en las granjas del municipio de Ensenada.....	30
IV.1.2.1 Granja 1.....	30
IV.1.2.1.1 Branquias.....	30
IV.1.2.1.2 Hepatopáncreas.....	32
IV.1.2.1.3 Intestino.....	34
IV.1.2.2 Granja 2.....	34
IV.1.2.2.1 Branquias.....	34
IV.1.2.2.2 Hepatopáncreas.....	35
IV.1.2.2.3 Intestino.....	37
IV.1.3. Revisión en fresco de los camarones en las granjas del Valle de Mexicali.....	39
IV.1.3.1 Branquias.....	39
IV.1.3.2 Hepatopáncreas.....	40
IV.1.3.3 Análisis de intestino.....	41
IV.2.1. Análisis histopatológico del camarones cultivados en Baja California.....	41
IV.2.1.1. IHHNV.....	41
IV.2.1.2 Necrosis y melanosis branquial.....	43
IV.2.1.3. Bacteriosis.....	44
IV.2.1.3. Inclusiones en el epitelio de los THP.....	45
IV. 3. Diagnóstico por PCR.....	47
IV.4. Registro de variables ambientales de las granjas de camarón de los municipios de Ensenada y Mexicali.....	47



<b>CONTENIDO (continuación)</b>	<b>Página</b>
IV.4.1. Composición iónica del agua utilizada para el cultivo del camarón en los municipios de Ensenada y Mexicali.....	48
IV. 4.2 Relación de parámetros ambientales y la presencia de epibiontes.....	49
IV.4.3. Nivel del estanque, Turbidez y Amonio total.....	51
IV. 5. Supervivencia.....	51
IV. 6. Bioensayo de infectología con WSSV.....	54
IV.6.1.Desarrollo de la infección viral.....	54
IV.6.2. Cuadro Clínico de organismos infectados con el WSSV.....	54
IV.6.3. Tasa de mortalidad.....	55
IV.6.4. Patogénesis viral.....	56
IV.6.5. Órganos afectados por WSSV.....	59
IV.6.6. Comparaciones estadísticas entre grupos experimentales.....	60
IV.6.7. Efecto de la infección con WSSV en la osmorregulación del camarón <i>L. vannamei</i> .....	61
IV.6.8. Diagnóstico por PCR.....	62
IV.6.9. Variables ambientales durante el bioensayo experimental.....	63
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>64</b>
V.1.Discusión de resultados en granjas.....	64
V.1.1. Epibiontes en branquias en las granjas del municipio de Ensenada.....	64
V.1.2. Epibiontes en branquias en las granjas del municipio de Mexicali	68
V.1.3. Lesiones observadas en branquias.....	70
V.1.4. Análisis de hepatopáncreas e intestino.....	70
V.1.5 Análisis histopatológicos.....	71
V.2 IHHNV.....	71
V.2.1 Bacteriosis.....	72
V.2.3 Inclusiones en los túbulos del hepatopáncreas en ATS.....	73

<b>CONTENIDO (continuación)</b>	<b>Página</b>
V.2.4 Efectos de los diferentes ambientes de cultivo en la carga parasitaria del camarón.....	74
V.2.4.1 Mortalidad asociada a la presencia de deficiencias de potasio.....	77
V.3 Bioensayo de infectología.....	78
V.3.1 Desarrollo de la infección viral por inyección.....	78
V.3.2 Cuadro Clínico de organismos infectados con el WSSV.....	80
V.3.3 Tasa de mortalidad.....	81
V.3. 4 Patogénesis viral y órganos afectados por el WSSV.....	82
V.3.5 Efecto de la infección con WSSV en la osmorregulación del camarón <i>L. vannamei</i> .....	83
V.3.6 Análisis de PCR.....	84
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>86</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO I.....</b>	
<b>ANEXO II.....</b>	
<b>ANEXO III.....</b>	
<b>ANEXO IV.....</b>	

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> , tomado de Lee y Wickins (1992).....	2
2	Zona de estudio en donde se muestran los municipios de Ensenada y Mexicali y la ubicación de las granjas correspondientes al estudio.....	20
3	<b>A)</b> Preparación en fresco de branquias de camarón donde se observan dos tipos de epibiontes observados en el cultivo del camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> durante este estudio. BF= bacterias filamentosas (tipo <i>Leucothrix</i> ), PC= protozoos ciliados coloniales (tipo <i>Zoothamnium</i> ). Ampliación 630 X. <b>B.-</b> Preparación en fresco de branquias donde se observa un área necrótica focal con depósitos de melanina sobre cuatro lamelas branquiales, así como adherencias (AD). NB= Necrosis branquial, AD= Adherencias (bacterias y microalgas) Ampliación 630 X.....	30
4	Prevalencia y grado de severidad por epibiontes y lesiones en branquias de camarones cultivados en los estanques de la granja 1. Cada barra de izquierda a derecha corresponde a estanques 1, 2 y 3. ☒= Melanosois branquial, ☒= Necrosis y melanosis branquial, ☒= Necrosis branquial, ☒= Bacterias filamentosas (tipo <i>Leucothix</i> ), ☒= Protozoos ciliados coloniales (tipo <i>Zoothamnium</i> ) + Bacterias filamentosas (tipo <i>Leucothrix</i> ), ☒= Protozoo tipo <i>Zoothamnium</i> + Necrosis branquial .....	31
5	Preparación en fresco de túbulos del hepatopáncreas en camarones de la granja 1. <b>A.-</b> Túbulos del hepatopáncreas con pared lisa (PL), sin arrugas, ni hinchamientos y con abundantes vacuolas lipídicas (VL), los túbulos no presentan deformidad (GS-0). Ampliación 100 X, <b>B.-</b> Túbulos del hepatopáncreas con presencia leve de túbulos estrangulados (TE) y moderada cantidad de paredes rugosas (PR). La imagen presenta un GS-1 en deformidad de los túbulos. Ampliación 100X.....	33
6	Gráfica donde se observa el porcentaje de prevalencia de la deformidad en los túbulos del hepatopáncreas y el grado de severidad encontrada en camarones de la granja 1 durante el ciclo de producción 2003.....	34







Figura	Lista de Figuras (continuación)	Página
7	Resultados de revisión en fresco de las branquias en los camarones de la granja 2.....	36
8	Prevalencia y grado de deformidad en los túbulos del hepatopáncreas observados en la granja 2.	37
9	Preparación en fresco del hepatopáncreas en camarones de la granja ATS. <b>A.-</b> Moderada cantidad de túbulos estrangulados (TE). Abundantes túbulos con paredes rugosas (PR) Los túbulos se observan delgados y con epitelio inflamado (EI), en general se observa un GS-2 en deformidad. Ampliación 100 X <b>B.-</b> Estrangulación marcada de túbulos del hepatopáncreas (GS-3), las flechas señalan los lugares de estrangulación (E) así como el epitelio inflamado (EI). Ampliación 200X.....	38
10	Grado de severidad y prevalencia de epibiontes y lesiones encontrados en los estanques de camarón cultivado en el Valle de Mexicali.  = Algas coloniales Euglenoides tipo <i>Colasium</i> ,  = Algas coloniales Euglenoides tipo <i>Colasium</i> + Bacterias filamentosas tipo <i>Leucothrix</i>  = Bacterias filamentosas tipo <i>Leucothrix</i>  = Protozoos ciliados tipo <i>Epistylis</i>  = Bacterias filamentosas tipo <i>Leucothrix</i> + Protozoos ciliados tipo <i>Epistylis</i>  = Bacterias filamentosas tipo <i>Leucothrix</i> + Necrosis branquial.....	39
11	Túbulos del hepatopáncreas de camarones del Valle de Mexicali. Se observa una ligera carencia de vacuolas lipídicas (CVL) señaladas por las flechas, así mismo, se observan algunos túbulos deformes (TD) señalados por las flechas. La muestra presenta un grado de severidad leve (GS-1). Ampliación 100 X.	41
12	Tejidos donde fue más frecuente encontrar los cuerpos de inclusión característicos del IHHN. <b>A.-</b> Vista general de una porción del tejido hematopoyético, las flechas señalan los cuerpos de inclusión (CI) característicos del IHHNV (H-E, aumento 200 X). <b>B.-</b> Tejido branquial con cuerpos de inclusión tipo IHHNV, señalados por las flechas (H-E, aumento 400 X). <b>C.-</b> Preparación histológica de pleura branquial donde se aprecian 3 cuerpos de inclusión típicos de IHHNV (H-E, aumento 630 X). <b>D.-</b> Porción de tejido ovárico inmaduro donde se señalan con flechas 2 cuerpos de inclusión tipo IHHNV en la parte inferior y uno en la parte superior (H-E, aumento 400 X).....	42

Figura	Lista de Figuras (continuación)	Página
13	<p><b>A)</b> Vista general de un corte longitudinal de branquias de camarón donde se observa melanosis (M) y necrosis (N) multifocal elevada en las lamelas branquiales con GS-3 (H-E aumento 100 X). <b>B)</b> Necrosis y melanosis branquial moderada, con GS-2 (H-E, aumento 200 X). <b>C)</b> Melanosis focal leve en branquias, se observa asociada infiltración hemocítica (IH) con GS-1 (H-E aumento 400 X). <b>D)</b> Infestación moderada (GS-2) de protozoos ciliados tipo <i>Zoothamnium</i> (PCZ) localizados en las branquias de camarón (H-E, aumento 200 X).....</p>	43
14	<p><b>A.-</b> Túbulos del hepatopáncreas (THP) con atrofia generalizada, presencia de túbulos necróticos (TN), infiltración hemocítica (IH) y encapsulación (E). Corte 5 micras tinción H-E, aumento 100 X. <b>B.-</b> Túbulos del HP, se observan dilatados (TD), encapsulación (E) y túbulo necrótico (TN). Corte 5 micras tinción H-E, aumento 100 X. <b>C.-</b> Detalle de los túbulos del hepatopáncreas donde se observan bacterias (MB) basófilas en el lumen de los túbulos. Corte a 5 micras tinción H-E, aumento 400 X. <b>D.-</b> Región anterior a la cámara gástrica, donde se observa infiltración hemocítica (IH) y encapsulación (E) contiguos a un túbulo de la glándula antenal. Corte a 5 micras tinción H-E, aumento 100 X.....</p>	44
15	<p><b>A.-</b>Vista general del hepatopáncreas donde se observan 5 inclusiones granulosas (IG), en el epitelio tubular señaladas con flechas (Corte 5 micras, tinción H-E, 200 X). <b>B.-</b> Ampliación de las inclusiones granulosas (IG), donde se aprecian múltiples esferas refringentes anucleadas. (Corte 5 micras, tinción H-E, 630 X).....</p>	45
16	<p>Comportamiento del oxígeno disuelto en el estanque y grado de severidad por epibiontes en las branquias de los camarones de la granja 1 en el municipio de Ensenada, (las barras señalan el grado de severidad por epibiontes).....</p>	50
17	<p>Tendencia del nivel de oxígeno en los estanques y grado de severidad observado en las branquias de los camarones de las granjas de Mexicali durante el ciclo de cultivo (las barras señalan el grado de severidad por epibiontes).....</p>	50


















Figura	Lista de Figuras (continuación)	Página
18	Incremento en la biomasa de camarón en los estanques de la granja 1, durante el ciclo completo de producción; se observa como los epibiontes se incrementan durante el cultivo, mientras el nivel de oxígeno tiende a disminuir.....	53
19	Ejemplares de <i>L. vannamei</i> infectados con WSSV, el señalado por la flecha presenta las señales clínicas de estado avanzado de la infección viral, exhibe un color café-rojizo y pérdida del equilibrio, los dos restantes solo presentan el estómago vacío e inapetencia por el alimento.....	55
20	Promedio general de la prevalencia de infección (barras) y grado de severidad (línea) observado en el camarón <i>L. vannamei</i> infectado con WSSV por vía intramuscular.....	56
21	Comparación histológica del tejido epitelial estomacal con diferentes grados de severidad. <b>A)</b> Tejido epitelial ligeramente infectado (GS=1) donde se observan 3 cuerpos de inclusión (CI) señalados por flechas, corte 5 micras tinción H-E, aumento 100 X. <b>B)</b> Tejido epitelial estomacal y tejido conectivo con presencia moderada de CI del WSSV (GS=2), donde sobresalen C.I. característicos del WSSV, corte 5 micras tinción H-E, aumento 200 X. <b>C)</b> Tejido epitelial estomacal con presencia de numerosos CI del WSSV (GS= 3) corte 5 micras tinción H-E, aumento 630X. <b>D)</b> Región estomacal anterior cercana al esófago con múltiples CI (GS=4) corresponde a un estado avanzado de la infección, corte 5 micras tinción H-E, aumento 200 X.....	58
22	Grados de severidad observados mediante histopatología en diferentes órganos y tejidos del camarón <i>L. vannamei</i> a las 13:08 h.p.i. con WSSV.  .- Epitelio estomacal,  .- Ganglios nerviosos,  .- Tejido conectivo,  .- Cordón Nervioso Ventral  .- Glándula antenal,  .- Epitelio tegumental,  .- Tejido hematopoyético,  .- Órgano Linfoide..	59
23	Grados de severidad observados mediante histopatología en diferentes órganos y tejidos del camarón <i>L. vannamei</i> a 51:55 h. post-inyección con WSSV.  .- Epitelio estomacal  .- Ganglios nerviosos,  .- Tejido conectivo,  .- Cordón Nervioso Ventral,  .- Glándula antenal,  .- Epitelio tegumental,  .- Tejido hematopoyético,  .- Órgano linfoide,  .- Branquias,  -Epipodito branquial.....	60

Figura	Lista de figuras (continuación)	Página
24	Patrón de osmorregulación observado en camarones de los diferentes grupos experimentados. Se añade la línea isosmótica (flecha) a la gráfica para ilustrar el patrón de osmorregulación observado por los organismos.....	62
A-I-I	Grados de severidad en la deformación de los túbulos del hepatopáncreas. Las imágenes A, B, C, D y E muestran los criterios para asignar los grados de severidad 0, 1, 2, 3 y 4 respectivamente.....	Anexo I
A-II-2	Detalle esquemático de la cantidad de epibiontes presentes en una preparación en fresco de branquias donde se representa infestación por <i>Leucothrix</i> sp en lamelas branquiales del camarón, tomada de Lightner, (1996a).....	Anexo II
A-II-3	Preparación en fresco con diferentes grados de severidad por <i>Leucothrix</i> sp.....	Anexo II
A-III-1	Patrón de fijación sobre un organismo adulto. Las flechas indican los lugares donde se inyecta la solución Davidson.....	Anexo III
A-IV-1	Resultados típicos del diagnóstico obtenidos en el kit de detección IQ2000™ para WSSV (información proporcionada por el fabricante). Carril 1 (C-1): muestra con infección severa del WSSV, C-2: muestra con infección media del WSSV, C-3: muestra con infección ligera del WSSV, C-4: muestra con infección muy ligera del WSSV, C-5: Muestra negativa del WSSV, C-6: Agua tridestilada, C-7: WSSV P(+) estándar, 2000 copias/reacción, C-8: WSSV P(+) estándar, 200 copias/reacción, C-9: WSSV P(+) estándar, 20 copias/reacción, C-M: marcador del peso molecular, 848 pbs, 630 pbs, 333 pbs.....	Anexo IV

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. Camaronicultura**

El cultivo del camarón o camaronicultura se ha mantenido en constante crecimiento desde sus inicios hasta hoy día, su crecimiento es indiscutible; desde representar menos del 5 % de la producción mundial en 1984, a un 44 % en el 2005 (FAO, 2007). En México, este porcentaje es mucho mayor, ya que desde el 2003 la producción por acuicultura sobrepasó a la producción por captura silvestre, la cual se ha mantenido alrededor de las 60,000 toneladas. En cambio, la producción por acuicultura casi duplicó la producción por captura silvestre en el 2007, alcanzando un total de 114,317 toneladas (Juárez, 2008; Anónimo, 2008). En los últimos tres años, la camaronicultura nacional ha mantenido un crecimiento promedio del 16 % (Juárez, 2008), y todo parece indicar que debido a que la demanda de productos pesqueros continúa en ascenso (mientras disminuyen las poblaciones naturales de mariscos), la producción de camarón se mantendrá como una importante industria exportadora en el país (Anónimo, 2008a). En el pasado, en México se ha cultivado el camarón azul *Litopenaeus stylirostris*; sin embargo, en los últimos años, los volúmenes de producción corresponden en su totalidad al camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei*.

### **I.2. *Litopennaeus vannamei***

El camarón blanco del pacífico, *L. vannamei*, es un crustáceo decápodo que habita en los sistemas estuarino-lagunares de las zonas tropicales y subtropicales (Guilland y Rothschild, 1984). Su distribución natural es amplia abarcando desde la parte norte del Golfo de California, hasta la costa norte del Perú (Pérez-Farfante y Kensley, 1997) así como las Islas Galápagos en Ecuador (Rodríguez de la Cruz, 1987). Este crustáceo se distribuye en áreas donde la temperatura del agua es mayor a los 20 °C a lo largo del año (Wyban y Sweeney, 1991; Rosenberry, 2002).

Su ciclo de vida consta de tres estadios larvales planctónicos: nauplio, zoea y misis, los cuales se desarrollan mar adentro (Figura 1). Cuando se desarrolla a postlarva, cambia sus



hábitos de pelágicos a bentónicos y migra a zonas costeras. La etapa juvenil se desarrolla en lagunas costeras y zonas estuarinas, donde abunda la vegetación y el detritus, componentes naturales de su dieta. Cuando los juveniles se convierten en preadultos migran a mar abierto donde alcanzan su talla adulta y se reproducen (Orbe y Arias, 1987). Este peculiar ciclo de vida ha dotado a la especie de una capacidad de osmorregulación que le permite sobrevivir tanto en condiciones de agua marina como salobre, hecho que ha sido aprovechado por los acuicultores para extender el cultivo de esta especie hacia aguas de baja salinidad.

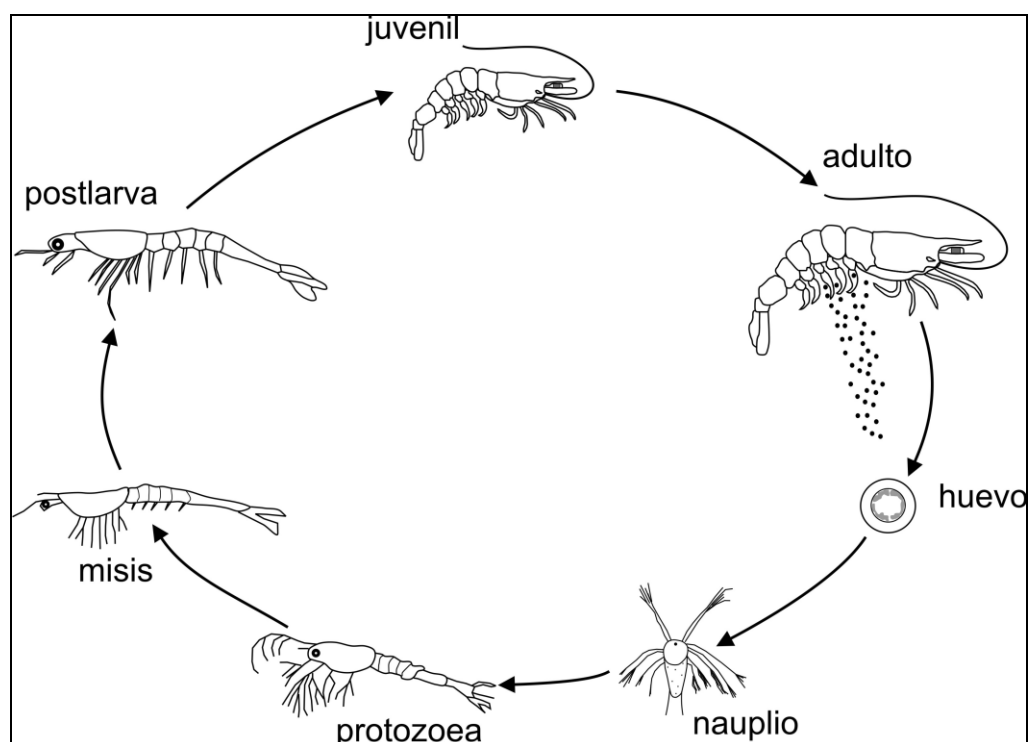


Figura 1. Ciclo de vida del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, tomado de Lee y Wickins (1992).

### I.3. Cultivo de camarón

En México, el cultivo comercial de camarón se inició en año de 1985 en el estado de Sinaloa en una granja denominada “Las Grullas”. Posteriormente el incremento progresivo del área de cultivo y el surgimiento de nuevas empresas ha llevado al incremento en la producción, de tal manera que en el ámbito mundial, la producción nacional ocupa ya el

séptimo lugar con aproximadamente 115,000 toneladas, siendo los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit y Baja California Sur los principales estados productores en nuestro país (Anónimo, 2008).

El camarón blanco *L. vannamei*, se cultiva en su gran mayoría mediante los sistemas semi-intensivo e intensivo en estanques de tierra de entre 5 y 10 Ha. En éstos, se siembran postlarvas producidas en laboratorio a densidades entre 15 y 45 camarones/m<sup>2</sup> y se les proporciona alimento balanceado durante un periodo entre 3 y 6 meses. Durante este tiempo alcanzan un peso entre 12 y 30 g. La clasificación del sistema de cultivo (semi-intensivo o intensivo) depende de la densidad de siembra y el grado de tecnificación empleado en la producción, incluyendo el tipo de alimentación, porcentaje de recambio de agua y uso de aireación para soporte de la biomasa dentro del estanque (Juárez, 2008).

En Baja California, la camaronicultura surgió en el año de 1998 (Álvarez-Vera comunicación personal) cuando la granja “Viszomar” inició sus actividades de cultivo bajo el sistema semi-intensivo en la costa del Golfo de California, cerca del Puerto de San Felipe, B. C. La granja actualmente cultiva camarón en estanques entre 5 y 10 Ha y básicamente se refiere a un modelo de explotación semi-intensivo, similar a los existentes en los estados de Sonora o Sinaloa con densidades de siembra de entre 15 y 25 camarones/m<sup>2</sup>, la sobrevivencia promedio es entre 60 y 70% y la temporada de cultivo se ajusta entre mayo y octubre, meses en los que se presentan temperaturas adecuadas para el cultivo (Moreno-Alva *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente, la característica de *L. vannamei* de tolerar una amplia variedad de ambientes salinos, ha permitido que los acuicultores lo cultiven en aguas de baja salinidad en zonas alejadas de la línea de costa (Roy *et al.*, 2007; Samocha *et al.*, 2001). Asimismo, la especie puede ser cultivada con buenos resultados en salinidades superiores a las 45 g L<sup>-1</sup> (Pérez-Velásquez *et al.*, 2007; Martínez-Córdova *et al.*, 1998). En México los primeros registros de cultivo de camarón a baja salinidad o tierra adentro, se remontan al año de 1996 en una explotación camaronícola en el estado de Colima llamada

Aquagranjas del Pacífico S. A. de C. V. (Anónimo, 2001). Actualmente en Baja California son varios los proyectos que se efectúan en modalidad de cultivo tierra adentro; entre ellas, los desarrollos surgidos en Baja California, en las zonas del Valle de Mexicali, Ensenada y San Quintín (Giffard-Mena y Martínez-Zabatdeny; 2003; Moreno-Alva *et al.*, 2007).

La actividad camaronícola en el Valle de Mexicali inició en 1999 con la promoción, por parte del Gobierno del Estado, del cultivo de camarón blanco en agua de baja salinidad. En ese año se cultivó una superficie de 1.06 Ha obteniéndose una producción de 3.2 toneladas. Durante el 2002, la superficie se incrementó a 25.5 Ha con una producción de 37.1 toneladas y para el 2003 la producción de camarón en agua dulce superó las 70 toneladas. Para el ciclo de producción 2007 la producción de camarón de cultivo en el estado alcanzó las 292 toneladas incluyendo la producción en agua dulce y agua marina (Anónimo, 2008).

Actualmente existen 18 pequeñas granjas en el Valle de Mexicali que siembran camarón en estanques de tierra a cielo abierto (generalmente de menos de 2.0 Ha) la mayoría de los estanques se encuentran equipados con aireadores para mantener un buen intercambio de oxígeno en el agua acorde a la densidad poblacional. El agua utilizada para el cultivo deriva del Río Colorado y es conducida a los estanques a través de una amplia red de canales agrícolas existentes en la zona. Dependiendo de la fase de desarrollo y densidad de siembra el porcentaje de recambio de agua puede ser del 10 al 30% semanal. Entre los productores existen granjas que operan con densidades de cultivo que van desde los 15 a los 60 camarones/m<sup>2</sup> dependiendo de los recursos económicos y técnicos existentes (Giffard-Mena y Martínez-Zabatdeny, 2003; Olivas-Valdez y Cáceres-Martínez, 2004, Moreno-Alva *et al.*, 2007).

Por otra parte, los cultivos de camarón que se han establecido en el municipio de Ensenada, colindantes al estero de Punta Banda y en el Valle de San Quintín, han tenido que ser adaptados a las condiciones de temperatura adecuada a la especie, dado que la costa Pacífico del municipio, se caracteriza por un clima templado con lluvias en invierno. Es por ello, que dichos cultivos se han realizado al interior de invernaderos que favorecen el

control de la temperatura necesaria para la especie. Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado un franco éxito que permita el desarrollo de esta actividad y se observen los beneficios experimentados en otras regiones donde la camaricultura es una industria plenamente consolidada. Sin duda, existen un sinnúmero de factores que intervienen en la rentabilidad de los cultivos, entre ellos la presencia de enfermedades que se ha identificado como uno de los factores de mayor importancia (Chávez *et al.*, 2004; Lightner, 2005; Páez-Osuna, 2005).

#### **I. 4. Enfermedades del camarón**

Históricamente se han reconocido a las enfermedades como peligros latentes que potencialmente pueden ocasionar grandes pérdidas económicas (Lightner, 2005). Así, tan solo por el Virus de la Mancha Blanca (WSSV) en el año 2000 las pérdidas en producción fueron de 200,000 toneladas, con un valor de mil millones de dólares (Lightner, 2005).

Entre las enfermedades presentes en los camarones están las enfermedades infecciosas y no infecciosas. Las primeras se refieren a aquellas causadas por agentes biológicos que tienen la capacidad de infectar, reproducirse y volver a infectar. Las enfermedades no infecciosas incluyen aquellas ocasionadas por tóxicos, desequilibrios nutricionales, ambientales o factores genéticos, o bien las que no son causadas por agentes biológicos (Onstad, *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que la presencia de enfermedades en los camarones está íntimamente ligada con su condición fisiológica; la cual a su vez, depende de las condiciones ambientales (Bachere, 2000). Las prácticas inadecuadas de cultivo, frecuentemente causan estrés a los animales debido a cambios de factores físicos (temperatura), químicos (calidad de agua) o biológicos (nutricionales o infecciosos) lo cual, puede resultar en una reducción de la resistencia inmunológica y así facilitar la presencia de enfermedades (Perazzolo *et al.*, 2002).

Los avances del conocimiento de las enfermedades del camarón son muchos, desde el primer virus reportado en camarones por Couch (1974), hasta la lista actualmente conocida que asciende a más de veinticinco (Mahadavi *et al.*, 2002; Lightner, 2005). Frecuentemente, los virus han surgido como un grupo importante de patógenos que afectan al camarón de cultivo dado su potencial de causar grandes mortalidades. Sin embargo, los virus no son los únicos patógenos que inciden en los cultivos, otros organismos como las bacterias, protozoos, hongos y metazoarios potencialmente pueden causar mortalidades importantes en las poblaciones de camarón cultivado (Lightner, 1996). Además, una variedad de microorganismos oportunistas que son considerados parte del ecosistema normal de los camarones, pueden causar enfermedades bajo condiciones que los favorezcan sobre los hospederos. La susceptibilidad de los camarones dependerá de la condición fisiológica, las especies y cepas del agente patógeno y la intensidad con la cual éste se presente en el huésped (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2001).

#### **I.4.1. Enfermedades virales en el camarón de cultivo**

Los virus han causado los mayores problemas a la camaronicultura desde su surgimiento hasta hoy día, incluyendo fuertes pérdidas en las industrias de varios países (Rahman *et al.*, 2006). Aunque, como se ha mencionado anteriormente, se han reconocido más de veinte virus para camarones peneidos, únicamente cinco son considerados de importancia en el continente americano, esto es debido a la severidad de la enfermedad, daño y pérdidas económicas que causan en las granjas y a la posibilidad de contagio intercontinental. Estos virus son: Virus Síndrome de Taura (Taura Syndrome Virus, TSV), Virus de la Cabeza Amarilla (Yellow Head Virus, YHV) Virus de la Mancha Blanca (White Spot Syndrome Virus, WSSV), Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis, IHHNV) y Virus de la Mionecrosis Infecciosa (Infectious Myonecrosis Virus, IMNV), considerados todos en la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (Lightner, 1996a; Bell y Lightner, 1984; Rahman *et al.*, 2006; Paulos *et al.*, 2006).

De todos los virus presentes en el cultivo del camarón, el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca ha tenido el impacto más grande y permanece hasta hoy día como uno de los mayores problemas en la industria (Rosenberry, 2004). En el camarón de cultivo la infección por WSSV puede alcanzar mortalidades acumuladas del 100% en un periodo de 3 a 10 días (Lightner, 1996). Los organismos infectados presentan una conducta letárgica, falta de apetito y presentan una coloración rojiza a rosa del cuerpo. Es característico de camarones infectados por WSSV la presencia de puntos blancos en el exoesqueleto. Estos puntos son el resultado de depósitos calcificados en la cutícula de un tamaño de 1 mm o más de diámetro que aparecen como manchas blancas, de aquí el nombre de la enfermedad (Chou *et al.*, 1995).

El WSSV fue inicialmente reportado en Fujian provincia China en 1991. Debido al cultivo intensivo de camarón y a una inadecuada sanidad comercial, este virus se dispersó rápidamente a otras granjas de camarón en el sureste de Asia (Cai *et al.*, 1995; Flegel, 1997; Lightner, 1996). Aunque el virus inicialmente parecía estar limitado a Asia, en noviembre de 1995 fue detectado en Estados Unidos de América en los estados de Texas y Carolina de Sur (Rosenberry, 1996). A principios de 1999, el WSSV fue reportado en Centro América (Honduras, Nicaragua, Panamá y Ecuador) (Rosenberry, 2000). En el 2002 fue detectado en Europa (Francia) y el Medio Oeste (Irán) (Rosenberry, 2002). En México fue reportado en 1999 (Galaviz-Silva *et al.*, 2004).

Además del camarón el WSSV infecta a una gran variedad de crustáceos acuáticos de ambientes marino, salobres y de agua dulce, incluyendo langostinos cangrejos y langostas. A diferencia del camarón, la infección no es letal para estas especies y pueden servir como reservorios y portadores del virus (Lo *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). Debido a su amplia gama de huéspedes, el WSSV no solamente es una amenaza importante para el cultivo del camarón, sino también para la ecología marina mundial (Flegel *et al.*, 1997). Por lo tanto, hay una gran necesidad de estudios en diferentes ambientes a fin de comprender mejor los procesos epizooticos en el desarrollo de métodos de control, sanidad de los cultivos,

medidas de prevención y el manejo sanitario de los cultivos el cual ha probado ser de mucha importancia para el control de la enfermedad.

#### **I.4.2. Enfermedades bacterianas.**

Las enfermedades bacterianas pueden provocar mortalidades masivas, reducción del crecimiento o bien mortalidades esporádicas de los camarones en cultivo. Las bacterias del género *Vibrio* constituyen uno de los grupos más importantes debido a que pueden causar mortalidades masivas durante la producción larvaria y fase de engorda; además pueden presentarse en ambientes de agua dulce, salobre y marino (Otta *et al.*, 1999). A la enfermedad causada por estas bacterias comúnmente se le conoce como vibriosis.

Es necesario considerar que las especies del género *Vibrio* son parte de la flora autóctona de camarones (Yasuda y Kitao, 1983), y es uno de los grupos más importantes en los ambientes marinos, representando cerca del 80% de la población bacteriana en las aguas superficiales del Océano Pacífico (Kita-Tsukamoto *et al.*, 1993). Sin embargo, como se ha mencionado antes algunos miembros del género han causado mortalidades en el cultivo del camarón y pueden ser considerados patógenos primarios como *Vibrio harveyi* y *V. penaeicida* (Otta *et al.*, 1999; 2001; Ishimaru *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 1998). Otros vibrios como *Vibrio vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. splendidus*, *V. damsela* y *V. parahaemolyticus* se han encontrado asociados a mortalidades en la fase larvaria de camarones, incluyendo a *L. vannamei* (Lightner, 1996a; Robertson *et al.*, 1998; Aguirre-Guzmán y Ascencio-Valle, 2000; Aguirre-Guzman *et al.*, 2001; Otta *et al.*, 2001).

Además grupos bacterianos como bacterias de los géneros *Pseudomona*, *Aeromona*, *Benekea* y *Spirillum* también han sido reportados como agentes patógenos importantes en el cultivo del camarón. Estas bacterias, se han asociado con la enfermedad bacterial quitinolítica también conocida como enfermedad del caparazón, enfermedad café, enfermedad de manchas negras y enfermedad del moho (Gómez-Gil *et al.*, 2001). Esta enfermedad puede afectar todas las especies de camarones peneidos de importancia acuícola. En organismos infectados el exoesqueleto empieza a presentar hoyos, erosiones,

necrosis, inflamación y melanización de los sitios afectados (Lightner, 1996). La prevalencia de esta enfermedad está asociada con condiciones de elevada temperatura, alta densidad, gran cantidad de materia orgánica, así como pobre calidad del agua e inadecuada sanidad en las instalaciones (Aguirre-Guzmán y Ascencio-Valle, 2000; Gómez-Gil, *et al.*, 2001).

La naturaleza simbiótica bacterias-camarón sugiere, en la mayoría de los casos una interacción de tipo oportunista a menudo favorecida por las condiciones mencionadas en el párrafo anterior. Las bacterias filamentosas como *Leucotrix mucor*, *Thiothix* sp., *Flexibacter* sp., *Cytophaga* sp. y *Flavobacterium* sp. son claros ejemplos de esta relación.

La enfermedad causada por *Leucotrix mucor*, *Thiothix* sp., *Flexibacter* sp., *Cytophaga* sp. y *Flavobacterium* sp. se distribuye ampliamente en los cultivos de camarón en el mundo. Esta es más común en las áreas de producción larval, maduración y tanques de pre-cría. Todas las especies de camarón pueden ser potencialmente afectadas por estos microorganismos y estar presentes en todas las fases del cultivo. Los camarones afectados presentan una decoloración característica de las branquias, bajo crecimiento, poco consumo de alimento, incremento de la mortalidad y letargia (Aguirre-Guzmán y Ascencio-Valle, 2000).

Las bacterias filamentosas tales como *Leucothrix mucor*, son organismos Gram-negativos, estrictamente aeróbicos, constituidos por largos filamentos no ramificados compuestos de pequeñas células ovoides o cilíndricas fuertemente adheridas a substratos vivos o inertes. Estas bacterias de longitud variable (aproximadamente dos micras de diámetro) se fijan principalmente en la cutícula, branquias, pleópodos y pereiópodos de larvas, juveniles y adultos. En grandes cantidades llegan a generar dificultades en la respiración, alimentación, locomoción, muda, reproducción y provocar la muerte de larvas, postlarvas, juveniles y adultos (Kitatsuji, 1996).



También se ha reportado la existencia de un tipo de bacteria intracelular que se localiza en las células del epitelio tubular del hepatopáncreas (Krol *et al.*, 1991; Loy *et al.*, 1996). Esta ha sido descrita como una alfa-protobacteria, causante de la hepatopancreatitis necrotizante o NHPB (Lightner, 1996; Ibarra-Games *et al.*, 2007), y encontrada en Texas en 1985 (Johnson, 1990). Esta Alpha-proteobacteria, Gram negativa pleomórfica es similar a las rickettsias. Morfológicamente presenta estadios helicoidales, ovoides o cilíndricos su hélice contiene 8 flagelos apicales. Su replicación es citoplasmática y principalmente afecta el tejido del hepatopáncreas del camarón. Es común la presencia de infecciones secundarias causadas por *Vibrio* sp., las cuales han resultado en mortalidades masivas (20–90 %) de *L. vannamei* en estanques de engorda con salinidades elevadas (Thompson *et al.*, 1997). En Ecuador, la presencia de la NHPB coincidió con las aguas templadas y altas salinidades asociadas al fenómeno de “El Niño”, además causó severas mortalidades (60–80% de mortalidad) de *L. vannamei* y *L. stylirostris* (Jiménez *et al.*, 1997). Posteriormente fue reportado en Perú, Costa Rica, Panamá, Brasil, Venezuela, Ecuador y México provocando mortalidades entre el 20 % y 95 % en los sistemas de cultivo de *L. vannamei* y *L. stylirostris* (Loy *et al.*, 1996).

#### **1.4.3. Enfermedades causadas por protozoos**

Los protozoos son animales muy sencillos estructuralmente, ya que están formados por una sola célula; en camarones son pocos los protozoos descritos como verdaderos parásitos, entre ellos se encuentran las gregarinas, microsporidios y haplosporidios. Otros más han sido descritos como epibiontes o patógenos facultativos como los ciliados coloniales presentes en las branquias del camarón (Brock, 1983).

Las gregarinas son protozoarios parásitos que presentan una distribución mundial, que pueden encontrarse en su huésped inter o intra celularmente y aunque las células huésped individuales son destruidas por las fases intracelulares, la mayoría de las especies (*Nematopsis* sp., *Cephalolobus* sp. y *Paraophioidina* sp.), generalmente no han sido consideradas como de alta patogenicidad en camarones. Sin embargo, en algunos casos como en el estudio realizado por Jiménez *et al.* (2002), encontraron que camarones

juveniles y adultos presentaron una prevalencia del 50 al 80 % y una intensidad del 10 a 5,000 parásitos por organismo, lo cual puede dar un idea de lo severas que pueden llegar a ser las infestaciones. Este tipo de gregarinas han sido asociadas con ambientes marinos y no han sido registradas en aguas de baja salinidad o agua dulce (Jiménez *et al.*, 2002).

Los protozoarios microsporidios provocan una enfermedad conocida como "camarón de algodón" o "camarón de leche" por la coloración opaca y blanquecina del abdomen que adquieren los camarones afectados. Algunos de estos microsporidios reemplazan a las células del músculo estriado (*Agnasoma duorara*, *A. nelsoni* y *Pleistophora penaei*) mientras que otros como *Agnasoma penaei*, infecta gónadas corazón, hemolinfa, branquias, hepatopáncreas e intestino; ocasionando que las gónadas se alarguen y luzcan opaco blanquecinas; en las branquias produce inflamaciones blanquecinas semejantes a tumores (Gómez-Gil *et al.*, 2001). Los camarones severamente afectados por alguna de las especies mencionadas, además de presentar músculo y/o gónadas opacas, la cutícula adquiere una coloración negra-azulada. Los camarones infectados permanecen vivos luego de la infección y aunque el problema no es letal los camarones afectados, dada su apariencia, no son comercializados (Johnson, 1990).

Los Haplosporidios comprenden un pequeño taxón de 36 especies reconocidas (Burreson y Ford, 2004). Estos parásitos son generalmente asociados con invertebrados marinos, aunque *Haplosporidium pickfordi* es un parásito de un caracol de agua dulce. Muchas especies causan enfermedad en moluscos de importancia comercial tanto cultivados como silvestres, incluyendo especies de ostiones, almejas y abulón (Hine *et al.*, 2001; Novoa *et al.*, 2004; Reece y Stokes, 2003).

Existen pocos registros de haplosporidios en los cultivos de camarón y el primer reporte de una infección por estos microorganismos fue en juveniles de *L. vannamei*, donde la infección fue detectada en organismos exportados de Nicaragua y mantenidos en cuarentena en Cuba (Dykova *et al.*, 1998). Asimismo, hallazgos recientes en Belice reportan infecciones severas con presencia de mortalidades, donde los camarones

exhibieron bajo consumo de alimento lo cual redujo la tasa de crecimiento. Además, los camarones infectados presentaron cuerpos flácidos, urópodos rojos e internamente presentaron melanización y atrofia de los túbulos del hepatopáncreas (Núnan *et al.*, 2007). Los estudios específicos de secuenciación para análisis filogenético de este parásito lo ubicaron en un taxón cercano a las especies *Bonamia* y *Minchinia*.

Los protozoarios coloniales epibiontes son organismos cosmopolitas que se encuentran de manera natural en los estanques de cultivo. Con frecuencia se observan sobre branquias, apéndices y cutícula de diversas partes del cuerpo del camarón, sin que con ello se encuentren enfermos. Sin embargo, cuando los camarones se encuentran sometidos a factores estresantes reducen su actividad limpiadora y/o no mudan, por lo que pueden ser altamente susceptibles a una invasión masiva. Los epibiontes más comunes pertenecen a los géneros *Zoothamnium*, *Epistylis*, *Acineta* y *Ascophrys* (Lightner, 1996a).

Este grupo de organismos puede causar altas mortalidades cuando se adhieren a branquias, región oral, cutícula, apéndices y el resto del cuerpo de juveniles y adultos, siendo las postlarvas tardías y los subadultos los más afectados en los cultivos con mediana y altas densidades (Lightner, 1996a; Brock, 1983). En estados avanzados de infestación la superficie corporal se torna rojiza, causa dificultad para la locomoción, alimentación y respiración, ocasionando finalmente la muerte. La abundancia de estos organismos puede indicar alta densidad de bacterias en el estanque, contaminación orgánica, estrés nutricional o ambiental e inadecuada higiene (Johnson, 1977; Brock, 1983; Brown *et al.*, 1993). Cuando las condiciones del estanque son pobres, además de los epibiontes es frecuente observar la acumulación de materia orgánica sobre las branquias lo que puede causar un mayor problema por asfixia (Couch, 1983; Lightner, 1985).

#### **1.4.4. Enfermedades causadas por hongos**

Se han reconocido varios hongos como patógenos de los camarones, algunos de los cuales son más comunes en etapas larvarias y otros son característicos de juveniles y adultos. El género más común que se encuentra en las larvas es *Lagenidium*, aunque también se han

registrado los géneros *Sirolopidium* y *Haliphthoros* (Brock y LeaMaster, 1992), a la enfermedad causada por estos hongos se le conoce como micosis larval. En los juveniles y adultos, *Fusarium* es el género que ocasiona mayores problemas, la infección es progresiva y sirve como punto de entrada a otros patógenos oportunistas (Johnson, 1990).

*Lagenidium* y *Sirolopidium* pertenecen al grupo de los ficomicetos, como se ha mencionado atacan principalmente a larvas y postlarvas de camarones provocando altas mortalidades en los laboratorios de todo el mundo. Los organismos que se encuentran infectados por esta enfermedad presentan una marcada respuesta inflamatoria (Lighthner, 1996). Los principales vectores de esta infección son los reproductores y sus huevos o la presencia de hospederos alternos como larvas de varias especies de cangrejos y balanos en el agua de suministro del laboratorio (Brock y LeaMaster, 1992).

Los camarones infectados por estos dos hongos se tornan inmóviles y permanecen en el fondo del estanque cuando se interrumpe la aireación o la circulación de agua. La infección con *Lagenidium* se inicia cuando las zoosporas del hongo se fijan y luego se enquistan en la cutícula de huevos y larvas de camarón. Los quistes de las esporas germinan y el tubo de germinación penetra en la cutícula generándose a partir del mismo crecimiento rápido del micelio dentro del huésped, reemplazando los tejidos musculares y cuticulares e invadiendo completamente con sus hifas a la larva en su interior (Lightner, 1996a).

Por otro lado, *Fusarium solani* provoca lesiones que se manifiestan como áreas melanizadas de branquias, base de los apéndices y la cutícula. El diagnóstico se realiza por análisis en fresco de las partes afectadas como son: branquias, cutícula y pleópodos. En las muestras se observan las macroconidias, típicas del género, en forma de canoa (Avault, 1996). Como se ha visto, existe a nivel mundial una larga lista de enfermedades que afectan al camarón, la cual incluye a varios grupos de parásitos presentes tanto en el ambiente natural como el de cultivo. En la Tabla I se presenta un resumen de los patógenos de camarón detectados en el continente Americano.

En México, ha pesar de haber iniciado formalmente el cultivo del camarón hace casi 30 años no existen muchos estudios específicos sobre las principales enfermedades que afectan a los cultivos. Por ejemplo, existe una limitada información de estudios epizooticos sobre el WSSV, patógeno que fue detectado desde 1999 y permanece afectando a los cultivos hasta hoy día; especialmente en algunas regiones de nuestro país como el sur de Sinaloa. En el estado de Baja California, se han realizado intentos de cultivar el camarón blanco *L. vannamei* en agua de baja salinidad y en otras regiones fuera del Valle de Mexicali, sin lograr, en la mayoría de ellos, resultados técnicos exitosos. Sin duda, la falta de éxito técnico en el cultivo del camarón puede tener múltiples causas y en cuyo caso la presencia de enfermedades como se ha enfatizado suele ser un aspecto muy importante (Páez-Osuna, 2005).

### **I.5. Justificación**

Como se ha mencionado anteriormente, el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* dada su capacidad de adaptarse a un amplio intervalo de salinidades, ha sido cultivado en diferentes ambientes salinos (Samochoa *et al.*, 2001). En el estado de Baja California las fluctuaciones de salinidad en los cultivos de camarón varía ampliamente según la zona, época del año y modalidad que se emplee, pudiendo ser en zonas costeras donde se cultivan generalmente en elevadas salinidades, especialmente en zonas con alta irradiación solar como la región de San Felipe donde la salinidad de los estanques de cultivo se mantiene entre 40 y 45 g L<sup>-1</sup> o bien, tierra adentro en aguas de baja salinidad como ocurre en el Valle de Mexicali con el uso de agua dulce y salinidades entre 1 y 5 g L<sup>-1</sup>. Asimismo, la región de San Quintín con el uso de agua del subsuelo, es otra zona donde se cultiva el camarón blanco con salinidades alrededor de 15 g L<sup>-1</sup>.

Si bien, el cultivo del camarón se ha venido realizando en diferentes ambientes salinos los antecedentes del cultivo tierra adentro se remontan a las experiencias de los tailandeses, quienes han cultivado en esta modalidad por cerca de dos décadas (Musing y Boonnom, 1998; Boyd, 2001). Se ha pensado que el éxito del cultivo de camarón tierra adentro en aguas de baja salinidad ha sido debido, en parte, a que las temibles enfermedades virales o

causadas por otros agentes patógenos no llegan a este ambiente (Saoud *et al.*, 2003). Esta idea también ha sido adoptada por productores locales quienes asumen que el cultivar en agua dulce les garantiza cultivos libres de enfermedades.

Observaciones mejor sustentadas, como la de Jory (2004), que podrían justificar las suposiciones mencionadas, sugieren que la modalidad de cultivo tierra adentro puede establecer una barrera geográfica entre el ambiente costero y los cultivos alejados de la costa y de esta forma interrumpir la transmisión de enfermedades, sobretodo cuando se utilizan organismos libres de patógenos específicos.

En contraparte existen estudios que demuestran la letalidad de ciertos virus tanto en ambientes salinos como dulceacuícolas e incluso, una mayor susceptibilidad del hospedero en intervalos de salinidad fuera de lo normal (Lotz *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Persson *et al.*, 1987; Le Moullac *et al.*, 1998). Tal es el caso de los estudios de Wang y Chen (2006) con *Penaeus monodon* infectado con WSSV al evaluar su respuesta en diferentes ambientes salinos. Los autores encontraron que la baja salinidad predispuso a los camarones hacia una baja en los mecanismos de defensa, debilitamiento general del estado fisiológico y disminución de la resistencia contra las infecciones bacterianas.

Al trasladar el camarón marino a un ambiente de agua dulce tierra adentro, es probable el surgimiento de interacciones desconocidas entre organismos patógenos del nuevo ambiente (en el caso probable de que existan) y los organismos transferidos, pudiéndose presentar o no una enfermedad. O bien, en el caso de agentes patógenos que logren pasar las barreras mencionadas, es posible que la interacción patógeno hospedero se presente de forma diferente a como ocurre en el ambiente marino, inclinando la balanza a favor de uno u otro. Lo anterior no lo sabremos a ciencia cierta hasta no realizar estudios específicos al respecto.

Esta tesis se planteó con el propósito de establecer la carga parasitaria del camarón blanco *L. vannamei* cultivado en diferentes condiciones de salinidad, y determinar el efecto de la

salinidad en la susceptibilidad del camarón infectado con WSSV para así contribuir al conocimiento de las enfermedades del camarón cultivado en nuestro país.

**Tabla I.** Lista de los principales patógenos en el camarón de cultivo.

<b>Principales patógenos en el camarón de cultivo reportados en continente Americano</b>		
<b>Virus</b>	Especie de camarón afectada	Referencia
IHHNV	<i>L. stylirostris</i> , <i>L. vannamei</i>	Lightner <i>et al.</i> ( 1992a)
TSV	<i>L. vannamei</i>	Hasson <i>et al.</i> (1999)
BP	<i>L. stylirostris</i>	Lightner <i>et al.</i> (1989)
WSSV	<i>L. stylirostris</i> , <i>L. vannamei</i>	Lightner (1996a), Jory (1999)
HPV	<i>L. stylirostris</i> , <i>L. vannamei</i>	Lightner <i>et al.</i> (1992b)
IMNV	<i>L. vannamei</i>	Poulos <i>et al.</i> (2006)
LvNV	<i>L. vannamei</i>	Tang <i>et al.</i> (2007)
<b>Bacterias</b>		
HNPB	<i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i>	Jonson (1990), Frelieir <i>et al.</i> (1992)
Vibriosis	<i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i> varias	Lightner (1996a)
<i>Leucothrix</i> sp.	<i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i> varias	Lightner (1996a)
<b>Hongos</b>		
Micosis larval ( <i>Langenidium</i> sp)	<i>Penaeus aztecus</i> varias sp	Lightner y Fontaine (1973)
Fusariosis ( <i>Fusarium</i> )	<i>L. vannamei</i> varias sp	Brock y Main (1994)
<b>Protozoos</b>		
Gregarinas	<i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i> , varias	Jones <i>et al.</i> (1994)
Microsporidios	<i>L. stylirostris</i> , <i>L. vannamei</i>	Brock y Lightner (1990)
Haplosporidios	<i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i>	Dykova <i>et al.</i> (1988)
<b>Protozoos coloniales</b>		
<i>Zoothamnium</i> sp. y <i>Ephystilis</i> sp.	<i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i> , varias	Foster <i>et al.</i> (1978)
<b>Fitoplancton tóxico</b> <i>Anabaena</i>	<i>L. vannamei</i>	Zimba <i>et al.</i> (2006)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>L. vannamei</i>	Zimba <i>et al.</i> (2006)
<b>Virus Principales patógenos en el camarón de cultivo en México</b>		
IHHNV	<i>L. stylirostris</i> , <i>L. vannamei</i>	Morales-Covarrubias <i>et al.</i> (1999)
TSV	<i>L. vannamei</i>	Zarain-H. y Ascencio-Valle, (2001)
BP	<i>L. stylirostris</i>	Lightner <i>et al.</i> (1989)
WSSV	<i>L. stylirostris</i> , <i>L. vannamei</i> , varias	Lightner <i>et al.</i> (1996a)
HPV	<i>L. stylirostris</i> , <i>L. vannamei</i>	Lightner <i>et al.</i> (1992b)
<b>Bacterias</b>		
HNPB	<i>L. stylirostris</i> , <i>L. vannamei</i>	Ibarra-Games <i>et al.</i> (2007)
Vibriosis	<i>L. stylirostris</i> , <i>L. vannamei</i>	Gómez-Gil <i>et al.</i> (2001) Aguirre-
<i>Leucothrix</i> sp.	<i>L. stylirostris</i> , <i>L. vannamei</i> , varias	Lightner (1996)
<b>Hongos</b>		
-----		
<b>Gregarinas</b>		
	<i>L. stylirostris</i> , <i>L. vannamei</i> , varias	Fajer-Ávila <i>et al.</i> (2005)
Microsporidios	<i>L. stylirostris</i> , <i>L. vannamei</i> , varias	Brock y Lightner (1990)
Haplosporidios	<i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i>	Lightner (1996)
<b>Protozoos coloniales</b>		
<i>Zoothamnium</i> sp. <i>Ephystilis</i> sp. <i>Vorticella</i> sp.	<i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i> , varias	Chávez-Sánchez <i>et al.</i> (2004)
<b>Fitoplancton nocivo</b>		
<i>Schizothrix calcicola</i> , <i>Oscillatoria lemmitica</i> <i>Anabaenopsis elenkenii</i> ,	<i>L. vannamei</i>	Pérez-Linares <i>et al.</i> (2003), Ochoa <i>et al.</i> (2005)

## **II. OBJETIVOS**

### **II.1. Objetivo general**

Determinar la distribución, prevalencia y grado de severidad de parásitos presentes en el camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, cultivado en diferentes condiciones de salinidad en granjas de cultivo de dos municipios del Estado de Baja California.

#### **II.1.1. Objetivos particulares**

- 1) Determinar la carga parasitaria del camarón de cultivo en dos municipios del estado.
- 2) Determinar si existe o no una relación entre los parásitos detectados y la sobrevivencia del camarón de cultivo asociadas a los ambientes de cultivos, especialmente la salinidad.
- 3) Determinar el efecto del WSSV, bajo diferentes condiciones de salinidad en laboratorio.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. Zona de estudio

Entre marzo de 2003 y septiembre de 2006, se estudiaron estanques de camarón en 7 granjas de producción ubicadas en los municipios de Ensenada y Mexicali, Baja California, para determinar la carga parasitaria durante los ciclos de cultivo (Figura 2). En la Tabla II se presenta información general de las diferentes granjas estudiadas e información del sistema de cultivo.

**Tabla II.** Información general de las granjas de camarón estudiadas en esta tesis.

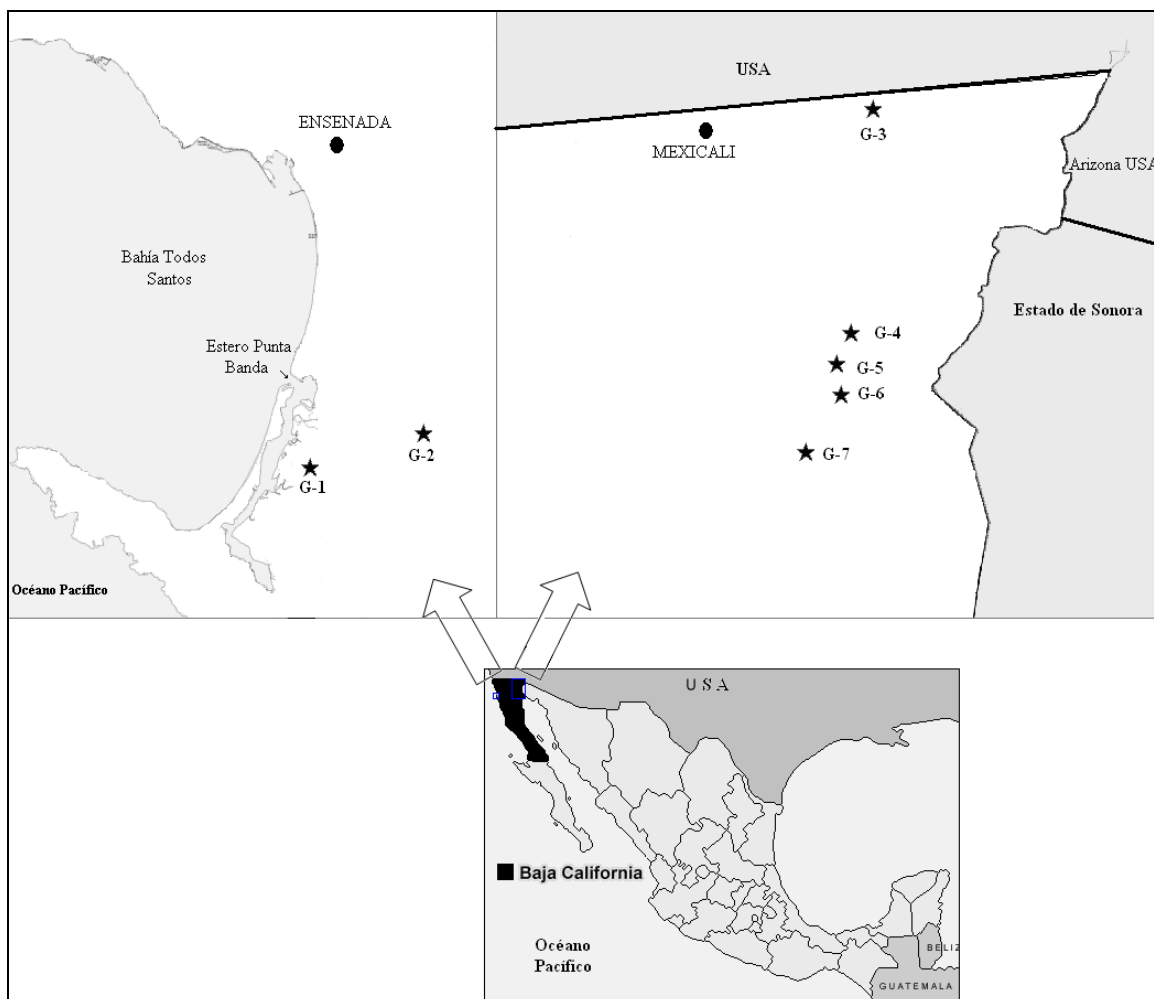
Granja (periodo de estudio)	Ubicación (georeferencia)	Tipo de agua (fuente) Salinidad (g L <sup>-1</sup> )	Sistema de cultivo Tipo de estanque-superficie (M <sup>2</sup> )
Granja 1 (abril-sept-03)	Ensenada 31° 43' 30" N 116° 37' 28" O	Marina (Estero Punta Banda) 35.0	Hiper-intensivo Rectangular, plástico-350
Granja 2 (jun-oct-05)	Ensenada 31°44' 58" N 116° 34' 33" O	Dulce (subterránea) 1.3	Hiper-intensivo Circular- geomembrana-140
Granja 3 (mayo-sept-03)	Mexicali 32° 39' 20" N 115° 19' 32" O	Dulce (Río Colorado) 1.6	Semi-intensivo Rectangular-tierra- 1,700
Granja 4 (mayo-sept-03)	Mexicali 32° 15' 20" N 115° 10' 58" O	Dulce (Río Colorado) 1.7	Intensivo Irregular-tierra-7,500
Granja 5 (mayo-sept-03)	Mexicali 32° 09' 24" N 115° 16' 36" O	Salobre (Río Hardy) 5.3	Super-Intensivo Rectangular-tierra- 21,000
Granja 6 (mayo-sept-03)	Mexicali 32° 12' 48" N 115° 12' 38" O	Dulce (Río Colorado) 1.1	Intensivo Rectangular-tierra- 18,000
Granja 7 (jun-sept-06)	Mexicali 32° 12' 48" N 115° 12' 38" O	Dulce (Río Colorado) 1.1	Intensivo Rectangular-tierra- 11,000

### **III.1.1. Municipio de Ensenada**

Al sur de la Ciudad de Ensenada se localiza el Valle de Maneadero (Figura 2). La temperatura media anual es de 18.8 °C y las extremas mínima y máxima son 3.6 °C y 36.5 °C respectivamente; se presentan temperaturas cálidas en verano, durante los meses de julio y agosto pero no durante suficiente tiempo para completar un ciclo de producción al aire libre, la zona se caracteriza por lluvias durante los meses de invierno, mientras que en verano es relativamente seco. La precipitación pluvial promedio es de 302 mm anuales. Específicamente el Estero de Punta Banda cuenta con un área de 2,393 Ha; y se localiza en 31°44'N y 116°38'W. El estero es un humedal que conserva un conjunto de bajos lodosos, dunas costeras y zonas de pastos marinos. La fauna incluye una rica diversidad de invertebrados bentónicos, que sustentan la cadena alimenticia del estero. Punta Banda es zona de reproducción, alimentación y crianza de por lo menos 150 especies de peces, muchas de ellas de importancia comercial (Galindo *et al.*, 1999).

### **III.1.2. Municipio de Mexicali**

El Valle de Mexicali se localiza en Baja California, México; en lo que se denomina la cuenca baja del Río Colorado, cuenta con una extensión de 200 mil Ha de las cuales el 62% se considera apta para agricultura. Recibe una precipitación pluvial de 123 mm anuales y los suelos predominantes son los llamados yermosoles y xerosoles, característicos de zonas áridas y semiáridas, pobres en materia orgánica. Mexicali es una zona con un clima cálido seco extremo, la temperatura promedio anual es de 33°C y las extremas mínima y máxima son de 2.4 °C y 49 °C respectivamente. Esto permite que durante una buena parte del año prevalezca un clima propicio para el cultivo de camarón los cuales generalmente incluyen el periodo de mayo a octubre, con temperaturas ente 22 y 30°C. El agua utilizada para el cultivo de camarón deriva de canales de distribución del distrito de riego No. 014 el cual a su vez es alimentado por aguas del Río Colorado el que tiene un promedio de 950 mg L<sup>-1</sup> de sólidos disueltos totales (Oryalzabal y Youg, 1978; SEMARNAT-CONAGUA, 2002)



**Figura 2.** Zona de estudio en donde se muestran dos áreas amplificadas de los municipios de Ensenada y Mexicali y la ubicación de las granjas correspondientes al estudio.

### III.2. Registro de variables ambientales

En cada granja se eligió un estanque y se llevó un registro de las siguientes variables ambientales: salinidad (refractómetro modelo Vista A366ATC), temperatura (termómetro de mercurio), oxígeno disuelto (Oxímetro YSI 55), pH (Potenciómetro Corning modelo 475830) y puntualmente determinación de amonio y nitritos (prueba colorimétrica kit Lamotte). Asimismo, para el caso del uso de agua dulce se realizaron determinaciones de aniones y cationes a fin de conocer el perfil iónico del agua tanto de la zona de Ensenada como Mexicali.

### **III.3. Muestreo de organismos**

En cada una de las granjas estudiadas (unidades de producción). Se realizaron muestreos cada 15 días a partir de la siembra hasta la cosecha. En los muestreos se utilizó con una atarraya de 2 m de diámetro la cual se lanzó en tres diferentes puntos del estanque (parte central y extremos). De los camarones capturados en la atarraya se seleccionó a un total de 30 organismos en un muestreo aleatorio los cuales fueron puestos en una hielera con agua y aireación, para posterior análisis (Lightner, 1996a).

En las granjas de la región de Ensenada los organismos recolectados fueron transportados vivos en hieleras con agua y aireación al laboratorio de Patología y Biología de Organismos Acuáticos del CICESE y puestos en peceras, para luego tomar registros biométricos, previo a los análisis patológicos correspondientes. En las granjas de la zona del Valle de Mexicali (Tabla II), se transportó un microscopio y material necesario para realizar las observaciones clínicas y fijado de organismos en las instalaciones de la granja, dado la imposibilidad de transportar la muestra en buenas condiciones hasta el laboratorio en Ensenada.

### **III.4. Análisis clínico**

Este análisis consistió en la observación de las características externas anatómicas de los camarones y observación de tejidos bajo el microscopio de branquias, hepatopáncreas e intestino para la búsqueda de simbiontes y/o alteraciones anatómicas asociadas a la presencia de agentes patógenos. Este tipo de análisis se realizó a una submuestra de 5 a 10 camarones de los 30 que integraron la totalidad de la muestra.

#### **III.4.1. Análisis de branquias**

Se cortó con unas tijeras finas la pleura branquial y se dejaron expuestos los filamentos branquiales. Se registró color y apariencia general de las branquias. Enseguida, se cortaron, con la ayuda de unas tijeras finas y unas pinzas, una muestra de lamelas branquiales localizadas sobre el cuarto y quinto período (Lightner, 1996a), las cuales se depositaron sobre un portaobjetos limpio. Se aplicaron unas gotas de agua de mar estéril (para el caso de organismos cultivados en agua de mar) o bien solución salina 0.2 % de NaCl (en

organismos cultivados en agua dulce), se cubrió con un cubreobjetos haciendo una ligera presión y se observó la muestra bajo el microscopio. Se anotó el grado de severidad (Tabla III) de la condición observada sobre la superficie branquial con base en la escala propuesta por Lightner (1996); asimismo, el Anexo I presenta un ejemplo gráfico para la determinación del grado de severidad por epibiontes en branquias. Mediante este tipo de análisis se detecta la presencia de protozoarios, microalgas, bacterias filamentosas y demás epicomensales, sobre la superficie branquial así como melanización y necrosis del tejido (Lightner, 1996a). Asumiendo que la melanización se refiere a un proceso común en los artrópodos con depositación de un pigmento oscuro llamado melanina y materiales asociados en la superficie de objetos extraños (bióticos o abióticos), frecuentemente acompañado por hemocitos como respuesta a un daño o a la presencia de un parásito. Finalmente, se hicieron observaciones sobre la necrosis, misma que involucra la expresión morfológica de muerte celular dentro de un tejido vivo (Onstand *et al.*, 2006).

**Tabla III.** Escala de grados de severidad utilizada para evaluar la infestación por epibiontes, modificado de Lightner (1996). El Anexo I presenta un ejemplo gráfico de las observaciones clínica que permiten una valoración semi-cuantitativa.

Grado de Severidad	Observaciones clínicas
0	Sin señales de infección/infestación por patógenos, parásitos o epicomensales presentes. No se presentan lesiones.
1	Patógeno, parásito o epicomental presente pero en cantidad o número insignificantes. Lesiones leves.
2	Bajo a moderado número de patógenos, parásitos o epicomensales presentes. Presencia de lesiones moderadas.
3	Presencia de moderado número de patógenos, parásitos o epicomensales. Presencia de lesiones significativas.
4	Presencia de alto número de patógenos, parásitos o epicomensales. Presencia de lesiones severas

#### III.4.2. Análisis de hepatopáncreas

La muestra de este órgano se obtuvo removiendo el exoesqueleto de la región dorsal posterior del cefalotórax, rompiendo con la punta de unas tijeras finas a la altura del corazón y tirando la epidermis y cutícula hacia arriba y adelante con unas pinzas hasta dejarlo al descubierto. El hepatopáncreas esta rodeado de una membrana muy delgada que

se removió cuidadosamente con la punta de unas tijeras finas. Una vez expuesto el tejido se tomó nota de su color y consistencia en general y luego se cortaron aproximadamente tres milímetros cúbicos de tejido, el cual se colocó en un portaobjetos con unas gotas de solución SIC-EDTA (Solución Isotónica de Camarón Ácido-Etilendiamino-Tetraacético) (Vargas-Albores *et al.*, 1992). Se cubrió la muestra con un cubreobjetos y se observó el tejido bajo el microscopio. Enseguida se anotó el grado de severidad de acuerdo al aspecto de los túbulos del hepatopáncreas (Tabla IV). Asimismo, con este tipo de análisis se puede detectar presuntivamente una necrosis hepatopancreática o NHP incluyendo el estado nutricional mediante el análisis de la cantidad de lípidos en los microtúbulos del hepatopáncreas (Lightner, 1996a).

**Tabla IV.** Grado de severidad en hepatopáncreas de acuerdo a los cambios observados en los túbulos (Anónimo, 1997), el Anexo II presenta un ejemplo gráfico de estos criterios.

Grado de severidad	Apariencia de los túbulos del hepatopáncreas
0	Los túbulos del hepatopáncreas con paredes uniformes sin arrugas ni hinchamientos y abundantes vacuolas de lípidos.
1	Los túbulos se observan con paredes arrugadas o festoneadas y puede haber ligera estrangulación y una menor cantidad de lípidos.
2	Los túbulos se observan con estrangulaciones y se encuentran de 2 a 5 túbulos estrangulados por preparación. También se presenta engrosamiento o hinchamiento del epitelio de los túbulos y menor cantidad de lípidos.
3	Los túbulos estrangulados se encuentran en más de 5 por preparación y más de una estrangulación por túbulo. Hay mayor engrosamiento o hinchamiento del epitelio de los túbulos, menor cantidad de lípidos y algunos túbulos vacíos.
4	Los túbulos se encuentran necrosados, su lumen enquistado y de color café.

### III.4.3. Análisis de intestino medio y posterior

El intestino se extrajo haciendo un corte con unas tijeras finas a lo largo de la región dorsal del abdomen procurando evitar su rompimiento. Se depositó sobre un portaobjetos y se adicionaron unas gotas de agua (solución salina al 0.2% o agua de mar estéril para el caso de G1). Con unas pinzas y haciendo presión con una aguja de disección se vació el contenido intestinal para su observación con el microscopio y la búsqueda de

endosimbiontes como diferentes estadios de gregarinas o céstodos, así como tipo de dieta ingerida la cual puede incluir microalgas, algas, zooplancton, limo o alimento balanceado (Aguirre-Guzmán y Sánchez-Martínez, 2005). El ciego intestinal posterior se cortó longitudinalmente con ayuda de unas tijeras finas para poder vaciar su contenido y evitar que en sus pliegues quedaran ocultos endoparásitos, en caso de estar presentes.

### III. 5. Análisis histopatológico

Se utilizó una submuestra de 20 camarones para el análisis histopatológico. El cual consiste en un estudio de los cambios microscópicos anormales en la estructura de los tejidos del camarón. Este análisis también revela la presencia de agentes patógenos en los tejidos del organismo. Asimismo, es posible observar alteraciones celulares o estructurales en los tejidos que permiten a su vez asociar el daño a determinado tipo de enfermedades o agentes patógenos (Lightner, 1996a). En la tabla V se presenta los criterios utilizados para designar el grado de severidad por presencia de una enfermedad viral. Asimismo, las técnicas empleadas en el proceso histológico se presentan en el Anexo III al final de esta tesis.

**Tabla V.** Escala de valores para determinar el grado de severidad de una enfermedad viral mediante la observación histopatológica de cuerpos de inclusión viral (CI) característicos (Lightner, 1996a).

Grado	No. de CI por campo	Conclusión/pronóstico
0	No observado	Infección no detectada
1	1-5 / 200	Infectado/infección leve
2	1-2 / 20	Infectado/Infección moderada
3	1-5 / 2	Infectado/enfermedad aguda
4	> 10 por campo	Infectado/enfermedad usualmente letal

Se utilizó el término prevalencia para definir el número de casos de una enfermedad o patógenos, parásitos o epibiontes en determinado momento en una población dada (Onstand *et al.*, 2006), asimismo esta fue calculada de acuerdo a la fórmula propuesta por Amos (1985). Además, la terminología usada en este estudio fue de acuerdo a la empleada por Bell y Lightner (1984).

$$P = (OA/N) \times 100 \quad (1)$$

Donde:

P= Prevalencia

OA= Organismos Afectados por la enfermedad, patógeno, parásito o epibionte.

N= Número de organismos analizados en la muestra

### **III. 6. Análisis mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Una muestra de postlarvas de camarón tomada de los tanques de transporte antes de sembrar, fue fijada en etanol al 95% para análisis mediante PCR para la detección de WSSV. Al final del periodo de cultivo se cortó, a cada uno de los 30 camarones que integraban la muestra, el primer par de pléopodos y fue fijado en etanol al 95% para la extracción posterior de ADN (Anexo IV) y posterior empleo de la PCR para la determinación de WSSV a nivel molecular. Otros análisis no rutinarios de PCR para WSSV solo se realizaron como un método confirmativo, previo diagnóstico presuntivo mediante los análisis histopatológicos y/o clínicos. Las técnicas y métodos empleados se describen en el Anexo IV.

### **III.7. Bioensayo de infectología con WSSV**

Para determinar el efecto de la salinidad en la susceptibilidad del camarón *Litopenaeus vannamei* infectado con WSSV, se planteó un experimento de infectología con camarones expuestos a diferentes ambientes de salinidad a los cuales se les inoculó el virus vía intramuscular. En este sentido se probaron los ambientes de 0, 15, 30, 45 y 60 g L<sup>-1</sup> de salinidad correspondiendo a los grupos experimentales G-0, G-15, G-30, G-45 y G-60 respectivamente. Cada tratamiento incluyó un testigo y tres repeticiones.

#### **III.7. 1. Organismos experimentales**

Un lote 5,000 postlarvas con un certificado sanitario de ausencia de los patógenos virales WSSV, IHHNV y TSV (NOM-030-PESC-2000, NOM-EM-006-PESC-2004), fue transportado al laboratorio de Bioensayos del Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del CICESE y mantenido en acondicionamiento durante 60 días.



Durante este tiempo se les suministró alimentos balanceados especiales para postlarvas y juveniles (Silver Cup 52% proteína). El alimento se suministró en tres raciones diarias (8:00, 12:00 y 16:00 h) a razón del 4 al 6% de la biomasa de los camarones. Diariamente se realizó sifoneo y recambio de agua del 100%, el agua de desecho fue colectada y desinfectada con hipoclorito de sodio a una concentración de 100 ppm durante 1 h, posteriormente fue neutralizada con tiosulfato de sodio y vertida al drenaje común del laboratorio. Se llevó un registro del incremento en peso de los camarones, sobrevivencia y grado de epibiosis desde su arribo al laboratorio hasta el momento de inicio del bioensayo.

Tres semanas antes de dar inicio al bioensayo de infectología la población se dividió en 5 lotes iguales y se inició su aclimatación a las respectivas salinidades del bioensayo (0, 15, 30, 45 y 60 g L<sup>-1</sup> de salinidad). Salinidades superiores a la marina (45 y 60 g L<sup>-1</sup>) se lograron con la adición de sal natural de mar. Para el caso de salinidades inferiores a la marina (30 y 15 g L<sup>-1</sup>) se lograron con la mezcla de agua de mar y agua potable. Asimismo, la salinidad cero se logró gradualmente hasta desplazar totalmente el agua marina por agua potable de la llave. Para la preparación del agua de recambio se preparaban las diferentes mezclas de cada salinidad 24 h antes de su uso, se les adicionaba cloro hasta alcanzar una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> y se dejaba durante toda la noche, por la mañana se neutralizaba con tiosulfato de sodio y aeración fuerte y por la tarde el agua era utilizada en el recambio.

### **III.7.2. Preparación del inóculo viral**

- 3.0 g de músculo abdominal congelado donado por el Dr. Jorge Hernández del Laboratorio de Análisis Integral Acuícola del CIBNOR, Unidad Hermosillo, Sonora, perteneciente a un camarón infectado con el WSSV (comprobado mediante histología y PCR) y en fase avanzada de enfermedad (moribundo), fue macerado en 5 ml de PBS (fosfato búfer salino, por sus siglas en inglés).
- El homogenizado se centrifugó a 6,000 g durante 15 minutos en un ambiente a 4 °C.
- El sobrenadante se colectó en nuevos tubos y se centrifugó a 10,000 g durante 20 minutos a 4 °C.

- Nuevamente se colectó el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de membrana de 0.2 micrones.
- El producto de la filtración (libre de células y bacterias) se analizó mediante la técnica de PCR para la presencia del WSSV utilizando el kit de diagnóstico IQ2000 descrito en el Anexo IV.
- El extracto se colectó en viales, se mezcló con PBS [10 x] en proporción de 1 a 10 veces el volumen del inóculo y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Yoganandhan *et al.*, 2003).

### **III.7.3. Bioensayo de infección con WSSV**

- De cada uno de los 5 lotes pertenecientes a cada salinidad se seleccionaron 40 ( $\pm 3$ ) organismos de 2.0 ( $\pm 0.5$ ) g de peso y fueron puestos en tinas rectangulares de 60 L (0.5 x 0.5 x 0.25 m largo, ancho y alto respectivamente) en un arreglo 5 X 4 de acuerdo a las cinco salinidades ya mencionadas; tres repeticiones más un control. La temperatura del agua se mantuvo en  $29.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ , con recambios de agua del 100% diario.
- Una vez iniciado el bioensayo a cada camarón se les aplicó una inyección intramuscular, en el 2do. segmento abdominal con 10  $\mu\text{L}$  del inóculo viral. Los grupos control fueron inyectados con 10  $\mu\text{L}$  de una solución consistente sólo de la solución de PBS [10 x] sin el virus (Yoganandhan *et al.*, 2003).
- Durante el bioensayo se proporcionó alimento balanceado a saciedad suministrado en 2 raciones diarias (8:00 y 14:00 h).
- Se recolectaron 3 camarones por unidad experimental a partir de la inyección del inóculo procurando recolectar muestras cada 6 h hasta completar el total de la población, sólo se consideraron en el muestreo organismos vivos. Durante todo este tiempo se tomaron registros de mortalidad y conducta de los organismos.
- Se determinó la osmolaridad en la hemolinfa (sección IV.7.3.1.). Posteriormente se diseccionó la región del cefalotórax y se fijó mediante inyección con solución Davidson como se detalla en el Anexo III (Figura A-III-1), para posterior análisis histológico.

- Asimismo, se tomó muestra de tejido muscular (región posterior del abdomen a partir del 5° segmento abdominal incluyendo urópodos) y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análisis de WSSV mediante técnica de PCR.
- El resto de los organismos incluyendo a los organismos muertos fueron puestos en bolsas plásticas para residuos peligrosos y tratados como residuos biológicos infecciosos.
- El agua drenada de cada recambio y al final del experimento fue recolectada en un contenedor y tratada con 200 ppm de hipoclorito de sodio durante 2 h.
- Todos los utensilios utilizados y superficies del laboratorio fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio a  $200\text{ mg L}^{-1}$  (Balasubramanian *et al.*, 2006).

### **III.7. 3.1. Determinación de osmolaridad**

La exposición de un crustáceo a fuentes de agua contaminada, estresores ambientales y agentes patógenos; usualmente resulta en una disminución de la capacidad de osmorregulación (CO)<sup>1</sup>. Así, la osmorregulación es el mecanismo que permite a los camarones tolerar diferentes ambientes de salinidad (Lignot *et al.*, 2000). En este estudio se evaluó la capacidad de osmorregulación de los camarones a partir de la concentración osmótica de la hemolinfa; en respuesta a la infección con WSSV, sometidos a diferentes ambientes salinos.

Para determinación de la osmolaridad, a los camarones muestreados se les extrajo un volumen de  $10\ \mu\text{L}$  de hemolinfa, rompiendo con la punta de una micropipeta la cavidad pericárdica; previo a la extracción se limpio perfectamente la zona con papel absorbente para evitar contaminación de la muestra con fluidos externos. Posterior a esto se determinó la osmolaridad del agua de las tinas de experimentación tomando un volumen de agua de  $10\ \mu\text{L}$ . En ambos casos, la osmolaridad se determinó con un osmómetro de presión de vapor (modelo Wescor OM230B Utah, EUA).

### **III. 8. Análisis estadístico**

Para determinar las diferencias entre los distintos grupos experimentados se realizó un análisis de varianza de una vía a los grupos experimentales que solo contenían una sola variable respuesta, en cambio se utilizó análisis de varianza multivariado para los casos donde además de la variable respuesta el factor tiempo fue considerado de importancia el cual se incluyó como una covariable en el análisis estadístico (Zar, 1974), para ello, se utilizó el paquete estadístico Statistica (StatSoft, Inc. Oklahoma, USA. 1999).

<sup>1</sup> CO: diferencia entre la presión osmótica de la hemolinfa y el medio externo, a una salinidad determinada (Charmantier *et al.*, 1989).

## IV. RESULTADOS

### IV.1. Carga parasitaria de los camarones cultivados en Baja California.

#### IV.1.2 Revisión en fresco de los camarones en las granjas del municipio de Ensenada.

##### IV.1.2.1 Granja 1

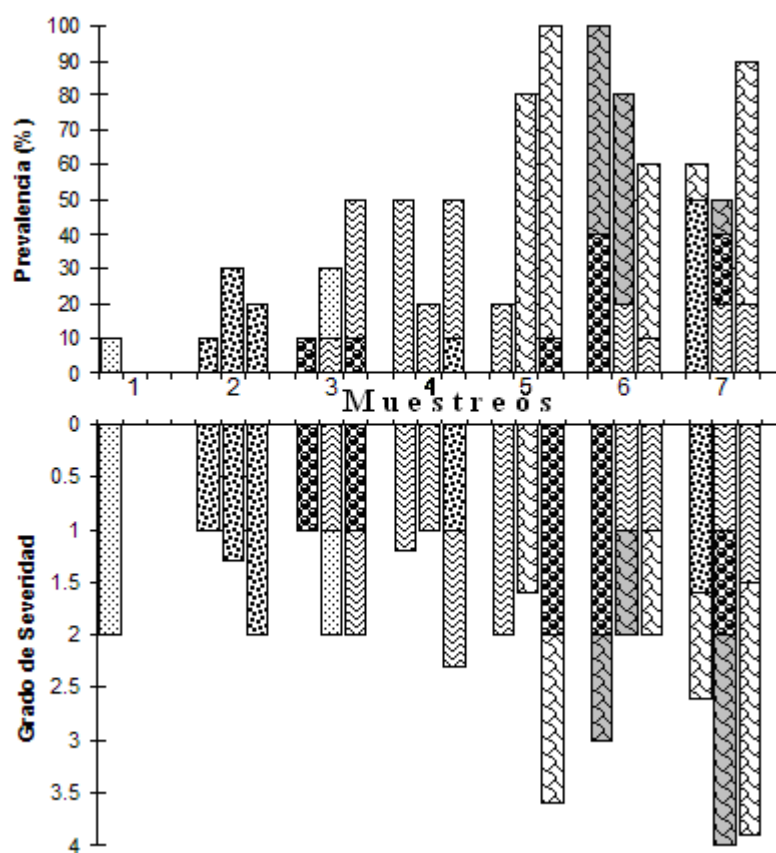
##### IV.1.2.1.1 Branquias.

El análisis en fresco de las branquias de camarones de la granja 1 estudiada en el periodo de abril a septiembre del 2003 reveló la presencia de protozoos ciliados coloniales tipo *Zoothamnium* y bacterias filamentosas tipo *Leucothrix* (Figura 3-A). Asimismo, mediante este análisis se pudo observar en el tejido branquial alteraciones tisulares como melanosis y necrosis (Figura 3-B). En algunos casos las branquias observaron asociadas adherencias como microalgas, bacterias y protozoarios de vida libre (Figura 3-B).



**Figura 3.** A.- Preparación en fresco de branquias de camarón donde se observan dos tipos de epibiontes observados en el cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* durante este estudio. BF= bacterias filamentosas (tipo *Leucothrix*), PC= protozoos ciliados coloniales (tipo *Zoothamnium*). Ampliación 630 X. B.- Preparación en fresco de branquias donde se observa un área necrótica focal con depósitos de melanina sobre cuatro lamelas branquiales, así como adherencias (AD). NB= Necrosis branquial, AD= Adherencias (bacterias y microalgas) Ampliación 630 X.

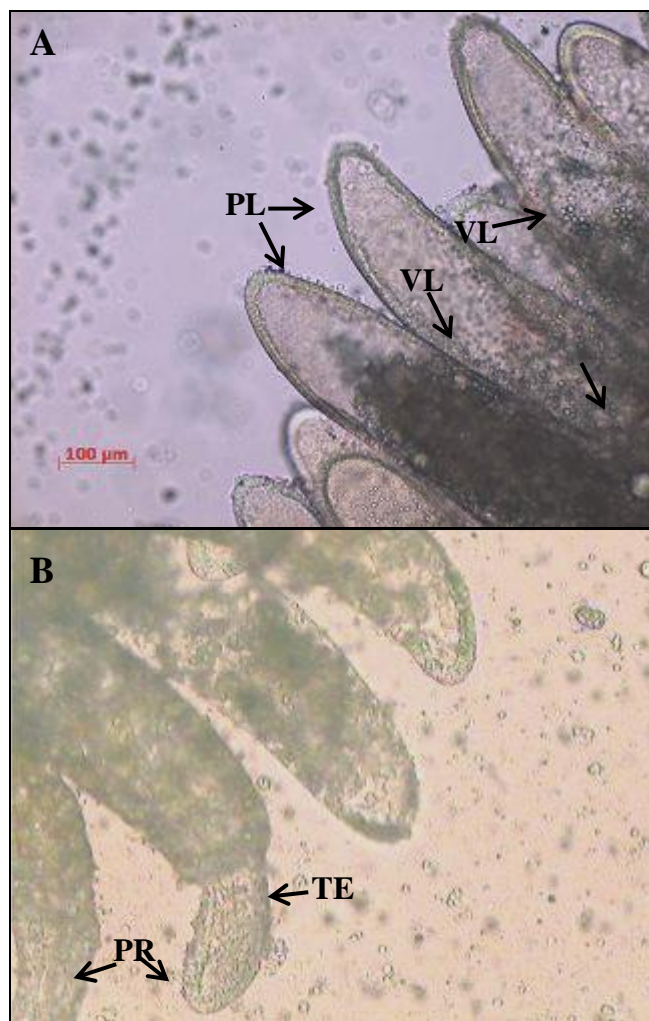
La Figura 4 presenta de forma gráfica la prevalencia y grado de severidad encontrado en las branquias de camarones de la granja 1 localizada en el Estero de Punta Banda. En la gráfica se puede observar una tendencia de incremento en la prevalencia de organismos afectados por epibiontes y lesiones en las branquias hacia el final del periodo de cultivo. También se observa de forma general un incremento en el grado de severidad que sigue esta misma tendencia temporal.



**Figura 4.-** Prevalencia y grado de severidad por epibiontes y lesiones en branquias de camarones cultivados en los estanques de la granja 1. Cada barra de izquierda a derecha corresponde a estanques 1, 2 y 3. = Melanosis branquial, = Necrosis y melanosis branquial, = Necrosis branquial, = Bacterias filamentosas (tipo *Leucothrix*), = Protozoos ciliados coloniales (tipo *Zoothamnium*) + Bacterias filamentosas (tipo *Leucothrix*), = Protozoo tipo *Zoothamnium* + Necrosis branquial.

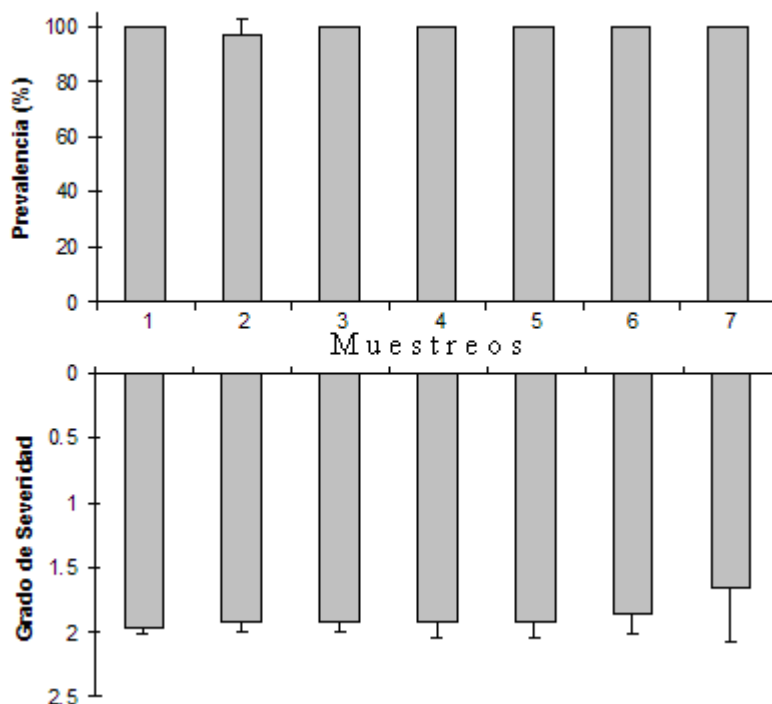
#### **IV.1.2.1.2 Hepatopáncreas**

No se encontró ningún parásito o patógeno en los camarones de la granja 1 mediante la revisión en fresco del hepatopáncreas. Tampoco se encontraron indicadores de algún proceso patológico o cuerpos de oclusión poliédricos presuntivos de problemas virales como el BP (*Baculovirus penaei*). No obstante, el análisis en fresco de los túbulos mostró deformidad en un nivel bajo a moderado, con grados de severidad de 1 a 2 (GS-I a II). Dicha condición se caracterizó por una leve ausencia de reservas lipídicas y una ligera estrangulación de los túbulos del hepatopáncreas (Figura 5). En general se presentó una alta prevalencia de organismos con esta condición, la cual se observó en un 98 a 100% de la población muestreada (Figura 6), pero con una tendencia a permanecer constantes en intensidad o grado de severidad; y sobretodo, sin llegar a ser una condición de peligro que pudiera estar asociada con problemas presuntivos de bacteriosis o NHP.



**Figura 5.** Preparación en fresco de túbulos del hepatopáncreas en camarones de la granja 1. **A.-** Túbulos del hepatopáncreas con pared lisa (PL), sin arrugas, ni hinchamientos y con abundantes vacuolas lipídicas (VL), los túbulos no presentan deformidad (GS-0). Ampliación 100 X, **B.-** Túbulos del hepatopáncreas con presencia leve de túbulos estrangulados (TE) y moderada cantidad de paredes rugosas (PR). La imagen presenta un GS-1 en deformidad de los túbulos. Ampliación 100 X.





**Figura 6.-** Gráfica donde se observa el porcentaje de prevalencia de la deformidad en los túbulos del hepatopáncreas y el grado de severidad encontrada en camarones de la granja 1 durante el ciclo de producción 2003.

#### IV.1.2.1.3 Intestino.

No se encontraron endoparásitos ni agentes patógenos en el intestino de los camarones de la granja 1 observables mediante la preparación en fresco del intestino. Tampoco se encontraron indicadores de algún proceso patológico como descamación de células presuntivo de la “enfermedad de las bolitas blancas”. No obstante, este análisis sirvió para ver la proporción y tipo de alimento en el intestino, mismo que fue del 61.9% y 38.1% de alimento balanceado y natural respectivamente. El alimento natural estuvo constituido en su mayoría por algas, microalgas, detritus y componentes del zooplancton.

#### IV.1.2.2 Granja 2

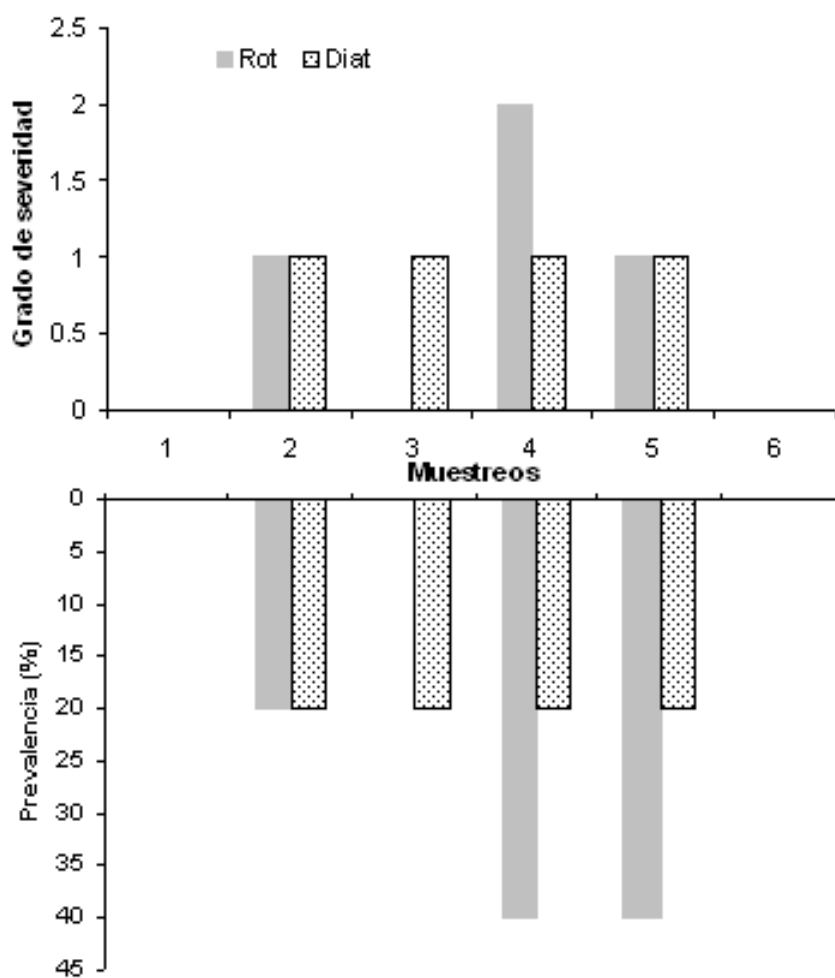
##### IV.1.2.2.1 Branquias

Mediante el análisis en fresco de branquias no se observó la presencia de protozoos coloniales tipo *Zoothamnium* o *Epistylis* en las branquias de los camarones cultivados bajo invernadero con agua de pozo, tampoco se observaron bacterias filamentosas tipo

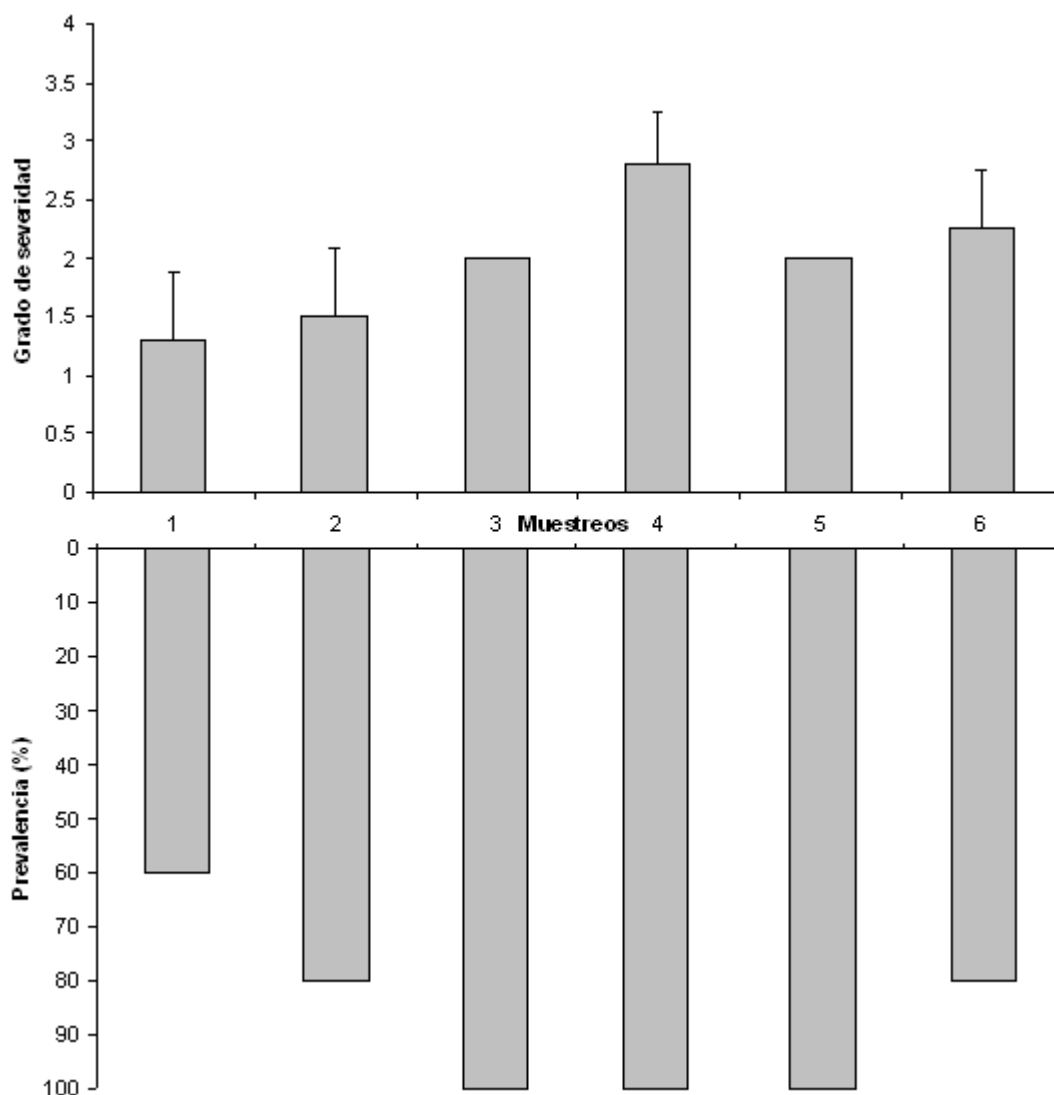
*Leucothrix*. Sin embargo, se observaron casos aislados de diatomeas del género *Nitzschia* y materia orgánica, adheridas en las branquias y superficie corporal, incluyendo la región ventral del crustáceo donde las diatomeas se localizaron entre los pereiópodos y pleópodos. Asimismo, mediante el análisis en fresco de las branquias también se observó de forma puntual la presencia de un tipo de rotífero similar a ejemplares del género *Philodina* el cual se encontró sobre la superficie branquial con bajos niveles de prevalencia (Figura 7). Posteriormente, este mismo rotífero fue observado en las preparaciones permanentes histológicas donde se encontró localizado en región ventral del cefalotórax entre los pliegues de los pereiópodos y escama antenal, no se encontró ningún tipo de daño o alteración tisular asociada a su presencia.

#### **IV.1.2.2.2 Hepatopáncreas**

La revisión en fresco del hepatopáncreas reveló daño de moderado a severo en los túbulos. Asimismo, se observaron grados de deformidad de moderados a severos (Grado II a III), para este órgano (Figura 8). En este caso fueron frecuentes las observaciones de túbulos estrangulados, paredes rugosas y ausencia de gotas lipídicas (Figura 9).



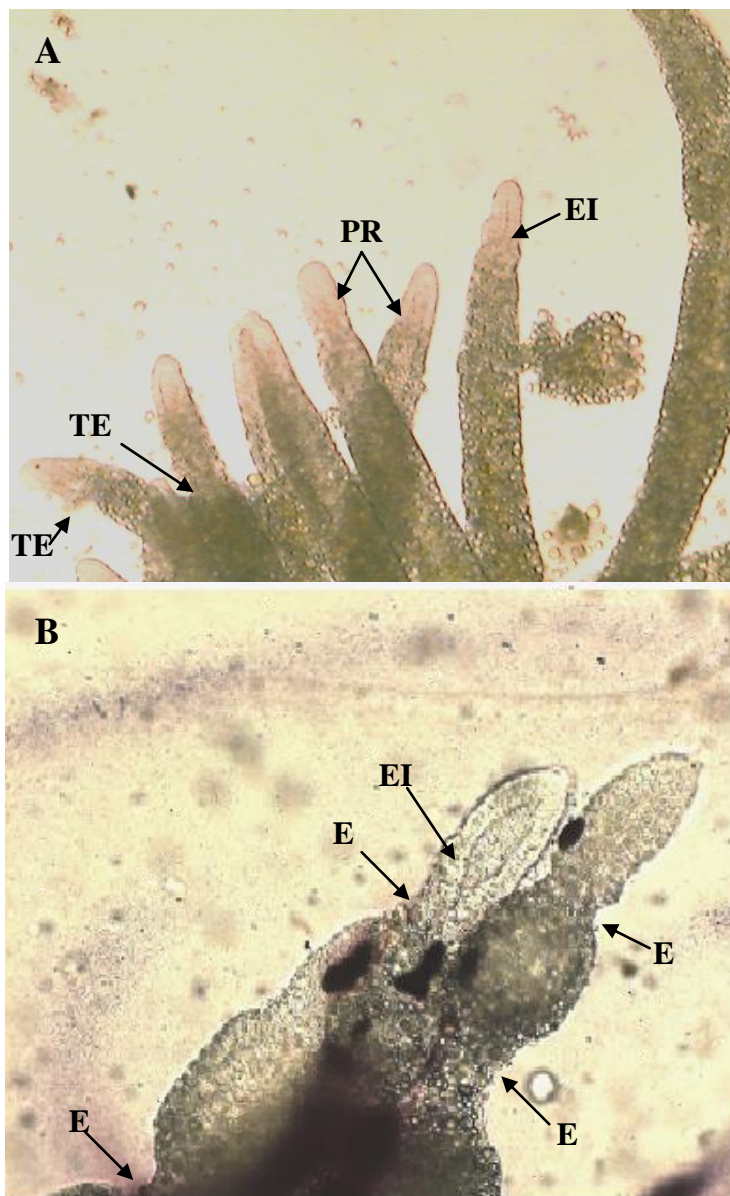
**Figura 7.** Resultados de revisión en fresco de las branquias en los camarones de la granja 2.



**Figura 8.-** Prevalencia y grado de deformidad en los túbulos del hepatopáncreas observados en la granja 2.

#### IV.1.2.2.3 Intestino

La revisión del intestino no reveló la presencia de ningún endoparásito alojado en su interior, ni alteraciones tisulares asociados con la presencia de patógenos. No obstante, este análisis sirvió para observar la proporción de alimento balanceado: alimento natural ingerido por el crustáceo el cual fue del 64.3% y 35.7% respectivamente. En este caso el alimento natural estuvo integrado en su mayoría por microalgas de diversos tipos.

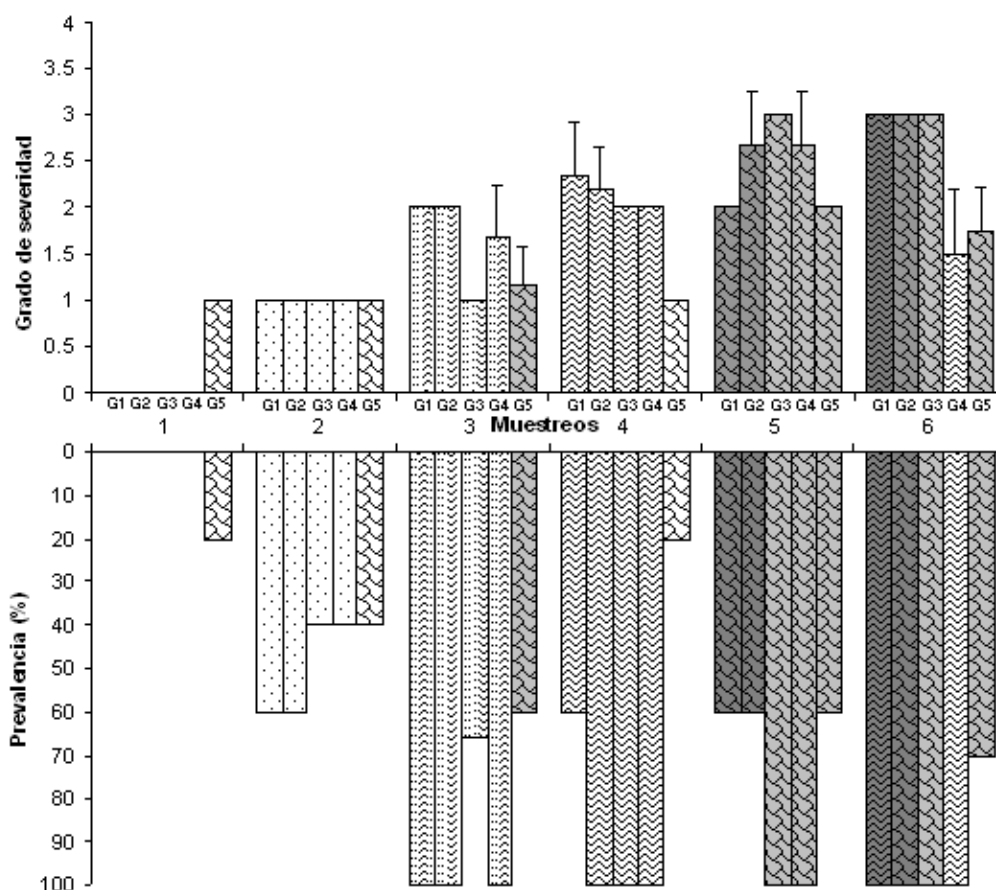


**Figura 9.-** Preparación en fresco del hepatopáncreas en camarones de la granja ATS. **A.-** Moderada cantidad de túbulos estrangulados (TE). Abundantes túbulos con paredes rugosas (PR) Los túbulos se observan delgados y con epitelio inflamado (EI), en general se observa un GS-2 en deformidad. Ampliación 100 X **B.-** Estrangulación marcada de túbulos del hepatopáncreas (GS-3), las flechas señalan los lugares de estrangulación (E) así como el epitelio inflamado (EI). Ampliación 200X.

### IV.1.3. Revisión en fresco de los camarones en las granjas del Valle de Mexicali

#### IV.1.3.1 Branquias

Se observó la presencia de ciliados coloniales tipo *Epistylis*, bacterias filamentosas tipo *Leucothrix* y algas coloniales Eugleniodes tipo *Colasium*. Además, los hallazgos incluyeron alteraciones titulares como melanosis y necrosis branquial. La Figura 10 presenta los resultados obtenidos para cada una de las cuatro granjas estudiadas en esta zona nombradas granja 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente (representadas por cada una de las barras en la figura y señaladas bajo las barras), durante el periodo de mayo a septiembre del 2003 y mayo a septiembre del 2006.



**Figura 10.-** Grado de severidad y prevalencia de epibiontes y lesiones encontrados en los estanques de camarón cultivado en el Valle de Mexicali. □ = Algas coloniales Euglenoides tipo *Colasium*, ▨ = Algas coloniales Euglenoides tipo *Colasium* + Bacterias filamentosas tipo *Leucothrix* ▩ = Bacterias filamentosas tipo *Leucothrix* ▧ = Protozoos ciliados tipo *Epistylis* ■ = Bacterias filamentosas tipo *Leucothrix* + Necrosis branquial

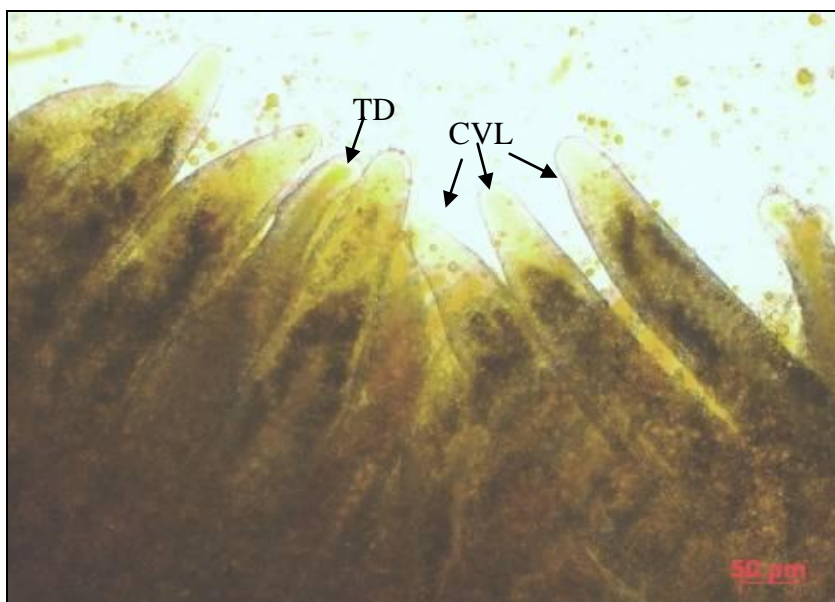
En otro periodo de estudio, realizado de junio a septiembre del 2006 para la misma zona, se efectuaron muestreos de camarones de la granja 7. En este caso, el análisis en fresco de las branquias reveló la presencia de solo dos de los tres epibiontes encontrados en las granjas estudiadas durante el 2003. Dichos epibiontes correspondieron a protozoos coloniales tipo *Epistylis* y bacterias filamentosas tipo *Leucothrix* sin observarse las algas coloniales *Euglenoides* como en los muestreos realizados durante el 2003 (Tabla VI).

**Tabla VI.** Resumen de observaciones en fresco de los camarones cultivados en la granja 7, Valle de Mexicali durante el 2006.

Granja 7	Branquias					Hepatopáncreas	
	Muestreo	N	Protozoos tipo <i>Epistylis</i>		Bacterias tipo <i>Leucothrix</i>		Deformidad en Túbulos
P(%)			GS	P(%)	GS	P (%)	GS
1	5	20	1.0	0	0	0	0
2	5	40	1.0	0	0	20	1
3	5	60	1.3	60	1	20	1
4	5	20	1.0	0	0	40	1
5	5	60	2.0	60	2	20	1
6	5	100	1.6	20	1	40	1
7	5	60	2	0	0	40	1
8	5	60	2	0	0	40	1

#### IV.1.3.2 Hepatopáncreas

Los camarones de las cuatro granjas del Valle de Mexicali, estudiados en el 2003, incluyendo el estudio realizado en el 2006 a la granja 7 no evidenciaron parásitos, agentes patógenos o partículas de oclusión poliédricas presuntivas de BP (*Baculovirus penaei*), mediante la revisión en fresco del hepatopáncreas. Sin embargo, estos presentaron una leve carencia de lípidos así como una ligera rugosidad en la parte distal de los túbulos (Figura 9 A-B). En general, se observó una deformidad leve en los túbulos (GS-I), similar a los encontrados en la granja 1 (Figura 5) con un porcentaje de prevalencia entre el 20 y 40%.



**Figura 11.** Túbulos del hepatopáncreas de camarones del Valle de Mexicali. Se observa una ligera carencia de vacuolas lipídicas (CVL) señaladas por las flechas, así mismo, se observan algunos túbulos deformes (TD) señalados por las flechas. La muestra presenta un grado de deformidad leve (GS-1). Ampliación 100 X.

#### IV.1.3.3 Intestino

Mediante el análisis en fresco del intestino se pudo observar que los camarones cultivados en el Valle de Mexicali no presentaron endoparásitos o agentes patógenos en el intestino, tampoco se observó descamación de células o partículas de oclusión poliédricas presuntivas de BP. No obstante, este análisis sirvió para conocer de forma general la proporción de alimento balanceado respecto al alimento natural. Así, se encontró que la composición de la dieta de los camarones cultivados en este ambiente en general estuvo compuesta de un 49.5 % de alimento balanceado y un 50.5 % de alimento natural. Asimismo, este último se compuso de zooplancton, algas, detritus y microalgas.

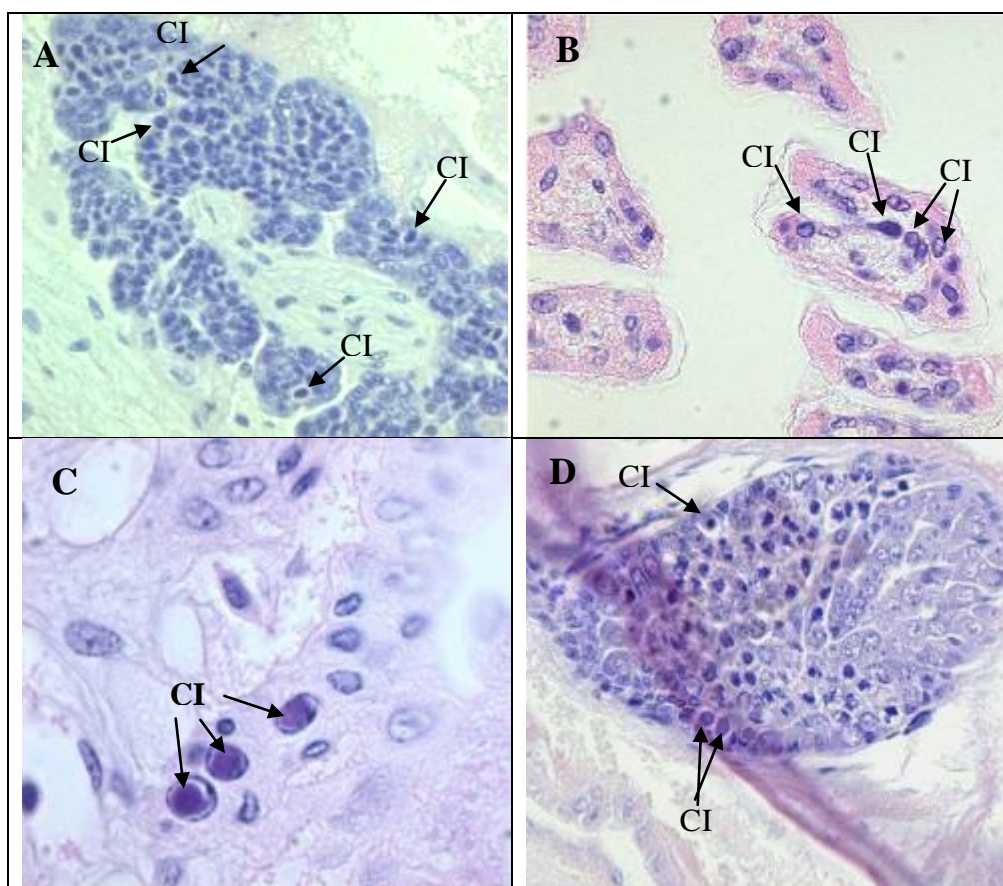
### IV. 2.1. Análisis histopatológico del camarones cultivados en Baja California

#### IV.2.1.1. IHHNV

El análisis histopatológico de los camarones en las granjas de ambas regiones y en todas las granjas estudiadas reveló cuadros característicos; asociados a una enfermedad viral conocida como IHHNV, la cual se distingue por la presencia de células con núcleos



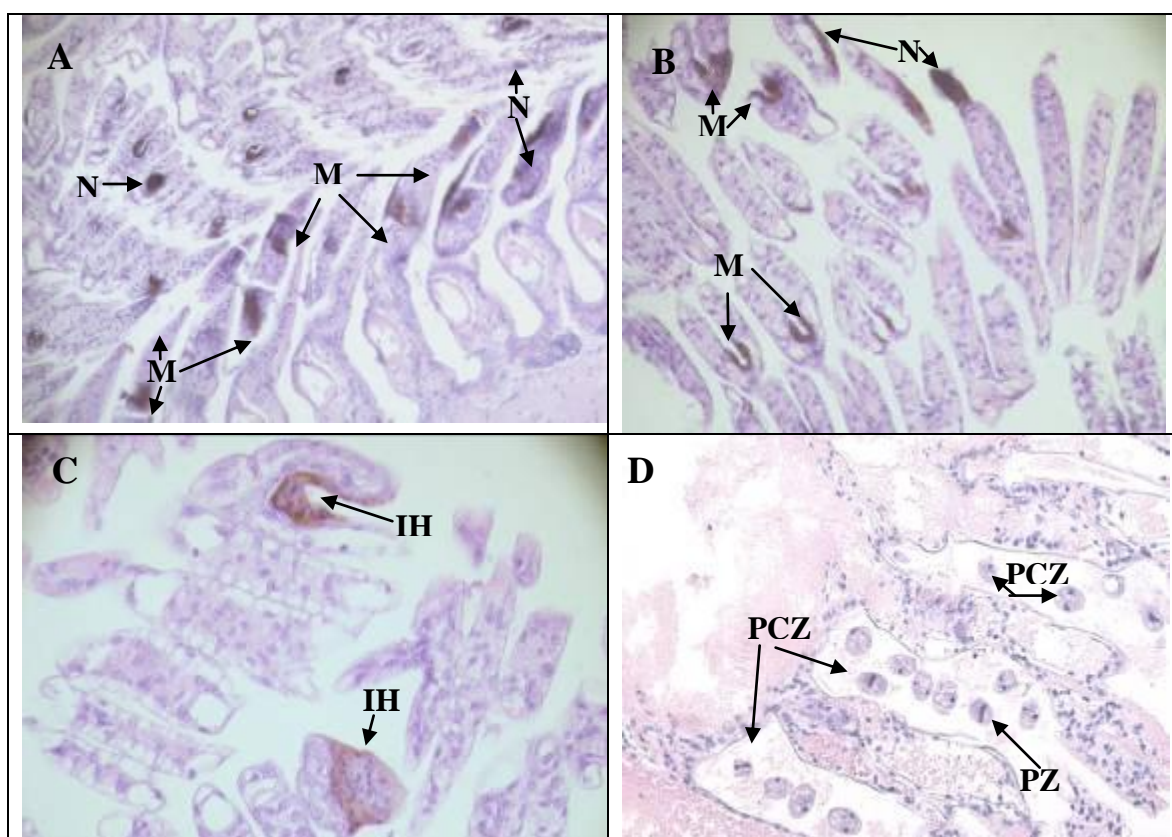
hipertróficos eosinófilos y ligeramente basófilos con cromatina marginal, denominados cuerpos de inclusión Cowdry tipo “A” (Figura 12), estos fueron localizados principalmente en tejido hematopoyético, branquias, tejido hipodérmico de pleura branquial y tejido gonádico. En la Tabla VII se observa el porcentaje de prevalencia de IHHNV en los estanques estudiados el cual llegó a alcanzar una prevalencia máxima del 29% y un grado de severidad máximo de 2 (GSM-2).



**Figura 12.** Tejidos donde fue más frecuente encontrar los cuerpos de inclusión característicos del IHHN. **A.-** Vista general de una porción del tejido hematopoyético, las flechas señalan los cuerpos de inclusión (CI) característicos del IHHNV (H-E, aumento 200 X). **B.-** Tejido branquial con cuerpos de inclusión tipo IHHNV, señalados por las flechas (H-E, aumento 400 X). **C.-** Preparación histológica de pleura branquial donde se aprecian 3 cuerpos de inclusión típicos de IHHNV (H-E, aumento 630 X). **D.-** Porción de tejido ovárico inmaduro donde se señalan con flechas 2 cuerpos de inclusión tipo IHHNV en la parte inferior y uno en la parte superior (H-E, aumento 400 X).

#### IV.2.1.2 Necrosis y melanosis branquial

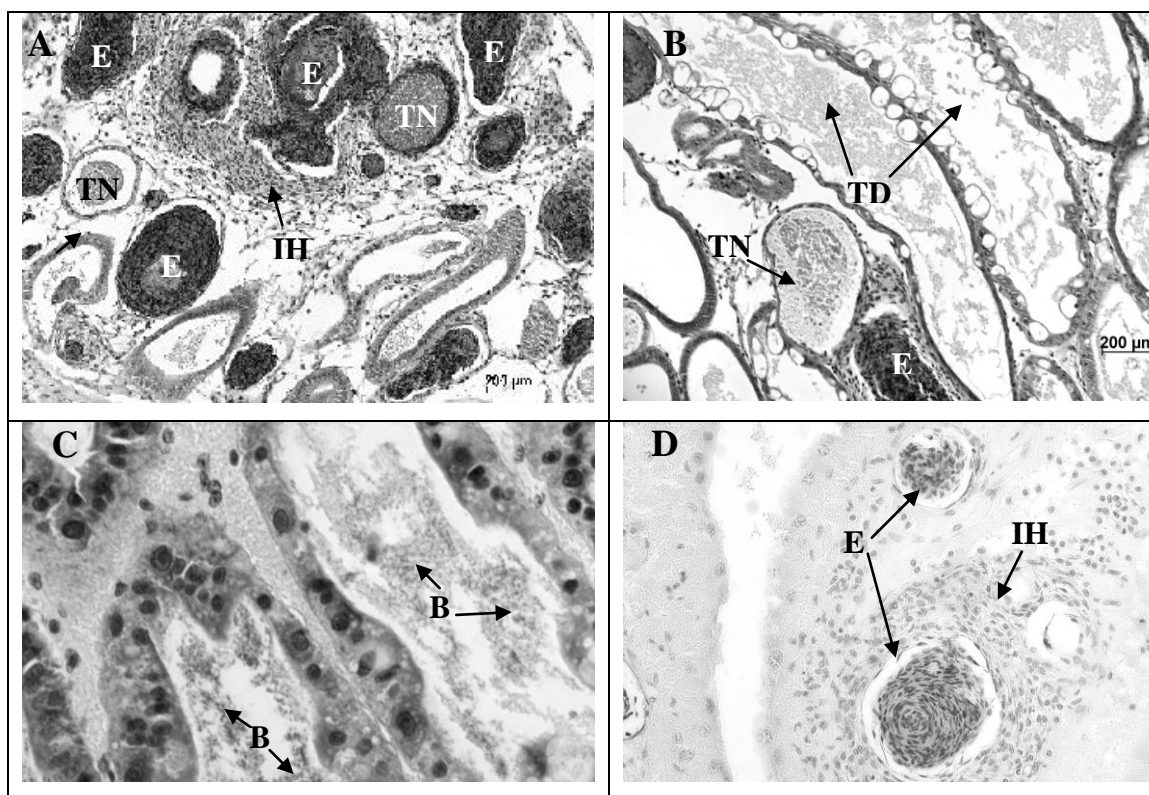
Un segundo cuadro histopatológico común a todas las granjas estudiadas correspondió a lesiones caracterizadas por melanosis y/o necrosis focal o multifocal, con infiltración hemocítica y grados de severidad de bajo a alto (GS I a III). La Figura 13 (A, B y C) ilustra este tipo de lesiones, en tanto la Tabla IX presenta la prevalencia y grado de severidad debido a estas lesiones. También mediante la histopatología se evidenció la presencia de protozoos ciliados tipo *Zoothamnium* presentes en las branquias y superficie corporal de los camarones (Figura 13 D), en este caso, los distintos epibiontes no causaron reacciones tisulares en el hospedero observables mediante histología. La Tabla IX presenta un resumen de las observaciones encontradas mediante dicho análisis



**Figura 13.** A) Vista general de un corte longitudinal de branquias de camarón donde se observa melanosis (M) y necrosis (N) multifocal elevada en las lamelas branquiales con GS-3 (H-E aumento 100 X). B) Necrosis y melanosis branquial moderada, con GS-2 (H-E, aumento 200 X). C) Melanosis focal leve en branquias, se observa asociada infiltración hemocítica (IH) con GS-1 (H-E aumento 400 X). D) Infestación moderada (GS-2) de protozoos ciliados tipo *Zoothamnium* (PCZ) localizados en las branquias de camarón (H-E, aumento 200 X).

### IV.2.1.3. Bacteriosis

Un tercer cuadro histopatológico solo observado en la granja 1 en el municipio de Ensenada, fue identificado como una bacteriosis, este se caracterizó por la presencia de túbulos necróticos del hepatopáncreas con presencia de infiltración hemocítica y encapsulación (Figura 14 A-B), en algunos casos se pudo observar presencia de bacterias en el lumen de los túbulos (14-C), además, dichas lesiones generalmente estuvieron relacionadas con daño en otros tejidos como lesiones en branquias (Figura 13 A-C) y glándula antenal (14-D), donde se observó necrosis y melanosis multifocal, así como infiltración hemocítica.



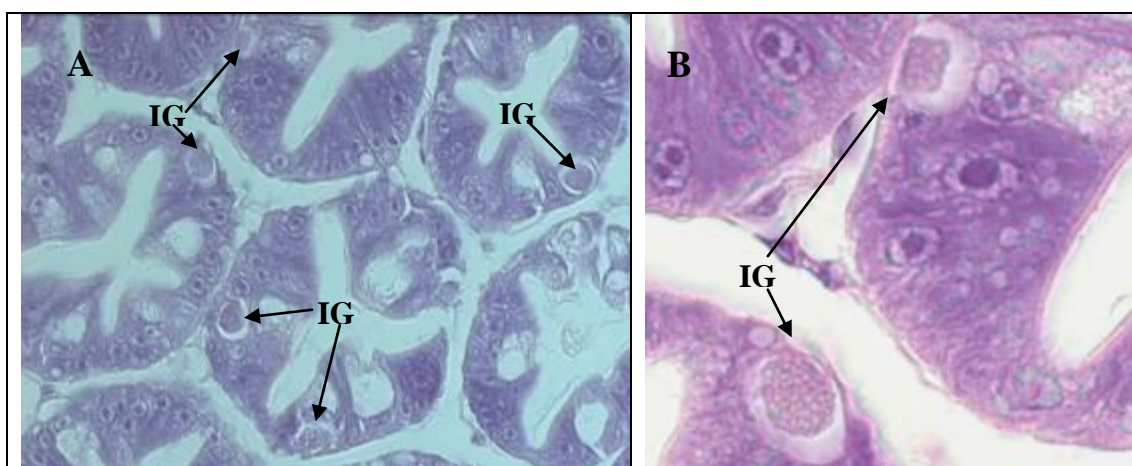
**Figura 14.-** A.- Túbulos del hepatopáncreas (THP) con atrofia generalizada, presencia de túbulos necróticos (TN), infiltración hemocítica (IH) y encapsulación (E). Corte 5 micras tinción H-E, aumento 100 X. B.- Túbulos del HP, se observan dilatados (TD), encapsulación (E) y túbulo necrótico (TN). Corte 5 micras tinción H-E, aumento 100 X. C.- Detalle de los túbulos del hepatopáncreas donde se observan bacterias (MB) basófilas en el lumen de los túbulos. Corte a 5 micras tinción H-E, aumento 400 X. D.- Región anterior a la cámara gástrica, donde se observa infiltración hemocítica (IH) y encapsulación (E) contiguos a un túbulo de la glándula antenal. Corte a 5 micras tinción H-E, aumento 100 X.



#### IV.2.1.3. Inclusiones en el epitelio de los THP

Un cuadro histopatológico presente en los túbulos del hepatopáncreas (THP) y únicamente observado en camarones de la granja 2, se debió a la presencia de inclusiones de apariencia granulosa observadas a bajos aumentos (100 y 200 X), al observarse a mayores aumentos (630 X) se distinguieron múltiples esferas anucleadas de apariencia refringente. Dicha morfología presentó cierta similitud con parásitos tipo Haplosporidio; sin embargo, será necesario profundizar en más estudios a fin de identificar con precisión a que tipo de microorganismos se deben dichas inclusiones (Figura 15).

Un hecho que llamó la atención fue que no se presentaron cuadros de reacciones hemocitarias o atrofia severa del tejido asociado a dichas inclusiones. Además, se observó una prevalencia máxima del 58% durante el segundo muestreo hasta bajar a una prevalencia del 5% durante el cuarto muestreo y finalmente no detectarse en los dos últimos muestreos (Tabla VII).



**Figura 15.** A.-Vista general del hepatopáncreas donde se observan 5 inclusiones granulosas (IG), en el epitelio tubular señaladas con flechas (Corte 5 micras, tinción H-E, 200 X). B.-Ampliación de las inclusiones granulosas (IG), donde se aprecian múltiples esferas refringentes anucleadas. (Corte 5 micras, tinción H-E, 630 X).

**Tabla VII.** Prevalencia y grado de severidad determinados mediante análisis histopatológico en camarón blanco (*L. vannamei*) cultivado en Baja California.

Ensenada		Histopatología												
Granja 1 Muestreo	N	IHHNV			Nec. y Mel. Branq.			Bacteriosis			Inclusiones en THP			
		% P	GS	GSM	% P	GS	GSM	% P	GS	GSM	% P	GS	GSM	
1	20	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	
2	20	5	1	1	5	1	1	0	-	-	0	-	-	
3	20	15	1	1	15	1	1	0	-	-	0	-	-	
4	20	30	1.2	2	30	1.2	2	0	-	-	0	-	-	
5	20	25	1.4	2	25	1.4	2	0	-	-	0	-	-	
6	20	40	2.1	3	40	2.1	3	0	-	-	0	-	-	
7	20	40	1.6	2	40	1.6	2	0	-	-	0	-	-	
8	20	60	2.3	3	60	2.3	3	0	-	-	0	-	-	
Granja 2	60	30	1.5	2	30	1.5	2	69	2.5	4	48	1.2	2	
2	24	29	2.1	3	29	2.1	3	42	2.2	4	58	1.3	3	
3	26	12	1.3	2	12	1.3	2	15	1.6	2	25	1	1	
4	21	10	1	1	10	1	1	30	3.1	4	5	1	1	
5	20	10	1	1	10	1	1	25	1.2	2	0	-	-	
6	20	50	1.9	3	50	1.9	3	60	1.5	4	0	-	-	
Mexic. Granja 3	25	12	1	1	12	1	1	0	-	-	0	-	-	
2	25	16	1	1	16	1	1	0	-	-	0	-	-	
3	25	32	1	1	32	1	1	0	-	-	0	-	-	
4	25	20	1.4	2	20	1.4	2	0	-	-	0	-	-	
5	25	28	1.3	2	28	1.3	2	0	-	-	0	-	-	
6	25	48	1.6	3	48	1.6	3	0	-	-	0	-	-	
Granja 4	25	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	-	-	
2	22	14	1	1	14	1	1	0	-	-	0	-	-	
3	25	20	1	1	20	1	1	0	-	-	0	-	-	
4	25	24	1.3	2	24	1.3	2	0	-	-	0	-	-	
5	23	13	1.7	2	13	1.7	2	0	-	-	0	-	-	
6	25	20	1.4	2	20	1.4	2	0	-	-	0	-	-	
Granja 5	25	8	1	1	8	1	1	0	-	-	0	-	-	
2	25	16	1	1	16	1	1	0	-	-	0	-	-	
3	20	25	1.2	2	25	1.2	2	0	-	-	0	-	-	
4	25	40	1.2	2	40	1.2	2	0	-	-	0	-	-	
5	21	38	1.6	3	38	1.6	3	0	-	-	0	-	-	
6	25	40	1.6	3	40	1.6	3	0	-	-	0	-	-	
Granja 6	25	12	1	1	12	1	1	0	-	-	0	-	-	
2	23	35	1	1	35	1	1	0	-	-	0	-	-	
3	23	43	1.2	2	43	1.2	2	0	-	-	0	-	-	
4	25	48	1.1	2	48	1.1	2	0	-	-	0	-	-	
5	22	40	1.3	2	40	1.3	2	0	-	-	0	-	-	
6	25	40	1.4	3	40	1.4	3	0	-	-	0	-	-	
Granja 7	20	5	2	2	0	0	0	0	-	-	0	-	-	
2	25	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	-	-	
3	25	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	-	-	
4	23	0	0	0	4	1	1	0	-	-	0	-	-	
5	25	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	-	-	
6	20	5	1	1	0	0	0	0	-	-	0	-	-	
7	20	5	1	1	15	1.3	2	0	-	-	0	-	-	
8	20	0	0	0	25	1.2	2	0	-	-	0	-	-	

### IV. 3. Diagnóstico por PCR.

Las pruebas de PCR (Reacción en Cadenas de la Polimerasa) realizadas a las larvas al inicio del cultivo y posteriormente al concluir el cultivo a ornamentos adultos, no revelaron la presencia del WSSV en ninguna de las granjas estudiadas en el estado de Baja California. Solo en un caso se presentó un resultado dudoso que sugería un resultado positivo. Sin embargo, posteriores pruebas determinaron que se trataba de un falso positivo.

### IV.4. Registro de variables ambientales de las granjas de camarón de los municipios de Ensenada y Mexicali.

Las dos granjas estudiadas en la región de Ensenada realizaron el cultivo del camarón en estructuras de invernadero, además, ambos sistemas se caracterizaron por el manejo de densidades de siembra elevadas, también denominados sistemas super-intensivos. La granja 1 operó con sistema de flujo abierto con agua de mar y la granja 2 con sistema cerrado de recirculación con agua de pozo. En cambio, las granjas localizadas en el municipio del Mexicali todas operaron a cielo abierto en estanques de tierra y con una profundidad promedio de 1.5 m. La Tabla VIII presenta un resumen de los parámetros ambientales promedio registrados en las granjas estudiadas en ambas regiones.

**Tabla VIII.** Resumen de parámetros ambientales registrados en los estanques de ambas zonas estudiadas. Los valores extremos se indican con negritas.

Granja	Temperatura °C	Salinidad g L <sup>-1</sup>	Oxígeno mg L <sup>-1</sup>	pH
Granja 1	28.26 (23.0-34.0)	35.9 (35-38)	3.40 (1.5-6.1)	7.65 (6.9-8.5)
Granja 2	27.06 (21.9-32.1)	1.6 (1.4-1.9)	7.8 (5.48-16.74)	8.45 (7.7-9.5)
Granja 3	27.7 (18.4-31.9)	1.4 (1.0-4.0)	7.83 (4.9-11.7)	8.21(7.04-8.74)
Granja 4	29.2 (23.0-31.3)	1.1 (1.0-2.0)	6.11 (1.02-12.30)	8.23 ( 7.31-8.8)
Granja 5	27.4 (20.0-30.5)	5.3 (4.0-8.0)	5.29 (2.68-12.50)	7.97 (7.38-9.30)
Granja 6	29.3 (22.6-32.9)	1.7 (1.0-4.0)	7.82 (4.38-11.49)	8.08 (7.0-8.80)
Granja 7	28.9 (22.2-32.4)	0.8 (0.75-0.88)	6.27 (3.83-9.74)	8.15 (7.84-8.46)

Nota: Los valores entre paréntesis representan los valores mínimo y máximo, respectivamente

Una aspecto a resaltar en torno a los parámetros ambientales es el valor mínimo de oxígeno registrado en la granja 1 (señalado con negritas), el cual descendió hasta un valor de 1.5 mg L<sup>-1</sup>, lo anterior con importantes efectos en los organismos, observándose así mortalidad

leve de camarones (< al 2 % de la población), principalmente organismos en proceso de muda, en estos casos, cuando se registraron descensos en los niveles de oxígeno se observaron organismos nadando en la superficie, principalmente organismos con branquias oscuras.

Por otra parte otro aspecto que llamó la atención fueron los valores de oxígeno disuelto tan elevados registrados en la granja 2 los cuales llegaron hasta niveles de sobresaturación (16.74 mg L<sup>-1</sup>). Este hecho se presentó en las primeras tres semanas de cultivo. El estanque afectado presentó una capa espumosa verde brillante en la superficie producto de una excesiva población de microalgas, asimismo en aproximadamente un 1.0% de la población se observaron burbujas bajo el tegumento, los organismos afectados nadaban sobre la superficie sin poder sumergirse, posteriormente murieron o fueron canibalizados por los organismos no afectados. Este hecho se presentó en un día muy soleado entre las 14:00 y 16:00 h.

En torno a los parámetros ambientales existen otros dos aspectos que llaman la atención, tal es el caso de el valor de pH máximo registrado en granja 2 (9.5) y el valor mínimo del oxígeno disuelto registrado en la granja 4 el cual descendió hasta 1.02 mg L<sup>-1</sup>. Sin embargo, para este caso no se observaron organismos nadando en la superficie.

#### **IV. 4.1. Composición iónica del agua utilizada para el cultivo del camarón en los municipios de Ensenada y Mexicali.**

Se presentan los valores de composición iónica del agua en ambas zonas de estudio en el municipio de Ensenada la muestra corresponde a la granja 2 la cual utilizó agua de origen subterráneo, en tanto la muestra de agua utilizada para el análisis correspondiente al municipio de Mexicali, se tomó de la granja 7 esta su vez puede ser representativa del resto de las granjas que utilizan agua del sistema de riego agrícola (proveniente a su vez del Río Colorado). La Tabla IX presenta los valores de composición iónica contenidos en ambos tipos de agua.

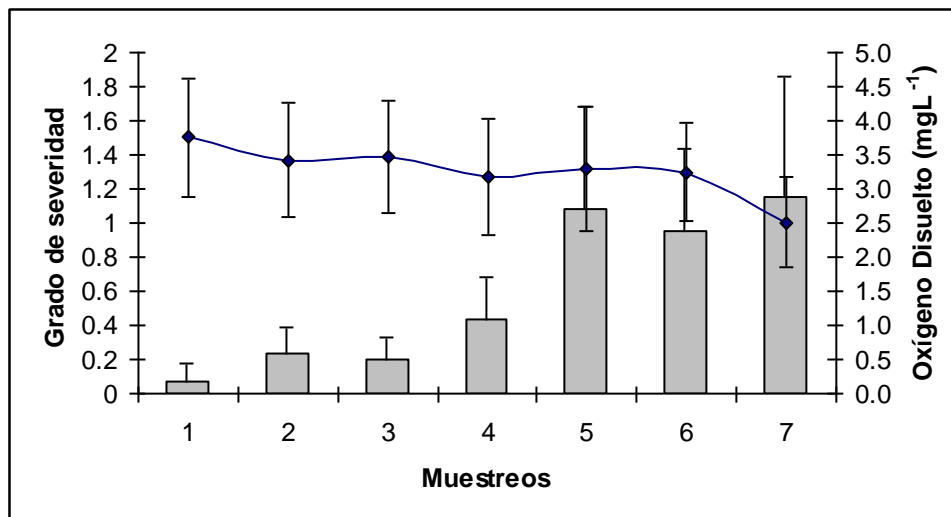
**Tabla IX.** Valores de composición iónica entre los tipo de agua utilizado en Ensenada y Mexicali.

<b>Parámetros</b>	<b>Granja 2 (ENSENADA)</b>	<b>Granja 7 MEXICALI)</b>
<b>pH</b>	<b>7.1</b>	<b>7.6</b>
<b>Dureza</b>	<b>1036</b>	<b>546</b>
<b>Bicarbonatos mgL<sup>-1</sup></b>	<b>268</b>	<b>36</b>
<b>Carbonatos mgL<sup>-1</sup></b>	<b>0</b>	<b>26</b>
<b>Conductividad eléctrica mmhos/cm a 25°C</b>	<b>2.23</b>	<b>1.446</b>
<b>TDS ppm</b>	<b>1395</b>	<b>925</b>
<b>Sodio mgL<sup>-1</sup></b>	<b>269</b>	<b>75</b>
<b>Cloruro mgL<sup>-1</sup></b>	<b>743.5</b>	<b>187.5</b>
<b>Boro mgL<sup>-1</sup></b>	<b>0.6</b>	<b>0.31</b>
<b>IONES meq/Lt</b>		
<b>K</b>	<b>0.11</b>	<b>0.29</b>
<b>Na</b>	<b>11.7</b>	<b>3.26</b>
<b>Ca</b>	<b>14.68</b>	<b>7.2</b>
<b>Mg</b>	<b>6.02</b>	<b>3.75</b>
<b>Cl</b>	<b>20.94</b>	<b>5.28</b>
<b>SO4</b>	<b>7</b>	<b>7.75</b>
<b>HCO3</b>	<b>4.39</b>	<b>0.57</b>
<b>CO3</b>	<b>0</b>	<b>0.87</b>
<b>Total Cationes</b>	<b>32.5</b>	<b>14.51</b>
<b>Total Iones</b>	<b>32.34</b>	<b>14.47</b>

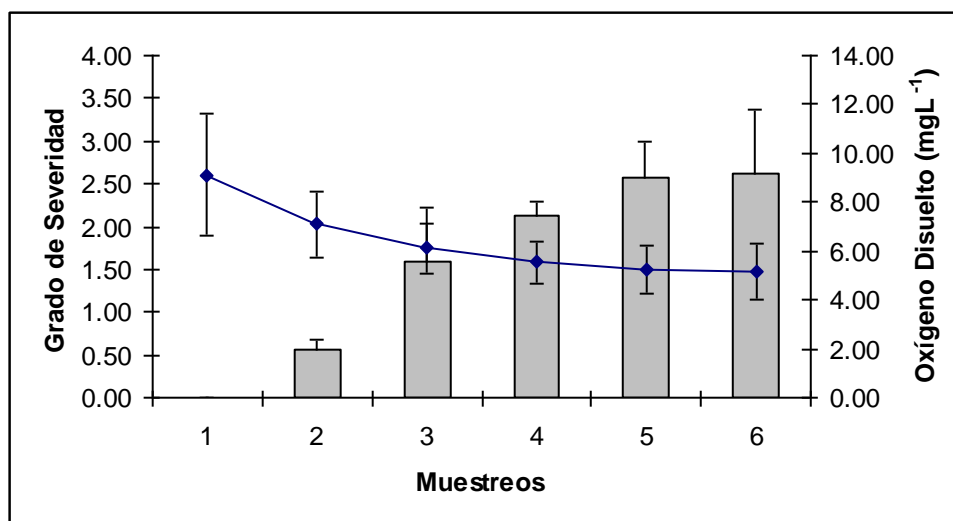
#### **IV. 4.2. Relación de parámetros ambientales y la presencia de epibiontes.**

Un análisis de los valores de infestación por epibiontes en las branquias de los camarones (ya mostrados en la sección IV.1.2 y IV.1.3) y los niveles de oxígeno disuelto en los estanques revela tendencias en sentidos opuestos. De tal forma mientras en el oxígeno muestra una tendencia hacia la baja a medida que el ciclo de cultivo se desarrolla, tanto la prevalencia de infección como el grado de severidad por epibiontes en branquias describen un comportamiento de incremento a medida que se desarrolla el cultivo (Figuras 16 y 17).





**Figura 16.** Comportamiento del oxígeno disuelto en el estanque y grado de severidad por epibiontes en las branquias de los camarones de la granja 1 en el municipio de Ensenada, (las barras señalan el grado de severidad por epibiontes).



**Figura 17.-** Nivel de oxígeno en los estanques y grado de severidad observado en las branquias de los camarones de las granjas de Mexicali durante el ciclo de cultivo (las barras señalan el grado de severidad por epibiontes).

#### IV.4.3. Nivel del estanque, turbidez y amonio total

Se monitorearon algunos parámetros de importancia como indicadores de la calidad del agua y las condiciones de cultivo, entre ellos la profundidad promedio del estanque, la turbidez y el amonio total (Tabla X). De éstos sobresalen los valores de turbidez los cuales se mantuvieron en valores de lectura muy amplios. No así los valores de amonio total los cuales se mantuvieron en niveles seguros para el cultivo del camarón.

**Tabla X.** Profundidad promedio del estanque, turbidez y amonio total en las granjas del Valle de Mexicali durante este estudio.

Granja	Nivel del estanque (m) (Mínimo- Máximo)	Turbidez (cm) (Mínimo- Máximo)	Amonio total (mg L <sup>-1</sup> )
Granja 3	1.5 ( 1.30-1.70)	57.22 (25-140)	> 0.1
Granja 4	0.99 (0.90-1.60)	69.16 (50-80)	> 0.1
Granja 5	1.80 (1.60-1.90)	22.69 (15-30)	0.2
Granja 6	1.75 (1.50-1.80)	76.66 (45-110)	0.1
Granja 7	1.65 (1.50-1.70)	17.00 (15-25)	> 0.1

#### IV. 5. Supervivencia

Una forma directa de evaluar el grado de éxito en el cultivo del camarón es mediante la evaluación de la supervivencia al final del periodo de cultivo, en ese sentido, la supervivencia obtenida puede ser el reflejo del grado de acierto en el manejo de los organismos y el ambiente del estanque, o bien reflejar la presencia de enfermedades, o parásitos en cultivo, o la suma de tales factores. Con el propósito de tener un mejor panorama del efecto que guarda la carga parasitaria en el camarón de cultivo y su relación con los niveles de producción, especialmente con la supervivencia; se presenta este valor al final del cultivo para todas las granjas estudiadas (Tabla XI). Es importante observar que durante el desarrollo de cultivo, constantemente se deben realizar estimaciones poblacionales, ya que de ello dependerán los ajustes de la ración alimenticia y manejo eficiente del alimento suministrado. En este sentido, sólo se contó con registros poblacionales de la granja 1 en el resto de las granjas no se contó con estimaciones poblacionales previo a la cosecha.

**Tabla XI.** Supervivencia estimada del camarón cultivado en los estanques al final del periodo de cultivo.

Granja	Supervivencia (%)
Granja 1	90
Granja 2	10
Granja 3	36
Granja 4	45
Granja 5	51
Granja 6	74
Granja 7	75

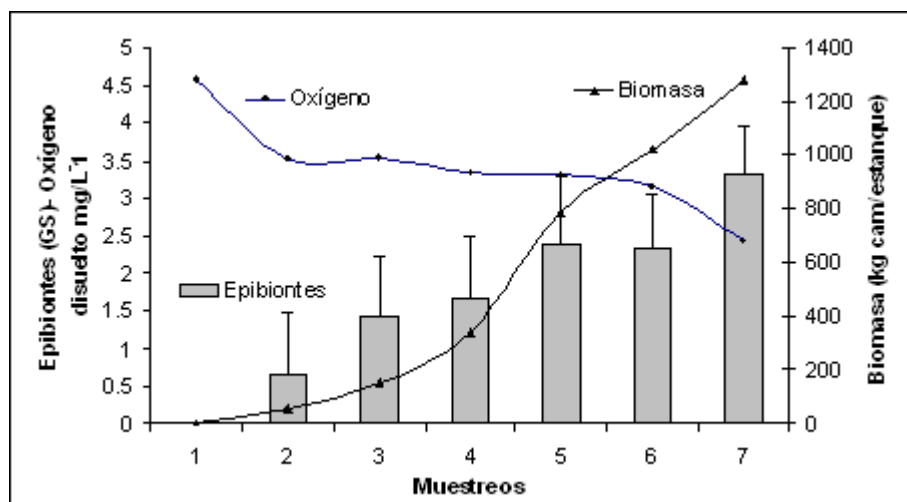
Otros estimadores de producción en el cultivo del camarón se resumen en la Tabla XII; ésta integra una serie de indicadores que sirven para dar una mejor idea de las condiciones en que se manejan los cultivos, es importante en todo momento poner atención en la biomasa que contiene el estanque para una correcta programación de las actividades de manejo.

**Tabla XII.** Resumen de indicadores técnicos de producción en las granjas estudiadas y epibiontes, parásitos o patógenos asociados.

Granja	Densidad (cam/m <sup>2</sup> )	Días de cultivo	Incremento (g)/sem	Biomasa (Kg/m <sup>2</sup> )	% Sobr	Epibionte/ patógeno
G-1	250	155	0.8	3.46	90	Zoot. Leuc. IHHNV
G-2	220	150	0.5	0.31	10	rotif., diat., IHHNV, bact., inc. en HP.
G3	23	132	1.38	0.141	36	Epist. Leuc. Alg. Col. IHHNV
G-4	47	135	1.07	0.353	45	Epist. Leuc. Alg. Col. IHHNV
G-5	65	157	1.15	0.84	51	Epist. Leuc. Alg. Col., IHHNV
G-6	50	113	1.04	0.108	74	Epist. Leuc. Alg. Col. IHHNV
G-7	42	135	0.95	0.295	75	Epist. Leuc. IHHNV

La Figura 18, la cual señala los comportamientos de la biomasa, carga epibiótica y oxígeno disuelto, componentes que pueden interactuar y eventualmente ocasionar eventos de mortalidad. La información presentada en la Figura 18 corresponde a la granja 1 la cual operó con agua de mar. No se presentan para otras granjas, dado que no se obtuvieron

registros del tamaño de la población al tiempo que se daba seguimiento mediante los muestreos sanitarios.



**Figura 18.-** Incremento en la biomasa de camarón en los estanques de la granja 1, durante el ciclo completo de producción; se observa como los epibiontes se incrementan durante el cultivo, mientras el nivel de oxígeno tiende a disminuir.

## **IV. 6. Bioensayo de infectología con WSSV**

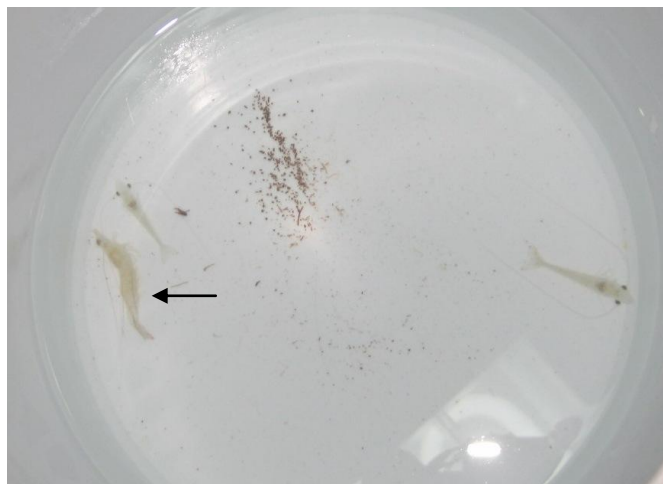
### **IV.6.1.Desarrollo de la infección viral**

Todos los grupos experimentales inyectados con el inóculo viral desarrollaron infecciones virales, detectables mediante histología a las 9:35 hrs ( $\pm 4:0$  h) post-inyección (h.p.i). En los grupos de control inyectados con el placebo no se detectó ningún cuadro de enfermedad asociada a virus ni aún al final del experimento. En cuanto a la prevalencia de infección observada en los grupos experimentales G-0 presentó 22.2%, G-15, G-30 y G-60 presentaron un 88.8% y por último G-45 presentó un 100% de prevalencia de infección al virus. Asimismo, para todos los grupos experimentales la severidad de infección (grado de severidad) no sobrepasó un valor de uno ( $GS= 1.0$ ) a este tiempo (9:45 h.p.i.).

### **IV. 6. 2. Cuadro Clínico de organismos infectados con el WSSV**

A partir de las 30 h.p.i. los camarones de los grupos experimentales G-15, G-30, G-45 y G-60, con evidente infección por WSSV, se distinguieron de sus respectivos grupos control por la presencia de cromatóforos expandidos, anténulas rojas y color café-rojizo del cuerpo o color canela (Figura 19), en ningún caso se observó la presencia de depósitos de calcio en la cutícula. Además se observó en los organismos afectados una conducta de aletargamiento y cese de la alimentación, así como pérdida de la postura normal y equilibrio (los organismos permanecían postrados sobre un costado del cuerpo y posteriormente morían).

A este mismo tiempo (30 h.p.i.), en el grupo experimental de salinidad cero (G-0) sólo se observó un caso aislado con las características de color café-rojizo en el cuerpo, urópodos y anténulas rojas, el resto de los organismos en su mayoría conservaron el músculo transparente normal, aunque las características de cese de alimentación, aletargamiento y pérdida del equilibrio fueron observadas previo a la muerte, al igual que ocurrió con el resto de los grupos experimentales.



**Figura 19.** Ejemplares de *L. vannamei* infectados con WSSV, el señalado por la flecha presenta las señales clínicas de estado avanzado de la infección viral, exhibe un color café-rojizo y pérdida del equilibrio, los dos restantes solo presentan el estómago vacío e inapetencia por el alimento.

#### IV.6.3. Tasa de mortalidad

En general, hasta antes de 20 h.p.i. se observaron camarones con apariencia normal y alimento en el estómago e intestino. Luego de 24 h.p.i. los organismos dejaron de alimentarse y no presentaban alimento en el sistema digestivo; posteriormente, a partir de 30 h.p.i. se empezaron a observar algunos organismos con urópodos y anténulas rojas y disminución de la actividad locomotora. Posteriormente, en el grupo experimental con salinidad cero (G-0) se presentó el primer caso de un organismo muerto después de transcurridas 31:29 h. p. i. con el inóculo viral. Consecutivamente, a partir de 36 h.p.i. y hasta el final del experimento (54:55 h), se empezaron a observar organismos muertos en todos los grupos experimentales (Tabla XIII).

**Tabla XIII.** Mortalidad observada en *L. vannamei* infectado con el WSSV.

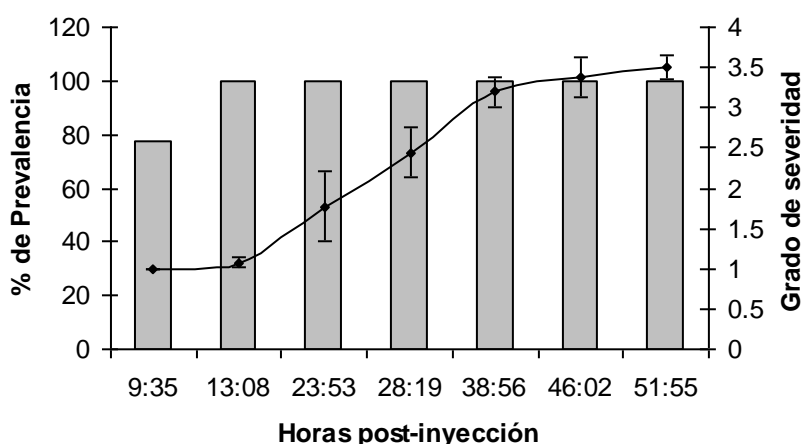
Gpo. Exp.	Tiempo post-inyección (horas:minutos)							
	0:16	9:35	13:08	23:53	28:19	38:56	46:02	51:55
G-0	0.00	0.00	0.00	0.00	2.56	16.53	16.37	11.17
G-15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	20.84	15.92	4.17
G-30	0.00	0.0	0.00	0.00	0.00	13.71	10.70	7.63
G-45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	14.30	18.57	2.56
G-60	0.00	6.6 *	0.00	0.00	0.00	23.33	13.33	-

\* Organismos muertos durante el proceso de ecdisis o muda.

#### IV.6.4. Patogénesis viral

Internamente los camarones positivos al WSSV presentaron células con núcleos hipertróficos basófilos-eosinófilos denominados cuerpos de inclusión característicos de la enfermedad de la mancha blanca, los cuales fueron observables mediante histopatología a partir de 9:35 h.p.i. Sin embargo, externamente los organismos no presentaron signos clínicos de infección anatómicos o conductuales. Asimismo, a las 9:35 h.p.i. en los distintos grupos experimentales se observaron diferentes porcentajes de prevalencia de infección al virus pero en ningún caso se observaron grados de severidad superiores a uno (GS=1) (Tabla XIII).

A partir de las 13:08 h.p.i. y durante el resto de tiempo que duro el bioensayo, se observaron prevalencias de infección del 100% en todos los organismos muestreados que incluían a los cinco grupos experimentales. Asimismo, se observó un incremento gradual en el grado de severidad a través del tiempo, el cual alcanzó un valor promedio de 3.5 a las 51:55 h.p.i. tiempo en el cual concluyó el experimento (Tabla XIII, Figura 20).



**Figura 20.** Promedio general de la prevalencia de infección (barras) y grado de severidad (línea) observado en el camarón *L. vannamei* infectado con WSSV por vía intramuscular.

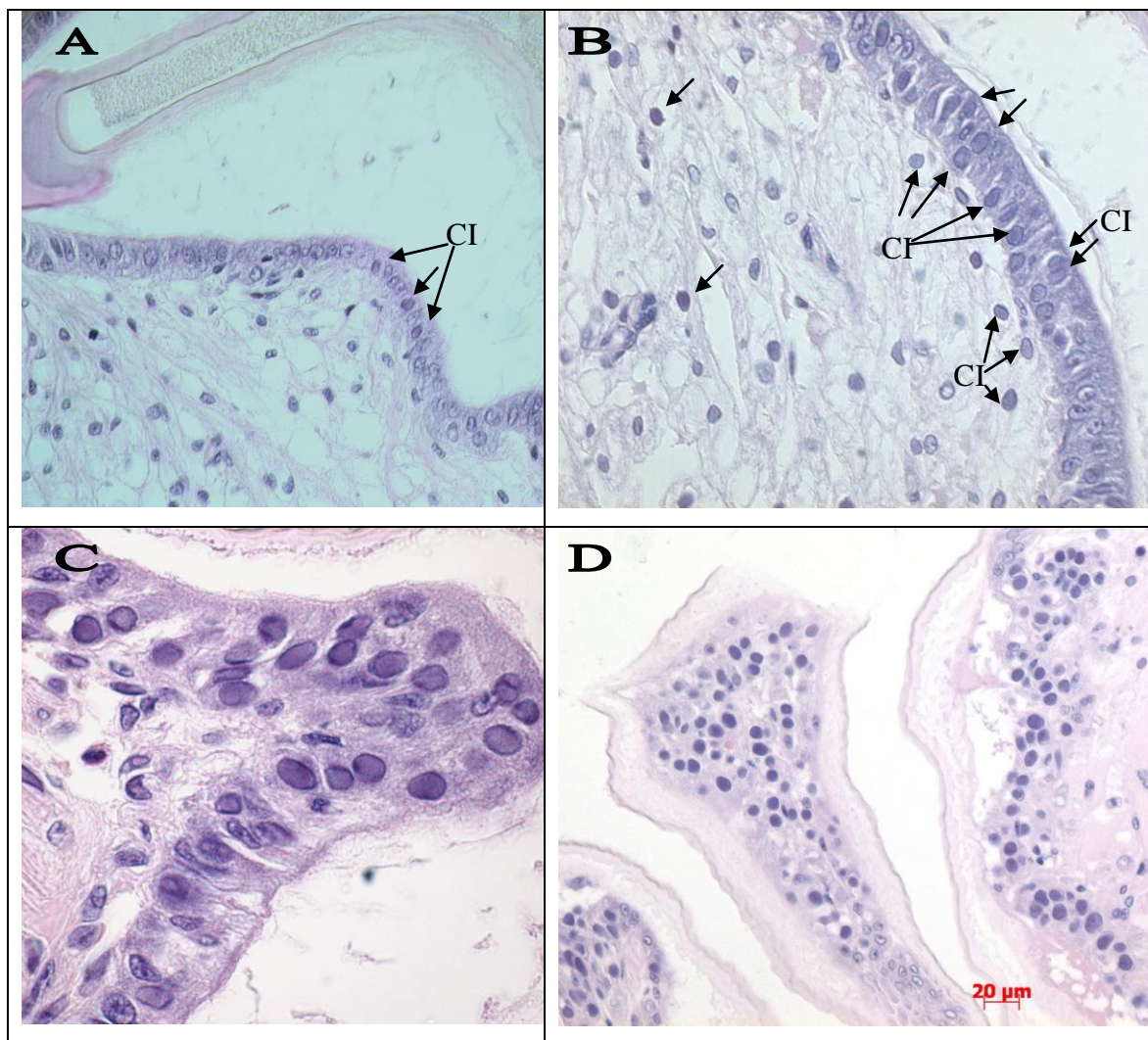
**Tabla XIV.** Grado de Severidad de *L. vannamei* infectado con el WSSV determinado por histopatología

Muestreo post-inyección	Gpo. Experimental	Hrs:min. Post-inyección	% de Prevalencia	G .S. (*)
1 <sup>er</sup> muestreo	G-0	0:18	0.00	0
“	G-15	0:13	0.00	0
“	G-30	0:17	0.00	0
“	G-45	0:16	0.00	0
“	G-60	0:17	0.00	0
		<b>0:16</b>	-	-
2 <sup>o</sup> muestreo	G-0	13:39	22.22	1
“	G-15	11:39	88.88	1
“	G-30	09:58	88.88	1
“	G-45	07:04	100.0	1
“	G-60	05:37	88.88	1
		<b>9:35</b>	<b>77.77</b>	<b>1</b>
3 <sup>er</sup> muestreo	G-0	17:20	100.0	1.02 (0.06)
“	G-15	15:10	100.0	1.13 (0.16)
“	G-30	13:43	100.0	1.04 (0.43)
“	G-45	09:50	100.0	1.03 (0.11)
“	G-60	09:38	100.0	1.18 (0.34)
		<b>13:08</b>	<b>100.0</b>	<b>1.04 (0.22)</b>
4 <sup>to</sup> muestreo	G-0	27:42	100.0	1.37 (0.41)
“	G-15	25:46	100.0	1.85 (0.45)
“	G-30	24:20	100.0	1.71 (0.57)
“	G-45	21:37	100.0	1.46 (0.36)
“	G-60	20:03	100.0	2.48 (0.32)
		<b>23:53</b>	<b>100.0</b>	<b>1.77 (0.42)</b>
5 <sup>to</sup> muestreo	G-0	31:29	100.0	2.21 (0.45)
“	G-15	29:47	100.0	2.27 (0.48)
“	G-30	29:35	100.0	2.85 (0.41)
“	G-45	26:15	100.0	2.20 (0.49)
“	G-60	24:31	100.0	2.71 (0.91)
		<b>28:19</b>	<b>100.0</b>	<b>2.44 (0.54)</b>
6 <sup>to</sup> muestreo	G-0	40:34	100.0	3.13 (0.16)
“	G-15	39:38	100.0	3.05 (0.50)
“	G-30	40:11	100.0	3.03 (0.35)
“	G-45	37:41	100.0	3.39 (0.48)
“	G-60	36:37	100.0	3.41 (0.11)
		<b>38:56</b>	<b>100.0</b>	<b>3.20 (0.32)</b>
7 <sup>mo</sup> muestreo	G-0	48:55	100.0	3.02 (0.13)
“	G-15	47:46	100.0	3.34 (0.32)
“	G-30	47:18	100.0	3.64 (0.37)
“	G-45	43:49	100.0	3.33 (0.16)
“	G-60	42:26	100.0	3.58 (0.11)
		<b>46:02</b>	<b>100.0</b>	<b>3.38 (0.22)</b>
8 <sup>vo</sup> muestreo	G-0	54:55	100.0	3.45 (0.31)
“	G-15	53:06	100.0	3.44 (0.32)
“	G-30	51:45	100.0	3.72 (0.11)
“	G-45	47:57	100.0	3.39 (0.51)
“	G-60	-	-	-
		<b>51:55</b>	<b>100.0</b>	<b>3.50 (0.31)</b>



G. S. = grado de severidad promedio (\*) el valor entre paréntesis corresponde a la desviación estándar.

Para mostrar la patogénesis viral durante el experimento se presentan los cambios observados en el epitelio estomacal producto de la infección con WSSV (Figura 21).

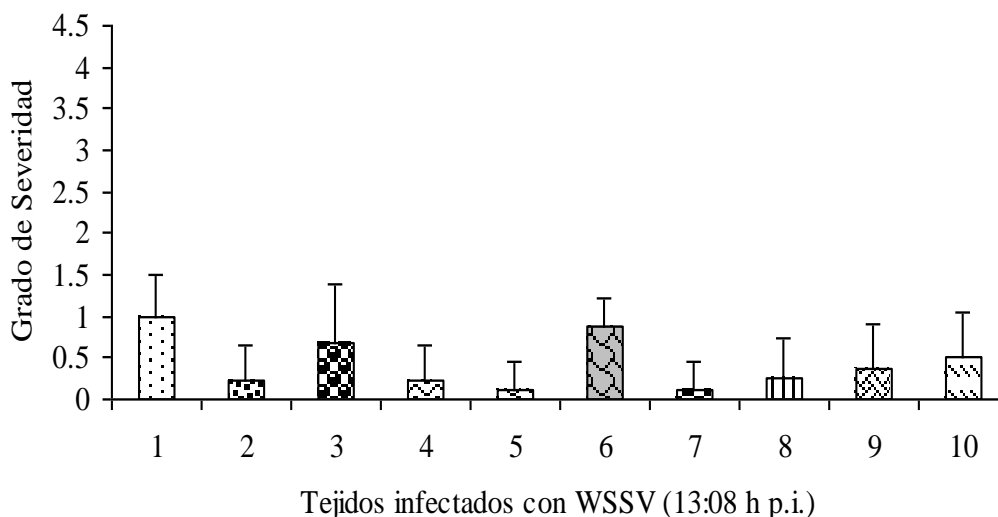


**Figura 21.** Comparación histológica del tejido epitelial estomacal con diferentes grados de severidad. **A)** Tejido epitelial ligeramente infectado (GS=1) donde se observan 3 cuerpos de inclusión (CI) señalados por flechas, corte 5 micras tinción H-E, aumento 100 X. **B)** Tejido epitelial estomacal y tejido conectivo con presencia moderada de CI del WSSV (GS=2), donde sobresalen C.I. característicos del WSSV, corte 5 micras tinción H-E, aumento 200 X. **C)** Tejido epitelial estomacal con presencia de numerosos CI del WSSV (GS= 3) corte 5 micras tinción H-E, aumento 630X. **D)** Región estomacal anterior cercana al esófago con múltiples CI (GS=4) corresponde a un estado avanzado de la infección, corte 5 micras tinción H-E, aumento 200 X.

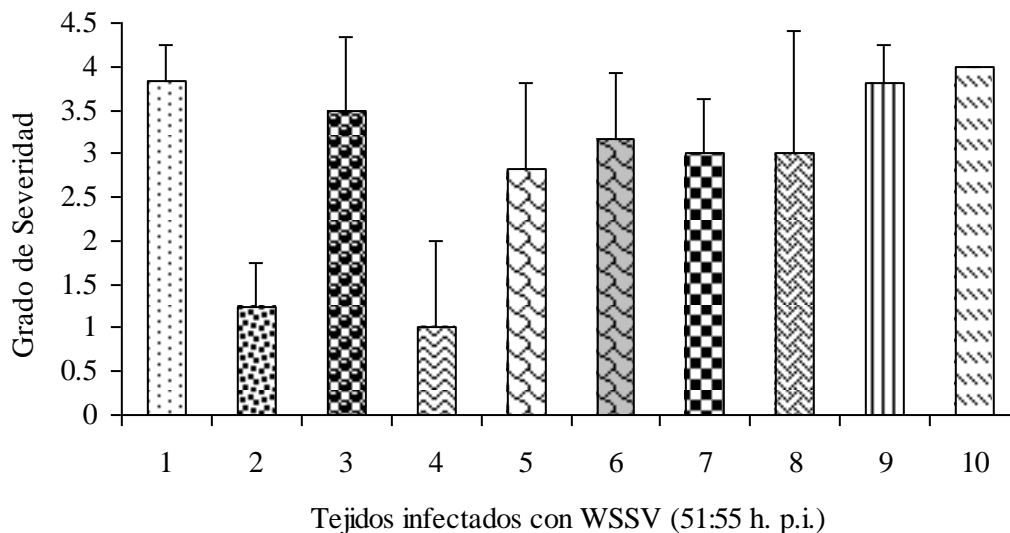
#### IV.6.5. Órganos afectados por WSSV

Los órganos y tejidos principalmente afectados por el WSSV en los cuales se observó una infección temprana con cuerpos de inclusión característicos fueron el tejido epitelial del estómago, el tejido epitelial tegumental y el tejido conectivo circundante al estómago. La Figura 22 presenta el grado de infección para los diferentes órganos y tejidos del camarón luego de 13:08 h.p.i. tiempo en el cual se logró una detección temprana mediante la técnica histológica.

Asimismo, luego de infecciones avanzadas (después de 36 h.p.i.) se observó una distribución generalizada del virus en la mayoría de los tejidos, el cual incluyó al órgano linfoide, tejido hematopoyético, epipodito (escafognatito) y tejido branquial. La Figura 23 presenta el grado de severidad observado en los organismos, previo a la muerte (infección avanzada) como se observa en el cuadro histopatológico de la Figura 21-D. Asimismo, se encontraron diferencias estadísticas en el grado de severidad observado entre los diferentes órganos y tejidos ( $F= 7.730539$ ;  $p<0.001$ ), de tal forma que se distinguen con una mayor infección el tejido el epitelial de la cámara gástrica, el tejido conectivo y el epitelio cuticular (Figuras 22 y 23).



**Figura 22.** Grados de severidad observados mediante histopatología en diferentes órganos y tejidos del camarón *L. vannamei* a las 13:08 h.p.i. con WSSV. □.- Epitelio estomacal, ▤.- Ganglios nerviosos, ▥.- Tejido conectivo, ▦.- Cordón Nervioso Ventral ▧.- Glándula antenal, ▨.- Epitelio tegumental, ▩.- Tejido hematopoyético, ▪.- Órgano linfoide, ▫.- Branquias, ▬.-Epipodito branquial.



**Figura 23.** Grados de severidad observados mediante histopatología en diferentes órganos y tejidos del camarón *L. vannamei* a 51:55 h. post-inyección con WSSV. ▣.- Epitelio estomacal ▤.- Ganglios nerviosos, ▥.- Tejido conectivo, ▦.- Cordón Nervioso Ventral, ▧.- Glándula antenal, ▨.- Epitelio tegumental, ▩.- Tejido hematopoyético, ▪.- Órgano linfoide, ▫.- Branquias, ▬-Epipodito branquial.

#### IV.6.6. Comparaciones estadísticas entre grupos experimentales

Al comparar el grado de infección entre los cinco grupos experimentales (G-0, G-15, G-30, G-45 y G-60), se encontró que existen diferencias estadísticas entre ellos ( $F= 4.747$ ,  $p= 0.0047$ ). Al realizarse las comparaciones múltiples mediante una prueba Tukey se observó que sólo los grupos experimentales G-0 y G-30 perteneciente a la salinidad de 0 y 30  $g L^{-1}$  respectivamente, presentaban diferencias estadísticas con respecto al resto de los grupos, asimismo, estos observaron el menor y mayor grado de severidad respectivamente (Tabla XV).

De forma similar, también se observaron diferencias estadísticas entre el grado de severidad de de los diferentes órganos y tejidos ( $F= 7.730539$ ;  $p<0.001$ ), de tal forma que se distinguen con una mayor infección al WSSV, el epitelio de cámara gástrica, el epitelio cuticular y el tejido conectivo.

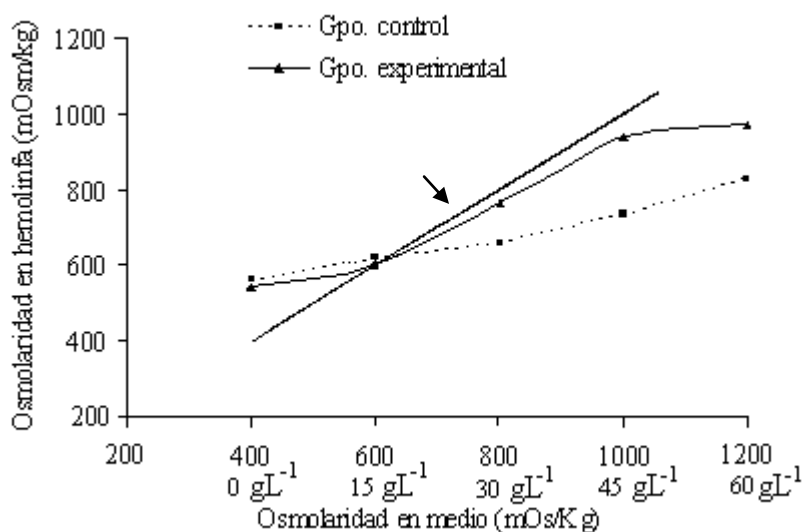
**Tabla XV.** Grado de severidad promedio observado mediante histopatología en *L. vannamei* infectado con el WSSV, comparación entre grupos.

Grupo experimental	Grado de severidad promedio	Comparación entre grupos *
G-0	2.17 (1.05)	a
G-15	2.29 (1.01)	ab
G-30	2.42 (1.16)	b
G-45	2.25 (1.11)	ab
G-60	2.39 (1.09)	ab

\* Grupos que comparten la misma letra, son iguales estadísticamente, ( $\pm$  desviación estándar)

#### IV.6.7. Efecto de la infección con WSSV en la osmorregulación del camarón *L. vannamei*.

Al compararse los valores de osmolaridad en la hemolinfa de los camarones, mediante un análisis de varianza multivariado, se observó que estadísticamente los grupos experimentales (inyectados con el virus) y los grupos control (inyectados con el placebo) fueron diferentes entre sí ( $F= 85.36$ ,  $p < 0.001$ ). De esta manera, al realizarse una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para observar entre que grupos se presentaban las diferencias, se encontró que las diferencias mas grandes respecto a los grupos control correspondieron a los grupos experimentales de 30, 45 y 60 g L<sup>-1</sup> de salinidad. En la Figura 21 se pueden observar los valores de osmolaridad entre ambos grupos experimentales (experimental y control), asimismo, sobresalen las diferencias entre los grupos G-30, G-45 y G-60 respecto de los tratamientos control. Además se incluye la línea isosmótica para resaltar como se afecta la capacidad de osmorregulación de los camarones infectados. En la Tabla XVI se pueden observar entre que grupos se presentan dichas diferencias.



**Figura 24.** Patrón de osmorregulación observado en camarones de los diferentes grupos experimentados. Se añade la línea isosmótica (flecha) a la gráfica para ilustrar el patrón de osmorregulación observado por los organismos.

**Tabla XVI.** Osmolaridad promedio ( $\pm$  desviación estándar) de hemolinfa en *L. vannamei* infectado con WSSV a diferentes salinidades y comparación entre grupos.

Grupo	Osmolaridad en hemolinfa (mOsm/kg)	Comparación entre grupos *
GC-0 (a)	555.90 ( $\pm$ 47.37)	ab
GC-15 (b)	613.62 ( $\pm$ 41.65)	abcfg
GC-30 (c)	660.12 ( $\pm$ 50.80)	bcdg
GC-45 (d)	736.42 ( $\pm$ 61.50)	cdeh
GC-60 (e)	830.00 ( $\pm$ 54.92)	deh
GE-0 (f)	542.43 ( $\pm$ 52.11)	abfg
GE-15 (g)	600.57 ( $\pm$ 36.67)	abcfg
GE-30 (h)	765.30 ( $\pm$ 79.72)	deh
GE-45 (i)	974.15 ( $\pm$ 155.87)	i
GE-60 (j)	1176.00 ( $\pm$ 300.38)	j

GC= grupo control, GE= Grupo experimental \* Grupos que comparten la misma letra, son estadísticamente iguales.

#### IV.6.8. Diagnóstico por PCR

En la Tabla XVII se resumen los resultados del diagnóstico mediante la PCR realizada tanto a grupos experimentales como a grupos control empleados en el bioensayo. En este

sentido los grupos control cumplieron su función dado que no fueron contaminados por los grupos experimentales.

**Tabla XVII.** Resultados del diagnóstico por PCR para el WSSV en el músculo del camarón *L. vannamei* utilizado en el bioensayo.

Grupo Control	Horas post-inyección	Resultado al WSSV
G-0, G-15, G-30, G-45, G-60	0:16	Negativo
G-0, G-15, G-30, G-45, G-60	51:55	Negativo
Grupo Experimental		
G-0, G-15, G-30, G-45, G-60	0:16	Negativo
G-0, G-15, G-30, G-45, G-60	9:35	Positivo

#### IV.6.9. Variables ambientales durante el bioensayo experimental

Las variables ambientales registradas durante la etapa previa al desarrollo experimental así como las observadas durante el experimento de infección correspondieron a las planteadas en el diseño experimental, de tal manera que se cumplió lo establecido previamente en cuanto a los tratamientos de salinidad. En tanto, la temperatura y oxígeno disuelto estuvieron dentro de los intervalos óptimos de la especie (Tabla XVIII).

**Tabla XVIII.** Variables ambientales observadas durante el bioensayo

Gpo Experimental	Salinidad g L <sup>-1</sup>	Oxígeno disuelto mg L <sup>-1</sup>	Temperatura °C	SDT g L <sup>-1</sup>
G-0	0.944 (0.103)	6.72 (0.520)	27.38 (0.850)	1.21 (0.127)
G-15	15.24 (0.365)	6.02 (0.604)	28.26 (0.585)	16.34 (0.358)
G-30	30.77 (0.890)	5.29 (0.932)	28.02 (0.729)	30.93 (0.910)
G-45	45.85 (0.410)	5.03 (0.492)	28.28 (0.985)	43.58 (0.344)
G-60	60.82 (0.392)	4.38 (0.909)	28.33 (1.566)	56.23 (0.631)

SDT= Sólidos Disueltos Totales

## V. DISCUSIÓN

### V.1. Discusión de resultados en granjas

#### V.1.1. Epibiontes en branquias en las granjas del municipio de Ensenada

La presencia de epibiontes en branquias tipo *Zoothamnium* es una condición relativamente común en los estanques de camarón de ambientes costeros (Lighner, 1996a; Brock y Lightner, 1990), los resultados observados en la granja 1 (única granja que operó con agua de mar en este estudio) confirman este hecho. Asimismo, varios estudios reportan a estos protozoos coloniales como epibiontes de crustáceos en ambiente de agua dulce (Schuwerack *et al.*, 2001; Edgerton *et al.*, 2002).

La mayoría de los autores reportan la presencia de estos epibiontes asociados con ambientes de elevada carga de materia orgánica y/o deficiente calidad del agua. En este sentido, las altas densidades de siembra, la presencia de materia orgánica y la tendencia hacia bajos niveles de oxígeno al final del periodo de cultivo fueron componentes que ayudarían a explicar los altos niveles de epibiontes encontrados en esta granja. Sin embargo, a partir de la información obtenida en este estudio se tomaron medidas de manejo inmediatas, encaminadas a mitigar los efectos dañinos de la carga epibiótica, lo que permitió tomar medidas de control de los epibiontes, entre ellas, se pueden mencionar el incremento en la tasa de recambio de agua y adición de carbonato de calcio como una medida para flocular la materia orgánica y facilitar su retiro del estanque, a la vez que se mantuvo el pH del estanque hacia valores ligeramente básicos (Avnimelech y Rivto, 2003)

Sin bien, los resultados en la producción y sobrevivencia (Tablas XI y XII) no parecen mostrar un efecto negativo directamente asociado a estos epibiontes, la presencia de áreas necróticas en el tejido branquial y melanosis; aunado a la obstrucción mecánica que ocasiona el epibionte en organismos con grado 3 y 4 de severidad, evidentemente tiene un efecto negativo en los camarones afectados, lo cual se puede observar en las imágenes de sección de resultados (Figura 3-B) y del Anexo I (Figura AI-1). No obstante, una evaluación detallada de este efecto podría realizarse mediante una comparación entre

camarones de estanques libres de epibiontes bajo las mismas condiciones de cultivo con organismos infestados, tal como se demostró en un estudio con poblaciones afectadas y otras libres de epibiontes (Schuwerack *et al.*, 2001).

En el citado estudio, se menciona que *Zoothamnium* y *Epistylis* causan daño significativo por la adhesión de sus pedúnculos al tejido branquial, ya que ocasionan cambios estructurales en las branquias del cangrejo de agua dulce (*Potamonautes warreni*) ocasionando inflamación, dilatación del tejido lamelar, formación de vacuolas e incremento en el espacio subcuticular en el epitelio. Además, cambios fisiológicos en los cangrejos infectados que involucra incrementos en el contenido de humedad corporal y reducida tasa de crecimiento; en comparación con organismos no infestados. También, se encontró un incremento en el consumo específico de oxígeno de cangrejos infestados de 31.29 micromoles de oxígeno por kilogramo por minuto comparado con 27.92 micromoles de oxígeno por kilogramo por minuto en cangrejos no infestados.

La infestación por *Leucotrix* sp. ocasiona un cambio de color en las branquias, esto es, debido principalmente a la presencia de pigmentos en los filamentos de la bacteria. Mayores grados de infestación inducen necrosis y cambios histológicos del tejido branquial, ocasionando que se afecte la actividad del sistema respiratorio de los camarones (Kampfer, 1997; Amrane y Prigent, 1998). Ocasionalmente las bacterias filamentosas constituyen un perfecto biofilm para la adhesión de otros microorganismos o materia orgánica y los filamentos son un obstáculo para la respiración normal del camarón (Kitatsuji *et al.*, 1996). Estas enfermedades bacterianas han sido asociadas con pobre calidad de agua (elevada materia orgánica), altas densidades de cultivo y un ineficiente manejo de los camarones (Lightner, 1996a).

En la granja 1, hacia la parte final del cultivo se observó un efecto de asfixia en los camarones por bajos niveles de oxígeno (Tabla VIII y Figura 18), además se pudo observar que los organismos principalmente afectados fueron camarones con branquias sucias con grado 3 o 4 de severidad, estos eventos se presentaron cuando los valores de oxígeno



disuelto se encontraban por debajo de  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  llegando a registrar valores de hasta  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$ . Asimismo, dada las condiciones de cultivo (elevada densidad poblacional) en esta granja hacia la parte final del cultivo, el oxígeno fue un factor limitante, dado que los registros observados especialmente por la mañana mantuvieron promedios por debajo de  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ , lo cual es un valor bajo para los estándares necesarios en la acuicultura (Boyd, 1990), recomendándose valores superiores a  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$  de oxígeno disuelto, especialmente en camarones afectados por epibiontes.

En la granja 2, la cual operó bajo un sistema cerrado de recirculación y con agua de baja salinidad de origen subterráneo, la prevalencia y severidad por epibiontes fue muy reducida. Así, esta granja presentó los valores más bajos de infestación por epibiontes en branquias. Este hecho puede tener relación con lo mencionado por Jory (2004) quien señala que una de las ventajas del cultivo en ambientes aislados de la costa (y con dispositivos para el control de patógenos vía agua, tierra y aire), son una barrera contra los agentes patógenos, entre ellos la carga epibiótica adherida a las branquias de los camarones, comúnmente trasladados del ambiente de laboratorio de producción larvaria a las instalaciones en granja. Sin embargo, el hecho de que el lugar de siembra sea con agua de pozo a baja salinidad, ofrece un obstáculo adicional, difícil de traspasar, especialmente por organismos epibiontes quienes prácticamente se enfrentan al nuevo ambiente sin protección, situación que tal vez no sería la misma con organismos endoparásitos dado que el mismo camarón proporciona un ambiente de resguardo ofreciendo así mayores posibilidades de sobrevivencia en el nuevo ambiente.

Lo anterior, se basa en la ausencia de bacterias filamentosas y protozoos peritricos, en el cultivo de la granja 2, mismos que fueron observados en las postlarvas de transporte. Así al analizar una muestra de postlarva para determinar su condición, se observó la presencia de bacterias filamentosas en la superficie corporal de las postlarvas. Asimismo, se observaron protozoos ciliados peritricos adheridos a restos de alimento dentro de la bolsa de transporte (observaciones puntuales no presentadas en resultados). Lo anterior sugiere que tal vez

dichos microorganismos no encontraron en el nuevo ambiente de cultivo un medio propicio para su desarrollo, ya que no fueron observados durante el transcurso del cultivo.

Sin embargo, un hecho que llamó la atención fue la presencia de un rotífero, posiblemente del género *Philodina* el cual estuvo adherido en la región del cefalotórax y ocasionalmente a la cavidad branquial de los camarones; asimismo, se encontraron asociados a los camarones cultivados en este ambiente diatomeas tipo *Nitzschia*; donde dichas diatomeas no llegaron a representar un problema de obstrucción branquial en los camarones. Aún, cuando se les encontró ocasionalmente sobre el tejido branquial, pero sobretodo en la región ventral de entre los pliegues de los apéndices.

Si bien, no se encontraron niveles altos de epibiontes en los camarones de la granja 2 la presencia de estos grupos de organismos (Diatomeas, rotíferos) llama la atención, ya que de no encontrarse los epibiontes comúnmente asociados al camarón, al parecer existen en el nuevo ambiente, organismos capaces de ocupar los nichos que en condiciones normales de cultivo de ambiente marino seguramente serían ocupados por los epibiontes conocidos en los ambientes costeros, pudiendo tener un efecto negativo similar al menos de obstrucción mecánica sobre la superficie branquial.

Los rotíferos han sido observados en la superficie externa incluyendo la cavidad branquial de langostinos en el Noroeste de Europa y E.U.A. (Krucinska y Simon, 1968; Lahser, 1975; May, 1989) y Australia (Evans, *et al.*, 1992). Sin embargo, aún cuando comúnmente son encontrados en la cámara branquial es poco lo que se sabe a cerca de la naturaleza de la relación entre langostinos y rotíferos.

Por último, es importante mencionar que para esta granja no se encontrara los simbioses comunes encontrados en el cultivo del camarón, en cambio, sí aparecieron grupos reportados en langostinos. Si bien las diatomeas han sido reportadas para cultivos marinos como epibiontes en las branquias de camarones (Lightner, 1996a), también se reportan en ambientes de agua dulce, asociadas a los langostinos (Evans *et al.*, 1992). Sin embargo, no

se tienen reportes de infestaciones con rotíferos en camarones de ambiente marino. Es este sentido, se resalta el hecho de que existe una probabilidad elevada de que el camarón marino cultivado en agua dulce comparta simbioses, parásitos o patógenos con las poblaciones de langostinos y viceversa, sobretodo en ambientes donde existen poblaciones de langostinos y la posibilidad de coexistencia sea alta favorecida por las actividades acuícolas como ocurre en el Valle de Mexicali.

### **V.1.2 Epibiontes en branquias en las granjas del municipio de Mexicali**

En relación a los epibiontes encontrados en los camarones de las granjas del municipio de Mexicali, se puede decir que estos alcanzaron una prevalencia moderada en las poblaciones de camarón cultivado en la zona y presentaron un significativo grado de severidad (Figura 10). Sin embargo, los productores no reportaron eventos de mortalidad inusual en los estanques. No obstante, los valores de supervivencia al final del periodo de cultivo revelan importantes bajas en la población, lo cual habla de una considerable pérdida de organismos, misma que puede tener múltiples causas, entre ellas: la depredación, canibalismo, escape del estanque, robo, ambiente inadecuado o presencia de epibiontes asociado con bajas de oxígeno. Una comparación de las branquias de camarones de la granja 1 en el municipio de Ensenada y las granjas del municipio de Mexicali indica que la granja de Ensenada alcanzó niveles más elevados de infestación por epibiontes. Sin embargo, es posible que las condiciones específicas del ambiente y/o manejo pudieran ocasionar las diferencias observadas en sobrevivencia entre ambos lugares.

La presencia de algas coloniales Euglenoides tipo *Colasium* sobre la superficie de diversos crustáceos componentes del zooplancton (cladóceros y copépodos) ha sido documentada como una relación negativa hacia las especies huéspedes (Green, 1974). Sin embargo, no se encontró en la revisión bibliográfica reportes de algas coloniales Euglenoides tipo *Colasium* en las branquias de camarones cultivados en ambientes marinos, ni ambientes dulceacuícolas. Llama la atención la presencia de este tipo de algas en las branquias del camarón y no en otras áreas del cuerpo del crustáceo, lo cual puede suponer cierto grado de especialización por parte del epibiontes; sin embargo, a pesar de encontrarse de forma

consistente durante los primeros 45 días de cultivo, luego de este periodo no se volvieron a observar, esto tal vez puede estar asociado con el fenómeno de sucesión biológica que ocurre naturalmente en los estanques (Walker, 2005). O bien, su presencia se haya debido a una condición ambiental específica de ese año en particular (2003), dado que estuvo presente en todas las granjas estudiadas y en el mismo periodo (algunas granjas se encuentran separadas entre sí por más de 40 km pero en esencia comparten la misma fuente de agua). Sin embargo, en el estudio realizado durante el 2006 las algas coloniales tipo *Colasium* no se observaron como epibiontes del camarón.

La presencia de epibiontes en la granjas del Valle de Mexicali no es de extrañar, ya que en dicha zona existen comunidades de peces y crustáceos en la red de canales que sirven de reservorios naturales a comunidades de protozoos epicomensales tipo *Epistylis* y bacterias filamentosas tipo *Leucothrix* los cuales resultan frecuentes en ambientes acuáticos permanentes (Johnson, 1977). Se destaca la presencia de ambos epibiontes pero para estos casos en particular no se observó un alto riesgo por su presencia, dado que sólo en un caso aislado un organismo presentó un grado de severidad de 3 y en general estos permanecieron en grados de severidad moderado. Estos protozoarios ciliados forman colonias de tres a treinta individuos y se encuentran asociados a los apéndices locomotores, cutícula y cámara branquial de camarones. Asimismo, se les encuentra como fauna normal en los estanques de cultivo, pero al momento de incrementarse su número, especialmente por exceso de materia orgánica en el estanque o dificultad de los camarones para mudar, pueden convertirse en organismos dañinos, obstaculizando el intercambio gaseoso en las ramas branquiales y pudiendo provocar asfixia (Couch, 1983; Lightner, 1985, Johnson, 1977), principalmente durante la noche o la madrugada cuando puedan existir bajos niveles de oxígeno en el estanque. Sin embargo, es muy probable que las prácticas de manejo implementadas por la mayoría de los productores en el municipio de Mexicali ayuden a mantener niveles adecuados de oxígeno, dado que la mayoría de las granjas emplean equipos de aireación para una mejor condición de sus estanques.

### **V.1.3. Lesiones observadas en branquias**

En la granja 1 y granjas del municipio de Mexicali se observó la presencia de epibiontes con necrosis y melanosis asociada, sobretodo hacia la parte final del cultivo. La cual ha sido reportada como una condición presente en estanques con exceso de materia orgánica y bajas de oxígeno (Lightner, 1996a; Couch, 1983). Asimismo, la presencia de melanosis y necrosis branquial es un ejemplo del daño que puede presentarse en los camarones afectados, en cuyo caso, el tejido afectado es una estructura de vital importancia en la fisiología del crustáceo, básica en los procesos respiración y osmorregulación. El efecto de obstrucción mecánica y la presencia de necrosis en este tejido podría ocasionar atrofia y distrofia de sus funciones, sin embargo, hacen falta estudios específicos a ese nivel orientados a evaluar el efecto de dichos epibiontes en el cultivo del camarón tanto en ambientes de agua marina como de baja salinidad.

El registro de bacterias filamentosas tipo *Leucothrix* prácticamente durante todo el ciclo de cultivo, coincide con los informes que sobre el tema se obtienen de una granja semi-intensiva de camarón en ambientes marinos. La obstrucción por *Leucothrix mucor* no causa ningún cambio estructural en la cutícula y no invade los tejidos internos señala Lightner (1996a). Lesiones branquiales como melanosis y necrosis pueden afectar los procesos metabólicos como la respiración y osmorregulación, como lo señalaron Lignot *et al.* (2000), quienes reportan que la capacidad osmorreguladora puede ser afectada por variaciones que incluyen alteraciones en la estructura y ultraestructura de los órganos branquial y excretorio.

### **V.1.4. Análisis de hepatopáncreas e intestino**

Los análisis en fresco de estos dos tejidos no reveló la presencia de agentes patógenos, parásitos o simbiontes. Sin embargo, para los camarones de la granja 2 en el municipio de Ensenada, se observaron los valores más altos en deformidad de los túbulos del hepatopáncreas y carencia de reservas lipídicas, esta condición posteriormente estuvo asociada a la presencia de problemas bacterianos crónicos corroborados por análisis histopatológico (sección V.2.2). Para el resto de las granjas estudiadas no se observaron en

el hepatopáncreas signos indicativos de alguna enfermedad, como la presencia de células descamadas o “bolitas blancas” indicativo enteritis hemocítica y/o cuerpos de oclusión poliédricos presuntivos de problemas virales como el BP (*Baculovirus penaei*). Asimismo, tanto en la revisión del hepatopáncreas como del intestino, ambos análisis fueron complementarios para dar una idea del estado nutricional de los organismos. En este sentido, sólo se detectaron anomalías en el contenido de vacuolas lipídicas y deformidad de los túbulos en organismos de la granja 2 por lo ya comentado; en cambio en el resto de las granjas estudiadas no se detectaron deficiencias nutricionales a juzgar por la forma de los túmulos y reservas de gotas lipídicas.

## **V.2. Análisis histopatológicos**

### **V.2.1. IHHNV**

Se detectaron lesiones celulares asociadas a la presencia de IHHNV, en camarones de todas las granjas estudiadas. A pesar de ser un aspecto bien documentado en la literatura en ninguno de los casos se encontraron signos externos característicos del síndrome del róstrum deforme (RDS por sus siglas en inglés), asociado a la presencia de este virus, lo cual llama la atención dado que en ambientes de cultivo en agua marina son frecuentes los camarones con este síndrome (Bell y Lightner, 1984; Kalagayan *et al.*, 1991; Primavera y Quintio, 2000). Lo anterior, es probable que se deba a que el ambiente de baja salinidad impone algún tipo de selección inducida, que ocasiona que organismos susceptibles (como lo pueden ser postlarvas positivas al IHHNV) no prosperen en este ambiente en la misma medida que organismos libres del virus y por ello no se hayan observado organismos con las características del síndrome. En este sentido Lotz (1997), menciona que prácticamente todos los estadios de desarrollo pueden desarrollar el virus, pero que organismos de menor talla (1-5 g) son más susceptibles a sucumbir ante la infección que subadultos (14g).

Por otro lado, no se observó una clara tendencia de infecciones en progreso a través del cultivo caracterizado por un aumento en el número de casos positivos a los virus, o bien, un aumento en los grados de severidad conforme se desarrollaba el cultivo en los estanques. Lo anterior, es posiblemente se deba a que la infección en organismos sub-adultos (4.0 a

21.0 g), por IHNV es asintomática, es decir, han pasado a la fase crónica de la enfermedad, donde la capacidad fisiológica permite la tolerancia a la infección viral, lo que significa que se manifiesta en un bajo, pero detectable grado de severidad a través de un equilibrio entre el organismo y el virus (Unzueta-Bustamante, 2001).

Unzueta-Bustamante (2001) encontró porcentajes de prevalencia al IHNV en poblaciones de *L. vannamei* de cultivo y laboratorio del 67% en postlarvas 35 % en juveniles y 84.84% en reproductores. En nuestro trabajo los porcentajes de prevalencia encontrados son inferiores a los reportados por el autor, en tal caso, existe cierta similitud con la prevalencia de infección encontrada en juveniles. Lo anterior puede tener su explicación en la serie de medidas sanitarias que se han venido tomando desde los estudios citados hasta hoy día, actualmente, son frecuentes las prácticas de eliminación de reproductores que den resultados positivos a los virus, además los análisis se realizan al total de la población y hace 5 años los análisis comúnmente se realizaban a un lote de los organismos sin incluir a la totalidad de la población de candidatos a reproductores, lo cual ocasiona que se tenga un control más estricto de la calidad de los reproductores y por ello la prevalencia de infección sea menor a la existente hace 8 años en el estudio antes citado.

### **V.2.2. Bacteriosis**

La presencia de necrosis y melanosis branquial en camarones de la granja 2 no estuvo asociada a epibiontes como ocurrió en el resto de las granjas (dado que en esta granja los niveles de infestación por epibiontes fueron muy bajos). Sin embargo, el cuadro de bacteriosis incluyó necrosis, melanosis, atrofia y encapsulación del hepatopáncreas y la glándula antenal. Los daños observados mediante histopatología suponen un efecto en el detrimento de la salud de los camarones afectados, lo cual sin duda pudo estar asociado a la muerte de los organismos, resultando en una baja supervivencia la final del cultivo.

Es bien sabido que la presencia de problemas bacterianos puede tener múltiples causas dentro del estanque. Partiendo del hecho de que no se observaron cuadros de bacteriosis aguda, muy probablemente el origen de esta tuvo que ver con condiciones inadecuadas de

cultivo o factores estresantes permanentes, los cuales inmuno-suprimieron a los camarones y ocasionaron que se desarrollaran cuadros de bacteriosis con un posible efecto en la sobrevivencia durante el periodo de cultivo. Aguirre-Guzmán y Ascencio-Valle (2000) han descrito problemas similares en camarones y los han clasificado como una enfermedad bacteriana crónica sistémica, las cuales están asociadas con agua de pobre calidad o con otras enfermedades.

Generalmente, la bacteriosis está asociada a otros problemas y en forma general es válido decir que en cualquier camarón muerto o moribundo se pueden observar bacterias, sin ser estas necesariamente las que provocaran la muerte. Por ejemplo, en algunos casos la bacteria puede ser secundaria, relacionada a pobres condiciones ambientales y que no tiene efecto real sobre la incidencia de mortalidad, o bien puede estar enmascarada o actuar en conjunto con otros patógenos y es difícil señalar con precisión el grado de efecto correspondiente a cada uno. El caso observado en la granja 2 ilustra muy bien este hecho como se verá más adelante al abordar este aspecto.

### **V.2.3. Inclusiones en los túbulos del hepatopáncreas**

Las inclusiones encontradas en el epitelio de los túbulos del hepatopáncreas de camarones de la granja 2 inicialmente fueron asociadas a algunos estadios de desarrollo de haplosporidios, ya que algunas formas pueden tener cierta similitud con los cuadros histológicos observados en la Figura 12 (sección IV.2.1.3.), especialmente cuando las inclusiones se encuentran en lo que podría ser una fase de desarrollo temprana de haplosporidios. Sin embargo, observaciones a detalle de la estructura de las inclusiones revela que las esferas contenidas en el cuerpo de inclusión, no presentan núcleo como lo han señalado los trabajos de Dykova *et al.* (1989); Nunan *et al.* (2007) inclusive ambos autores a pesar de haber encontrado en sus trabajos características más consistentes en la morfología de haplosporidios mencionan lo difícil que resulta llegar a una clasificación filogenética.



Existen pocos casos documentados de infecciones por parásitos tipo haplosporidios en camarones, y por ello resulta más difícil comparar nuestros hallazgos con los trabajos relacionados con el tema. De tal manera que hacen falta mayores estudios que describan mejor los estadios de desarrollo y su apariencia en los tejidos afectados. Nunan *et al.* (2007) reportan un caso de haplosporidiosis en camarón *L. vannamei* cultivado en Belice, donde los autores realizan la descripción histopatológica de la enfermedad y encuentran muchas similitudes con el trabajo de Dyková *et al.* (1988), sugiriendo que podría tratarse del mismo patógeno. En ambos casos no se pudo dar un seguimiento sistemático de los estanques afectados, perdiéndose con ello la posibilidad de estudios epizooticos. Por último, existe un registro de un sólo caso positivo en camarones silvestres del golfo de México donde se reporta haplosporidiosis en *Farfantepenaeus duorarun* (Chávez-Sánchez *et al.*, 2002) y al igual que los trabajos existentes reporta una severa infección por el parásito.

En nuestros hallazgos las inclusiones observadas en camarones de la granja 2 no presentaron reacciones hemocitarias ni se observó atrofia del tejido debido a su presencia. En este sentido, la prevalencia de las inclusiones encontradas y su morfología observada a detalle sugieren que no se trata de un caso aislado y que probablemente se deban a un agente extraño al camarón, sin embargo, serán necesarios mayores estudios para poder llegar a su identificación y en todo caso conocer como afectan al camarón de cultivo.

#### **V.2.4. Efectos de los diferentes ambientes de cultivo en la carga parasitaria del camarón**

Al comparar la carga parasitaria entre las distintas granjas estudiadas a saber por los porcentajes de prevalencia y grados de severidad observados, claramente se observa que el cultivo en agua de mar alcanzó los valores más altos de carga parasitaria entre las granjas de las zonas estudiadas. Así mismo, la granja que presentó la menor carga epibiótica observada fue la granja 2 ubicada en el municipio de Ensenada, Valle de Maneadero la cual utilizó agua de origen subterráneo para el cultivo del camarón. Un aspecto importante de comparación es el hecho de que ambos cultivos se realizaron bajo invernadero en estanques de plástico. También, ambos cultivos presentaron el mayor y menor porcentaje de

sobrevivencia 90 y 10% respectivamente. En este sentido la carga epibiótica tan alta del primero se explica por la densidad de cultivo tan elevada en los estanques ( $250 \text{ cam/m}^2$ ) de donde derivan altas tasas de alimentación, y proporcional cantidad de excretas y desechos metabólicos; aunado a una tendencia a bajos niveles de oxígeno disuelto (Figura 17).

Se sabe que la cercanía entre organismos provoca estrés y favorecería el contagio de epibiontes entre camarones (Lightner, 1996a). Ahora bien, la granja 2 que operó con agua de pozo donde prácticamente este ambiente se encuentra libre de carga biótica no presentó elevadas cantidades de epibiontes, sin embargo, tampoco presentó altas poblaciones de camarón, lo anterior puede ser explicado desde el punto de vista de la deficiencia o exceso de algún componente en el agua que provocó que tanto el huésped como los posibles epibiontes hayan sido afectados de la misma manera. Los análisis iónicos de potasio en el agua del Valle de Mexicali son cerca de tres veces mayores que los existentes en el agua de pozo de la granja 2, así los resultados de calidad del agua apuntan a que el potasio pudiera ser una limitante en el cultivo del camarón ya que este se ha reportado como un elemento iónico indispensable en el cultivo del camarón en ambiente de agua dulce (Davis *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2007).

Llama la atención el hecho de que en todas las granjas se hayan encontrado epibiontes asociados al camarón lo cual lleva a la reflexión de que siempre se debe de estar alerta a los posibles interacciones entre los microorganismos del estanque y el posible efecto sobre los organismos de cultivo.

Las poblaciones bacterianas fueron otros microorganismos asociados al cultivo del camarón y sólo en una de las granjas (2) se presentaron con cuadros patológicos presuntamente asociados con la muerte de organismos (90 % al final del periodo de cultivo). El resto de las granjas también presentaron pérdidas por mortalidad, especialmente las granjas del Valle de Mexicali donde las sobrevivencias al final del cultivo fueron del 36, 45, 51 74 al 76 % (granja 3, granja 4, granja 5, granja 6 y la Granja 7, respectivamente) lo cual nos da un idea de las pérdidas tan significativas que existen por mortalidad. Las

sobrevivencias registradas en cultivos comerciales de diferentes especies de peneidos, se consideran aceptables por arriba de 60 %, (Clifford 1994; Ochoa, 1994). Así, tal parece que dichos resultados en su mayoría se podrían deber en buena parte a situaciones de prácticas de manejo inadecuadas (especialmente en las granjas 3, 4 y 5), donde con la debida atención sería posible minimizarlas. Lo anterior se basa en los resultados de sobrevivencia observados por las granjas 6 y 7, las cuales presentan valores muy cercanos de sobrevivencia entre ellas; además, ambas, fueron operadas por el mismo acuicultor, el cual cuenta con experiencia en el manejo de granjas en ambiente marino y al menos 5 años de experiencia en el cultivo del camarón en agua dulce. Sin embargo, una sobrevivencia del 75 % aún cuando se pueda considerar aceptable, significa un porcentaje del 25% de la población que no logró sobrevivir hasta el final del cultivo y en cuyo caso la presencia de epibiontes encontrados en las branquias pudo haber influenciado tales resultados.

Por otra parte, la presencia de cuadros histopatológicos asociados al IHHNV se encontró tanto en ambientes de agua marina como dulce, sin encontrarse una tendencia clara hacia mayor o menor prevalencia en uno u otro ambiente. Asimismo, no se encontraron efectos asociados a mortalidad en los organismos por presencia de este agente en ninguno de los ambientes estudiados.

Respecto a la salinidad de los ambientes de cultivo y su relación con la carga parasitaria del camarón sugieren una influencia directa ya que como se mencionó la carga epibiótica en las granjas del municipio de Ensenada la cual fue diferente de la observada en los estanques de la granjas del municipio de Mexicali. En el primero esta fue similar a los reportes típicos de granjas de ambiente marino que reportan a bacterias filamentosas *Leucothrix* sp. y protozoos ciliados coloniales peritricos *Zoothamnium* sp. con la excepción de la ausencia de gregarinas en el intestino, muy comunes en los ambientes de cultivo marinos. En cambio, los epibiontes encontrados en las granjas de Mexicali fueron bacterias filamentosas *Leucothrix* sp., protozoos ciliados coloniales peritricos *Epistylis* sp. (también comúnmente reportados en ambientes marinos) y un tipo de alga colonial Euglenoide reportada en ambientes de agua dulce como epibiontes del zooplanton. Sin embargo, al comparar la

carga epibiótica de la granja 2, no se encontró la presencia de bacterias filamentosas ni protozoos ciliados coloniales, en cambio se observó la presencia puntual de diatomeas tipo *Nitzsichia* y rotíferos tipo *Philodina* presentes en la cavidad branquial así como superficie ventral, específicamente entre los periópodos de los camarones.

#### **V.2.4.1.Mortalidad asociada a la presencia de deficiencias de potasio**

Se ha propuesto que el potasio es uno de los iones necesarios para el cultivo del camarón en agua de baja salinidad (Davis *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2007) Así mismo, Rahman *et al.* (2005) reportan que el calcio, magnesio y potasio son los tres iones mas importantes que determinan la sobrevivencia y crecimiento del camarón *P. monodon* en agua salobre continental. El estudio del perfil iónico del agua entre ambos lugares reveló que el agua de la granja 2 contiene cerca de tres veces menos potasio que el agua empleada en las granjas del municipio de Mexicali. Además, los niveles de calcio y magnesio en el agua de la granja 2 fueron el doble a los observados en el agua de las granjas del municipio de Mexicali, lo que descarta deficiencias por estos componentes. Lo anterior apunta al hecho de que la deficiencia de potasio pudiera provocar en los organismos diversos trastornos los cuales pueden incluir desde problemas en la osmorregulación hasta presencia de estrés en la manipulación, por cambios en temperaturas y bajas de oxígeno. En este sentido, es común observar camarones letárgicos y acalambrados en las orillas del estanque luego de manipularlos. El estrés esta caracterizado por musculatura blanca y rigidez del abdomen y posiblemente la muerte. Así mismo, Pillard *et al.* (2002), argumentan que la falta de potasio puede resultar en hiperpolarización del potencial de membrana celular y parálisis de los músculos.

En apoyo a esto, la salinidad del agua subterránea difiere en la composición específica de iones entre localidades (Forsberg y Neill 1997). Así por ejemplo, según lo reportan Forsberg *et al.* (1996) el agua de pozos en Texas, USA contiene exceso de calcio y sulfato, pero es deficiente en potasio. Fielder *et al.* (2001) señala que estas diferencias en concentración iónica del agua afectan la sobrevivencia y crecimiento de especies de peces y de camarones.

La aparente deficiencia de potasio es solo un aspecto identificado en los análisis presentados en la Tabla IX de la sección de resultados. Sin embargo, a fin de validar o rechazar nuestras sospechas será necesaria la realización de bioensayos específicos orientados a resolver esta duda.

### **V.3. Bioensayo de infectología con WSSV**

#### **V.3.1 Desarrollo de la infección viral por inyección**

El método de infección utilizado para reproducir la enfermedad de la mancha blanca fue eficiente ya que se obtuvo el 100% de las infecciones inducidas, esta forma de infección experimental tiene la ventaja de dosificar muy bien las cantidades de inóculo utilizadas, lo que minimiza las variaciones debido a diferencias en el inóculo viral cuando se utilizan métodos como el uso de sondas o infecciones vía oral. Así, se obtuvieron infecciones positivas a las 9:35 h.p.i., en cambio, para infecciones vía oral las lesiones histopatológicas características de mancha blanca han sido observadas hasta a las 36 h.p.i. (Sonnenholzner *et al.*, 2002).

Sobresale la prevalencia de infección mostrada por el grupo experimental G-0 perteneciente a la salinidad más baja experimentada con un valor de  $0.944 \text{ g L}^{-1}$  de salinidad ( $\pm 0.103$ ), el cual presentó una prevalencia de infección del 22.2 % mientras que el resto de los grupos experimentales observaron prevalencias del 88.8 % (G-15, G30 y G-60) y 100 % (G-45). Lo anterior, no resultó un hecho aislado ya que en general en este mismo tratamiento se observó durante el desarrollo del bioensayo la menor intensidad de infección (GS) respecto al resto de los tratamientos.

Este trabajo difiere de los resultados obtenidos por Lotz *et al.* (2005), quienes diseñaron un experimento para determinar la susceptibilidad de *L. vannamei* asociada a cambios en la salinidad. El estudio evaluó el efecto de la salinidad en un lote de camarones con infección crónica del Virus Síndrome de Taura contra un lote de organismos libres de infección, en ambos lotes se evaluó la respuesta a bajas salinidades. El estudio comparó la sobrevivencia mediante la CL50 (Concentración Letal 50 = salinidad en la cual el 50 % de la población

muere). Encontrándose que la población sana presentó un valor de  $3.06 \text{ g L}^{-1}$  para organismos libres de TSV y de  $6.65 \text{ g L}^{-1}$  para organismos infectados con TSV. Sin embargo, los análisis histopatológicos de los organismos con TSV moribundos o recién muertos no presentaron señales de haber desarrollado el estado agudo de la enfermedad. Los autores concluyen que camarones con TSV crónico no son capaces de soportar una caída drástica de la salinidad en la misma magnitud que una población libre de TSV. Asimismo, indican que el ambiente de agua dulce representa un serio desafío tanto para organismos sanos como organismos con infecciones latentes de TSV.

Experimentos con el camarón *Penaeus monodon*, considerado un buen osmorregulador al igual que *L. vannamei*, reveló que al ser infectado con WSSV y evaluar su respuesta en diferentes ambientes salinos predispuso a los camarones hacia una baja en los mecanismos de defensa y debilitamiento general del estado fisiológico evaluado a través de conteo total de hemocitos (CTH), células hialinas, actividad de la fenoloxidasa, actividad de superóxido dismutasa y actividad fagocítica (Wang y Chen, 2006). Los autores encontraron que camarones expuestos a los niveles más bajos de salinidad con respecto a salinidades cercanas al punto isosmótico, presentaron una reducción en los mecanismos de defensa y disminuyeron su resistencia contra las infecciones bacterianas.

Liu *et al.* (2006), al realizar un cambio agudo de salinidad de  $22$  a  $14 \text{ g L}^{-1}$  (en una hora) en *Fennorepenaeus chinensis* infectado con WSSV, observaron un incremento en el CTH y actividad de profenol oxidasa (PO), después de 6 h luego del cambio agudo de salinidad. Sin embargo, estos valores disminuyeron de las 6 a 24 horas. Se ha reportado en crustáceos que una baja concentración en el número de hemocitos se correlaciona con una mayor susceptibilidad a los patógenos (Persson *et al.*, 1987; Le Moullac *et al.*, 1998). De igual forma, la resistencia de camarones a la enfermedad en ambientes de baja salinidad es mas baja que los que permanecen en salinidades normales (cambios en el CTH y PO soportan este hecho). Teniendo como resultado que los camarones pueden ser más susceptibles a la infección por WSSV luego de cambios en la salinidad (Liu *et al.*, 2006). Sin embargo, a diferencia de todo esto, en nuestro experimento el desarrollo de la infección no fue el

mismo para todos los grupos experimentales inyectados con el virus y contradictoriamente señalan un menor desarrollo de la infección en bajas salinidades; en cambio, lo inverso se observa hacia las salinidades de 30, 45 y 60 g L<sup>-1</sup> (G-30, G-45 y G-60 respectivamente). Lo anterior es posible que tenga explicación por las tallas empleadas en el bioensayo ya que éste se realizó con organismos juveniles tempranos (2.0 ±0.5 g), los cuales se ha documentado que toleran de forma eficiente cambios a bajas salinidades especialmente en estas etapas de su vida, y en cuyo caso esta tal vez esta cualidad haya ocasionado que se hubieran presentado tales diferencias en la infección con el WSSV.

### **V.3.2 Cuadro clínico de organismos infectados con el WSSV**

Las infecciones avanzadas por WSSV se caracterizan por una serie de signos clínicos considerados característicos de la enfermedad, los cuales coincidieron con los reportados por diversos autores (Chang *et al.*, 1996; Lightner, 1996a) excepto por la ausencia de manchas blancas en el exoesqueleto, mismas que no se observaron en este estudio.

Por otra parte llama la atención el hecho de no observarse los signos característicos de la enfermedad de la mancha blanca en el grupo experimental G-0 como ocurrió con el resto de los grupos experimentales. Lo anterior, puede tener importantes implicaciones ya que en el caso de un brote en condiciones de cultivo en agua dulce dado que no se presentan las características anatomopatológicas típicas de la enfermedad observadas en los cultivos salinos es posible confundir dichas características con otras enfermedades, o bien no asociar el escaso cuadro clínico a la presencia del virus y perder tiempo y recursos en diagnósticos errados o a la no implementación de medidas de manejo como pueden ser interrumpir el recambio de agua, planear cosechas o extremar cuidados en el manejo. En este sentido, un aspecto que ha permitido sobrellevar los problemas virales en algunas zonas del país especialmente afectadas por el virus de la mancha blanca, es el hecho de que los productores reconocen muy bien la patogénesis en los estanques de cultivo, lo cual les permite implementar medidas de manejo específicas. Además, esto se ha logrado a partir de estudios realizados en campo y laboratorio así como observaciones hechas por los mismos productores, lo cual ha sido parte del aprendizaje que deja la experiencia de convivir con

las enfermedades. Además, dado el reciente surgimiento del cultivo de camarón en agua dulce es necesario generar el conocimiento del comportamiento de las enfermedades en este ambiente en específico, y no dar por hecho preceptos ya establecidos o surgidos de la actividad camaronícola en zonas costeras, dado que ambos ambientes difieren por mucho y es de esperar que las respuestas de los organismos estén influenciadas por las características particulares de éstos.

### **V.3.3. Tasa de mortalidad**

Los resultados obtenidos en el bioensayo muestran concordancia con estudios de infectología donde se utilizaron inóculos virales en altas dosis, en los cuales se observó la presencia de organismos muertos a partir de 40 h.p.i. (Chang *et al.*, 1996), además reportan haber detectado infecciones tempranas luego de 16 h.p.i. En cambio en un estudio hecho por Rahman *et al.* (2006), se detectaron infecciones tempranas en células marcadas positivamente mediante histoquímica luego de 12 h.p.i. con el inóculo viral. Asimismo, reportan inicio de mortalidad a partir de 36 h.p.i. y el 100% de las mortalidades acumuladas a las 60 h.p.i. En nuestro estudio la detección temprana de organismos positivos al WSSV ocurrió a partir de 9:35 h.p.i. y la presencia de infecciones avanzadas con organismos muertos ocurrió a partir de de 38:56 h.p.i.

No obstante, nuestro estudio difiere en parte del trabajo de Yoganandhan *et al.* (2003) quienes observan una mortalidad acumulada del 100% a las 58 h.p.i. pero la detección temprana de los CI característicos del WSSV en tejido branquial ocurrió sólo hasta después de 36 h.p.i. y estuvieron ausentes en las muestras de 12 y 24 h.p.i. Señalando que el tejido cardiaco fue positivo hasta después de 48 h.p.i. Además, mencionaron que el tejido conectivo, músculo y apéndices fueron positivos hasta después de 36 h.p.i. y paradójicamente el epitelio del estómago resultó positivo al virus hasta después de 48 h.p.i., asimismo, los autores señalaron que los organismos infectados dejaron de alimentarse luego de 24 h.p.i. mostraron señales de urópodos rojos hasta después de 36 h.p.i. y presentaron manchas blancas en estado moribundo o hasta después de 48 h.p.i. también en dicho estudio las muestras de hemolinfa resultaron positivas a las 6 h.p.i. (pero negativas a



las 3 h.p.i.), en cambio a las 12 h.p.i. todos los tejidos resultaron positivos por PCR. En nuestro caso las muestras de músculo resultaron positivas luego de 9:35 h.p.i. pero negativas a las 0:16 h.p.i. a este mismo tiempo algunos organismos ya eran positivos mediante histología.

#### **V. 3.4. Patogénesis viral y órganos afectados por el WSSV**

Estudios histológicos de animales moribundos revelan células degeneradas, caracterizadas por cuerpos de inclusión intranuclear basófilos en núcleos hipertrofiados de células ectodermales y mesodermales de los apéndices, branquias, estómago, intestino anterior y posterior, tejido conectivo, glándula antenal, órgano linfoide, tejido hematopoyético, hemolinfa, corazón y una variedad de otros tipos de células (Lightner 1996a). Sin embargo, no se han reportado inclusiones en el epitelio del hepatopáncreas, intestino medio o ciego del intestino medio (Lightner 1996a; Sahul *et al.*, 2000).

Un detalle de importancia observado en organismos con signos clínicos de WSSV (sin alimento en el tracto, nado errático y color café-rojizo), fue la presencia de bacterias en el estómago e intestino observables mediante histopatología. Además en varios casos camarones con infecciones moderadas se observó al interior del sistema digestivo (estómago o intestino medio) restos de apéndices de camarones con evidentes cuerpos de inclusión del WSSV. Lo que supone organismos con desarrollo tardado de la enfermedad que consumían parte de los organismos muertos por el virus. Lo anterior supone que luego de 36 h.p.i. aún había organismos alimentándose. Además confirma una de las principales vías de transmisión del virus el cual ocurre por canibalismo de organismos enfermos tal como lo encontraran (Lightner, 1996a; Chou *et al.*, 1998).

El desarrollo del bioensayo permitió evidenciar el efecto de la salinidad en la infección del WSSV. En todos los grupos experimentales se desarrolló la enfermedad de la mancha blanca, asimismo, se pudo identificar la patogénesis viral mediante histología y observación conductual de los organismos. Un hecho que llama la atención es la respuesta de infección que muestran los diferentes órganos y tejidos del camarón. Así sobresalen por su infección

el tejido epitelial del estómago, tejido cuticular, tejido conectivo (especialmente el contiguo al estómago), epipodito y pleura branquial (branqueosteguito), de igual forma se pudo observar que los tejidos medianamente afectados por el virus fueron branquias, glándula antenal órgano linfoide y tejido hematopoyético. Asimismo, los tejidos poco afectados por el virus incluyen al cordón nervioso ventral, ganglios nerviosos (especialmente el tejido neurosecretor) y corazón. Por último, los tejidos no afectados incluyen al hepatopáncreas, seca anterior y posterior y epitelio columnar digestivo del intestino medio. Por último Chang *et al.* (1996) encontraron que en *P. japonicus* el epitelio cuticular fue uno de los tejidos indicadores de infección temprana del WSSV detectados después de 16 h.p.i. Asimismo, no fue sino hasta después de 40 h.p.i, que se consideró una infección aguda con presencia de mortalidad en los organismos afectados.

#### **V.3.5. Efecto de la infección con WSSV en la osmorregulación del camarón *L. vannamei*.**

Como se ha mencionado en la familia *Peneidae*, camarones del género *Litopenaeus* toleran un amplio intervalo de salinidades, desde agua dulce hasta agua de mar a un 150 % ( $\approx 52$  g/L<sup>1</sup>). Ellos son excelentes hipo e hiper-reguladores y generalmente en una gráfica de osmorregulación presentan un patrón en forma de una amplia meseta en la parte central de todo su intervalo en el cual la concentración de la hemolinfa es muy constante. Leves variaciones en los niveles de regulación y posición de dicha meseta se correlacionan con su hábitat normal de distribución en la naturaleza (Mantel y Farmer, 1983).

El hecho de haberse registrado el menor y mayor grado de severidad en los tratamientos G-0 y G-30 respectivamente, resulta muy contradictorio ya que como señalan Le Moullac y Haffner (2000), el costo energético de la regulación es más bajo cuando existe un gradiente osmótico bajo entre la hemolinfa y el medio. De igual forma, es mínimo cuando la osmolaridad del medio es similar a la osmolaridad de la hemolinfa o bien, cuando ésta es isosmótica con el medio externo. En este sentido, los camarones del grupo experimental G-30 se encontraban más cerca del punto isosmótico señalado por varios autores (Castille y Lawrence, 1981; Mantel y Farmer, 1983; Le Moullac y Haffner 2000) cercano a 718

mOsm/Kg<sup>-1</sup> (salinidad del medio aproximada de 25 g L<sup>-1</sup>). Sin embargo, paradójicamente el grupo experimental de salinidad 30 g L<sup>-1</sup> (G-30) registró el mayor grado de severidad promedio respecto al resto de los grupos experimentales y como se pudo observar la concentración osmótica de la hemolinfa fue mas afectada que los grupos G-0 y G-15 en donde existía un mayor diferencial entre la osmolaridad del medio y la hemolinfa que G-30. De acuerdo a los autores citados se esperaría un mejor desempeño en la capacidad osmorreguladora en este grupo ya que dicha salinidad estaría mas cerca del punto isosmótico señalado por los autores. No obstante los grupos experimentales G-30, G-45 y G-60 fueron diferentes entre si (F=85.36, p< 0.001).

Los valores de osmolaridad observados en la hemolinfa de los camarones en salinidades bajas (G-0 y G-15) no fueron diferentes estadísticamente entre grupos experimentales y grupos control. Lo anterior, indicó un pobre efecto del virus en los mecanismos de osmorregulación de *L. vannamei* a bajas salinidades. Sin embargo, no ocurrió igual en salinidades de 30, 45 y 60 g/L<sup>-1</sup> (G-30, G-45 y G-60, respectivamente). Asimismo, es conocida la capacidad de *L. vannamei* de soportar de forma eficiente ambientes de baja salinidad y de igual forma también se conoce su limitada capacidad de soportar ambientes de alta salinidad. Sin embargo, en las prácticas de cultivo, especialmente en zonas con alta irradiación ocurre con frecuencia que se manejen salinidades superiores a los 60 g L<sup>-1</sup> especialmente cuando se sabe de brotes de la enfermedad y se quiere minimizar el riesgo de introducir el patógeno con el agua de recambio. Sin embargo, como quedó manifiesto en el bioensayo en caso de estar presente la enfermedad se esperaría un fuerte efecto sobre los procesos de osmorregulación con posibles efectos adversos en la salud de los organismos, como se observó en este experimento. Con la salvedad claro esta, de que se trate de organismos de tallas similares, pues se desconoce si con organismos de diferente talla ocurra lo mismo.

### **V.3.6. Análisis de PCR**

Los análisis de PCR fueron una herramienta de apoyo que permitió contar con una técnica confirmativa de mayor sensibilidad que la técnica histopatológica para el diagnóstico del WSSV. Asimismo, el empleo de la técnica ofreció mayor certeza en el planteamiento del bioensayo dado que era sumamente importante contar con organismos libres del WSSV en el desarrollo del experimento, de tal forma que previo al inicio del experimento los análisis exploratorios se realizaron por medio de la PCR y una vez iniciado el experimento a fin de poder observar la patogénesis se cambió a la técnica histopatológica.

## VI. CONCLUSIONES

-Se observó una carga parasitaria diferente entre ambientes de agua dulce y marino.

-En el cultivo del camarón con agua de pozo los epibiontes asociados a las branquias fueron, diatomeas tipo *Navícula* y rotíferos tipo *Philodina* a diferencia de protozoos ciliados peritricos y bacterias filamentosas presentes en agua marina y del sistema de riego agrícola de Mexicali, el cual a su vez presentó algas Euglenoides tipo *Colasium* no observadas en el resto de los cultivos.

-En el ambiente de cultivo de agua marina se encontraron los valores más altos de prevalencia y grado de severidad por efecto de epibiontes en branquias; sin embargo, se lograron cosechas exitosas y parámetros de producción aceptables en el cultivo.

-La carga epibiótica presentó una tendencia a incrementarse conforme se desarrolló el cultivo y estuvo asociada al incremento en la biomasa del estanque, descenso de los niveles de oxígeno y acumulación de materia orgánica en el estanque.

-Los resultados desfavorables en el cultivo del camarón con agua de pozo es probable que se deban a deficiencias del ión potasio, lo cual ocasionó una condición de estrés y predispuso a los camarones a infecciones bacterianas crónicas.

-El análisis histopatológico reveló la presencia de cuerpos de inclusión característicos del IHNV sin ser estos una condición que pusiera en riesgo los organismos de ambos ambientes.

-Se encontraron cuerpos de inclusión con múltiples esferas en el interior del epitelio tubular del hepatopáncreas las cuales asemejan a parásitos del tipo haplosporidio sin embargo, es necesario profundizar en el diagnóstico para poder llegar a una identificación adecuada.

-Es probable que los resultados en la sobrevivencia de los cultivos tenga relación con dos aspectos principalmente: por los acuicultores la falta de manejo y la presencia de epibiontes y patógenos en los camarones.

-En la infección experimental por inyección intramuscular de 10 microlitros de inóculo viral (WSSV) se desarrollaron cuerpos de inclusión característicos del Virus de la Mancha Blanca observables mediante histopatología a las 9:35 h.p.i.

-Se observó una infección diferencial entre tratamientos a las 9:35 h.p.i. con una infección menor en el tratamiento de salinidad cero respecto del resto de tratamientos experimentales.

-A las 36 h.p.i. se empieza a observar muerte de organismos en todo los grupos experimentales, a este tiempo el análisis histopatológico revela infecciones severas grado 3 o 4 de acuerdo a la escala empleada.

-Los tejidos principalmente afectados donde se detectó una infección temprana fueron el epitelio cuticular, epitelio de estómago y tejido conectivo circundante a la pared dorsal del estómago.

-Los tejidos blanco donde se observó el mayor daño celular y estructural durante infecciones avanzadas fueron el epipodito branquial, tejido hematopoyético y epitelio del estómago

-Se observó un efecto de trastorno en la osmorregulación de camarones inyectados con el virus en salinidades de 30, 45 y 60 g/L<sup>-1</sup>; en cambio, las salinidades de 0 y 15 g/L<sup>-1</sup> no mostraron diferencias significativas con respecto a la osmorregulación observada en los grupos controles.

-El camarón *L. vannamei* expuesto a bajas salinidades exhibió una osmorregulación eficiente, contrario a la osmorregulación presentada a elevadas salinidades; de lo anterior,

se puede concluir que el camarón *L. vannamei* conserva su capacidad de osmorregulación aún cuando se encuentra afectado por el WSSV.

El WSSV ocasionó la muerte en los organismos infectados en todas las salinidades experimentadas evidenciando su alta patogenicidad.

## VII. LITERATURA CITADA

Aguado N. y A. Bashirullah, 1996. Occurrence and prevalence of the marine bacterium *Leucothrix mucor* Oersted on penaeid shrimps in eastern Venezuela. Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente. Vol. 35 (1-2), : 5-7.

Aguirre-Guzmán G. y Ascencio-Valle F., 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. Recent Res. Devl. Microbiology, 4: 333-348.

Aguirre-Guzmán G. y Sánchez-Martínez J. G., 2005. Análisis en fresco de camarón, un proceso rápido para el diagnóstico presuntivo de enfermedades. Panorama Acuicola Magazine. Vol. 19 (4), :59-65.

Aguirre-Guzmán G., Vázquez-Juárez R. and Ascencio-Valle F., 2001. Differences in the Susceptibility of American White Shrimp Larval Substages (*Litopenaeus vannamei*) to Four *Vibrio* Species. Journal of Invertebrate Pathology. 78:215-219

Álvarez-Vera L., 2008. Oficina de SAGARPA en Ensenada, B.C. Agosto del 2008.

Amos K. H., 1985. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. 3rd. Fish Health Section, American Fisheries Society. Corvallis, Oregon, USA.

Amrane A. y Prigent Y., 1998. A new turbidimetric device for on-line monitoring of growth of filamentous microorganisms. J. Microbiol. Methods, 33:37-43

Anónimo, 1997. Curso Teórico Práctico de la Calidad de Agua, Suelos y Patología de camarones. Aquasis. Sistemas y Equipo Especializado para Acuicultura. Guaymas, Sonora, México Septiembre 1997. p 101.

Anónimo, 2008. Enfrentando los retos del pasado para un mejor futuro en la camaronicultura. Panorama Acuicola Magazine. Vol. 13, No.3. :68-61 p

Avault J. W. 1996. Fungi and crustacean cause disease in aquaculture. Aquaculture Magazine, 22 :85-88.

Avnimelech Y. y Ritvo G., 2003. Shrimp and Pond soils: processes and Management. Aquaculture 220,:549-567.



Balasubramanian G., R. Sudhakaran, S. Syed Musthaq, M. Sarathi y A. S. Sahul Hameed. 2006. Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. Short communication, Journal of Fish Diseases 2006, 29, 569–572

Bell T. A. y Lightner D. V., 1984. IHHN virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. Aquaculture 38: 185-194.

Boyd C., 1990. Water Quality in Ponds for Aquaculture. Alabama agriculture Experiment Station. Auburn University, Auburn, Alabama.150 pp.

Boyd, C., 2001. Inland shrimp farming and the environment. World Aquaculture 321, 10–12.

Brock, J.A. 1983. Diseases (infectious and non-infectious), metazoan parasites, predators and public health considerations in *Macrobrachium* culture and fisheries. En: CRC Handbook of Mariculture. Vol. I Crustacean Aquaculture (ed. por J.P. Mcvey) :329-370.

Brock J.A. y LeaMaster B., 1992. A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. En: Wyban, J. (Ed.). Proceedings of the special session on shrimp farming. World Aquaculture Society, Baton, Rouge.:212-226.

Brock J. A. y Lightner D. V., 1990. Diseases of Crustacea. Diseases caused by microorganisms:. En Kinne O. (ed.). Diseases of Marine Animals, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany Vol. 3 : 245-349.

Brock J.A. y Main K., 1994. A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. Published by the Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, HI. :241p.

Brown P. B., M. R. White, D. L. Swann y Fuller M. S., 1993. A severe outbreak of ectoparasitism due to *Epistylis* sp. in pond-reared orconectid crayfish. Journal of the World Aquaculture Society 24: 116-120.

Burreson E.M. y Ford S.E., 2004. A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). Aquatic Living Resources, 17(4), 499-517.

Cai S., J. Huang, C. Wang, X. Song, J. Yu, Y. Zhang y Yang C., 1995. Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. Resumen, J. Fish. China 19:112-117.

Castille F.L. y Lawrence A.L., 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. Comp. Biochem. Physiol. 68A (1981), pp. 75–80.

Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang y Lo C.F., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing White Spot Syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Dis Aquat Org 23: 165-173.

Chou HY, CY Huang, C. F Lo y Kou G.H., 1998. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. Aquaculture 164: 263–276

Clifford, H. C., 1994. El manejo de estanques camaroneros. Memorias del seminario Internacional de camaronicultura, Camarón 94'. Mazatlán Sinaloa, México.

Costa R., I. Mermoud, S. Koblavi, B. Morlet, P. Haffner, F. Berthe, M. LeGroumellec y Grimont P., 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. Aquaculture, 164 : 297-309.

Couch J.A., 1974. Free and occluded virus, similar to baculovirus, in hepatopancreas of pink shrimp. Nature (London) 247, 229–231.

Couch J.A., 1983. Diseases caused by protozoa. En: A. J. Provenzano Jr. (ed.). The Biology of Crustacea. Cap.6. Pathology. Academic Press, New York, 94-98 p.

Davis D. A., I. P. Saoud, W. J. McGraw y Rouse D. B., 2002. Considerations for *Litopenaeus vannamei* reared in inland low salinity waters. En: Cruz-Suárez L. E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Gaxiola-Cortés y Simoes N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

Dykova I., Lom J. y Fajer E., 1988. A new haplosporean infecting the hepatopancreas in the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Journal of Fish Diseases 11: 15-22.

Edgerton B.F., L.H. Evans, F. J., Stephens y Overstreet R. M., 2002. Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms. Aquaculture 206, :57–135.

Evans L. H., A. Fan y Finn S., 1992. Health Survey of Western Australian Freshwater Crayfish. Curtin University of Technology, Perth, 136 pp.

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) gametocysts infecting the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Volume 244 (1-4), :11-18.

FAO, 2007. Estado Mundial de la pesca y la acuicultura 2006. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.

Fielder D. S., W. J Bardsley y Allan G. F., 2001. Survival and growth of Australian snapper *Pagrus auratus*, in saline groundwater from inland New South Wales, Australia. Aquaculture 201:73-90.

Flegel T.W., S. Boonyaratpalin y Withyachumnarnkul B., 1997. Progress in research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. En: T.W. Flegel and I.H. MacRae, (eds.). Diseases in Asian Aquaculture III. Fish Health Section,:285–295 pp. Manila, Asian Fisheries Society. Australian Snapper, *Pagrus auratus*, in saline groundwater from New South Wales, Australia. Aquaculture 201, 73-90.

Forsberg J. A., P.W. Dorsett y Neill W.H., 1996. Survival and growth of Red Drum *Sciaenops ocellatus* in saline groundwater of WestTexas, USA. Journal of theWorld Aquaculture Society 27, 462-474.

Forsberg J. A. y Neill W. H., 1997. Saline groundwater as an aquaculture medium: physiological studies on the red drum, *Sciaenops ocellatus*. Environmental Biology of Fishes 49,:19-128.

Foster C. A., T. G. Sarphie y Hawkins W. E., 1978. Fine structure of the peritrichous ectocommensal *Zoothamnium* sp. with emphasis on its mode of attachment to penaeid shrimp. J. Fish Diseases 1: 321-335

Frelier F. P., R. F. Sis, T. A. Bell y Lewis D. H., 1992. Microscopic y ultraestructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in pacific withe shrimp (*Penaeus vannamei*) culture in Texas. Vet. Pathol. 29,: 269-277.

Galaviz-Silva L., Z. J. Molina-Garza, J. M. Alcocer-González, J. L. Rosales-Encinas e Ibarra-Games C., 2004. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. *Aquaculture*, 242 (1) :53-68

Galindo-Bect M. S., L. A. Galindo-Bect, J. M. Hernández-Ayón, F. L. Ley y Álvarez-Borrego S., 1999. Efecto del niño en los nutrientes y el carbón orgánico total en una laguna costera del Noroeste de Baja California. *Ciencias Marinas* 25(2): 225-237

Giffard-Mena I., y Martínez-Zabatdeny L. C., 2003. Desarrollo del cultivo de camarón “tierra adentro” en el Valle de Mexicali, Baja California, México. *Panorama Acuícola Magazine*, 8 (5): 14-16.

Gómez-Gil B., A. Roque, Flores-Guerra A. L., 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y su impacto en el uso de antimicrobianos. En *Camaronicultura y medio Ambiente*. Páez-Osuna, F. (ed.) UNAM y El Colegio de Sinaloa, México, D. F. (14) :315-345.

Guilland J. A. y Rothschild B. J., 1984. *Penaed shrimps, their biology and manegement*. Fishing News Books Limited. Gran Bretaña, 308 p.

Hasson K. W., D. V. Lightner, L. L. Mohny, R. M. Redman, B. T. Poulos y White B. L., 1999. Taura Syndrome Virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis Aquat Org* 36: 81-93.

Hine P. M., N. Cochennec-Laureau y Berthe F. C. J., 2001. *Bonamia exitiosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Dis Aquat Org* 47 :63–72.

Ibarra-Games J.C., L. Galaviz-Molina y Molina-Garza Z. J., 2007. Distribución de la bacteria causante de la necrosis hepatopancreática (NHPB), en los cultivos de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* en México. *Ciencias Marinas*. Vol 33:1-9.

Ishimaru K., M. Akagawa-Matsushita y Muroga K., 1995. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 134-138.

Jiménez R, R. Barniol y Machuca M., 1997. An epizootic of an intracellular bacterium in cultured penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda) in the Gulf of Guayaquil, Ecuador. En: T.W. Flegel y I.H. MacRae, (eds.), *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section, pp. 305–311. Manila, Asian Fisheries Society.

Jiménez R., L. Barniol y Machuca M., 2002. *Nematopsis marinus* n. sp., a new septate gregarine from cultured penaeoid shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone), in Ecuador. *Aquaculture Research*, Volume 33, (4) :231-240.

Johnson, S. K. 1977. *Crawfish and Freshwater shrimp diseases*. Texas A&M University Sea Grant Publication 77-605. 19 pp.

Johnson S. K., 1990. *Handbook of Shrimp Diseases*, Sea Grant Publ. No. TAMU-SG-90-601, Texas A & M Univ.:25 pp.

Jones T. C., R. M. Overstreet, J. M. Lotz, y Frelier P. F., 1994. *Paraophioidina scolecoides* n. sp., a new aseptate gregarine from cultured Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Disease of Aquatic Organisms* 19: 67-75.

Jory D. E., 1999. *Shrimp White Spot Virus in the western hemisphere*. *Aquaculture Magazine*. Vol 25 (3) : 83-81.

Jory E. D., 2004. *Status and issues in inland shrimp farming*. *Aquaculture Magazine*, May-June, 51-55

Juárez M. A., 2008. *Current Status of Shrimp Aquaculture in Mexico*. *Panorama Acuicola Magazine*. Vol 13, No. 2: 48-52 pp

Kalagayan H., D. Godin, R. Kanna, G. Hagino, J. Sweeney y Wyban J., 1991. *IHHN virus as an etiological factors in Runt-Deformity Syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii*. *J. World Aquac. Soc.* 22 : 235– 243.

Kampfer P., 1997. *Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge*. *Fems Microbiol. Ecology*, 23:169-181.

Kita-Tsukamoto K., H. Oyalzu, K. Namba y Sirn-du U., 1993. *Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae* a determined on the basis of 16 rRNA sequences*. *Int. J. Syst bacterial* 43 (8-19).

Kitatsuji K., H. Miyata y Fukase T., 1996. *Lysis of filamentous bacteria by surfactants*. *Water Sci. Tec.*, 34:145-153.

Krol R. M., W. E. Hawkins y Overstreet R. M., 1991. Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Invertebrate Pathology* 57: 362-370.

Krucinska J. y Simon E., 1968. O pasozytach i epibiontach jamy skerzelowej rako´w z wroclawia i okilic. Resumen. *Przeegl. Zool.* 7 (3), 288– 290.

Lahser Jr., C.W., 1975. Epizooites of crayfish: 1. Ectocommensals and parasites of crayfish of Brazos County, Texas. *Freshwater Crayfish* 2, 277– 285.

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

Le Moullac G. F, C. Soyez, D. Saulnier, D. Ansquer, J. C. Avarre y Levy P., 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris* *Fish & Shellfish Immunology* Volume 8, Issue 8, November, Pages 621-629.

Lee D. O., Wickins J. F., 1992. *Crustacean Farming*. Blackwell, Oxford, England, 392 p.

Lightner D. V., 1985. A review of diseases of culture penaeid shrimp and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. :79-103 En: Taki, Y; J.H. Primavera J.A. Llobrera (eds.). *Proceedings of the first international conference of the culture of penaeid prawns / shrimp*.

Lightner D.V., 1996a. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. (ed.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 304 pp.

Lightner D. V., 1996b. The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: epizootiology, productions impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Revues Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, 15 (2): 579-601.

Lightner D. V., R. M. Redman y Almada-Ruiz E. A., 1989. *Baculovirus penaei* in *Penaeus stylirostris* (Crustacea: Decapoda) cultured in Mexico: Unique cytopathology and a new geographic record. *J. Invertebrate Pathology* 53:137-139.

Lightner D.V., T.A. Bell, R.M. Redman y Pérez-Alvidrez L. A., 1992a. A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in

penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. ICES Marine Science Symposia 194: 97-105.

Lightner D. V., R. M. Redman, T. A. Bell y Thurman R. B., 1992b. Geographic dispersion of the viruses IHHN, MBV, and HPV as a consequence of transfers and introductions of penaeid shrimp new regions for aquaculture purposes. :155-173. En A. Rosenfield y Mann R. (eds.), Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems. Maryland Sea Grant College, UM-SG-TS-92-01, College Park, MD.

Lignot J. H., C. Spanings-Pierrot y Charmantier G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. Aquaculture 191: 209–245.

Liu B., Z. Yu, X. Song, Y. Guan, X. Jian y He J., 2006. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture 253, 163–170.

Lo C. F., C. H. Ho, S. E. Peng, C. H. Chen, H. C. Hsu, Y. L. Chiu, C. F. Chang, K. F. Liu, M. S. Su, C. H. Wang y Kou G. H., 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Dis. Aquat. Organ. 27:215-225.

Lotz J. M., 1997. Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol 13, : 405-413.

Lotz J. M., A. L. Salazar y Soto M. A., 2005. Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of *Litopenaeus vannamei* Diseases of Aquatic Organisms 65: 75 – 78.

Loy J.K., P. Freiler, P. Varner y Templeton J. W., 1996. Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Litopenaeus vannamei* from Texas y Peru by polymerase chain reaction. Dis. Aquat. Org. 25: 117-122.

Madhavi R., P. Janakiram, L. Jayasree y Murthy P. S. N., 2002. Occurrence of concurrent infections with multiple viruses in *Penaeus monodon* from culture ponds of north coastal Andhra Pradesh. Current Science, 82, (11) :1397-1400.

Mantel L. y Farmer L., 1983. The biology of crustacea, vol 5: Internal anatomy and physiological regulation ; Academic press, New York: 53 - 151.

Morales-Covarrubias M. S., L. M. Nunan, D. V. Lightner, J. C. Mota-Urbina., M. C. Garza-Aguirre y Chávez-Sánchez M. C., 1999. Prevalence of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) in Wild Adult Blue Shrimp *Penaeus stylirostris* from the Northern Gulf of California, Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health* 11:296-301

Moreno-Alva M., L. M. Sáenz-Gaxiola y González-Alcalá H., 2007. Protocolo sanitario para el cultivo de camarón blanco (*L. vannamei*) en el estado de Baja California, México. Comité Estatal de Sanidad e Inocuidad Acuícola de Baja California, A.C. <http://www.sesaibc.org>.

May L., 1989. Epizotic and parasitic rotifers. *Hydrobiology* 186–187, 59–67.

Musig Y. y S. Boonnom, 1998. Low-salinity culture of *Peneus monodom* Fabricius and its effect on the environment. En Flegel T. W. (Ed.) *Advances in Shrimp Biotechnology*, BIOTEC. Bangkok, Thailand. :123 p

Novoa B, P. Balseiro y Figueras A., 2004. Molecular detection of a haplosporidian parasite in carpet shell clam *Ruditapes decussatus* from Spain. *Dis. Aquat. Org.* 61:89–93.

Nunan M. L., V. D. Lightner, R. C. Pantoja, A. N. Stokes y Reece S. K., 2007. Characterization of a rediscovered haplosporidian parasite from cultured *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.* Vol. 74 :67–75.

Ochoa M. V. J., 1994. Situación de la camaronicultura en México. *Memorias del Seminario Internacional de Camaronicultura, Camarón 94*. Mazatlán Sinaloa, México. Teichert-Coddington D., 1994. *Seminario Internacional de Camaronicultura en México*. R. Purina Internacional, Mazatlán, México. 140 p.

Ochoa J. L., J. Pérez-Linares, C. Rodríguez y Núñez-Vázquez E., 2005. Impacto de cianobacterias tóxicas en el cultivo de camarón blanco en México. *Panorama Acuicola Magazine*. Vol. 10 (2):11-13

Olivas-Valdez J. A. y Cáceres-Martínez J., 2004. Observaciones Sanitarias en Camarón Cultivado en Aguas de Baja Salinidad. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico*. Vol. 3, No. 23 :11-13.

Onstad D. W., J. R. Fuxa, R. A. Humber, J. Oestergaard, D. I. Shapiro-Ilan, V. V. Gouli, R. S. Anderson, T. G. Andreadis y Lacey L. A., 2006. *An Abridged Glossary of Terms Used in Invertebrate Pathology*, 3rd Ed. Society for Invertebrate Pathology. 103 p



Orbe, A. y A. Arias. 1987. Métodos de cultivo de camarón en México. SEPESCA, 2ª Ed. México, 29 pp.

Otta S. K, I. Karunasagar y Karunasagar I., 1999. Bacterial flora associated with shrimp culture ponds growing *Penaeus monodon* in India. Jour. Aqua. Trop. 14 (4): 309-318.

Otta S. K, I. Karunasagar y Karunasagar I., 2001. Bacteriological study of shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius hatcheries in India. Jour. Appl. Ichthyol. 17: 59-63.

Oyarzábal F. y Young.1978. International external diseconomies: the Colorado River salinity problem in Mexico”, Natural Resources Journal, 18 :77-88.

Páez-Osuna F., 2005. Retos y perspectivas de la camaricultura en la zona costera. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales. Vol. 1, :21-31.

Perazzolo L. M., Gargioni R., P. Ogliari y Barracco M. A., 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. Aquaculture 214, (1-4), :19-33.

Pérez-Farfante L. y Kensley B., 1997. Penaeid and Sergestoid shrimps and Prawns of the world. Key and diagnoses for the families and genera. Edition du Muséum National d' Histoire Naturelle du Paris. Paris, Francia, 233 pp.

Pérez-Linares J., M. Cadena, C. Rangel, M. L. Unzueta-Bustamante y Ochoa J. L., 2003. Effect of *Schizothrix calcicola* on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (*Penaeus vannamei*) postlarvae. Aquaculture Volume 218, (1-4), : 55-65.

Pérez-Velásquez M., M. L. González-Félix, F. Jaimes-Bustamante, L. R. Martínez-Córdova y Trujillo-Villalba D. A., 2007. Investigation of the Effects of Salinity and Dietary Protein Level on Growth and Survival of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei* Jour. of the World Aquaculture Society Vol. 38, No. 4 :475-485 p

Persson M.; L. Cerenius y Söderhäll K., 1987. The influence of the haemocyte number on the resistance of the freshwater crayfish, *Pacifastacus Leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci* Journal of Fish Diseases. 10: 471-477

Pillard D. A., D. L DuFresne y Mickley M. C., 2002. Development and validation of models predicting the toxicity of major seawater ions to the mysid shrimp, *Americanysis bahia*. Environ Toxicol Chem. (10):21-31.

Poulos B. T., C. R. Pantoja, D. B., Dunlop, J. Aguilar y Lightner D. V., 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 47, 13-23

Poulos B. T., F. J. Tang, C. R. Pantoja, J. R. Bonami y Lightner D. V., 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology*, 87, :987–996

Primavera J. H. y Quintio E. T., 2000. Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Jour. Crustac. Biol.* 20:796–802

Rahman M. M., C. M. Escobedo-Bonilla, M. Corteel, J. J. Dantas-Lima, M. Wille, V. Alday-Sanz, M. B. Pensaert, P. Sorgeloos y Nauwynck H. J., 2006. Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 261, 842–849.

Rahman S.U., A. K. Jain, A. K. Reddy, G. Kumar y Koyya D. R., 2005. Ionic manipulation of inland saline groundwater for enhancing survival and growth of *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture Research*, 36: 1149-1156

Reece K. S. y Stokes N.A., 2003. Molecular analysis of a haplosporidian parasite from cultured New Zealand abalone *Haliotis iris*. *Dis. Aquat. Org.* 53 :61–66.

Robertson P A W, J. Calderon, L. Carrera, J. R. Stark, M. Zherdmant y Austin B., 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Dis Aquat. Org.* ;32:151–155.

Rodríguez de la Cruz C.1987. Crustáceos decapados del Golfo de California SEPESCA México 306 pp.

Rosenberry B., 1996. *World Shrimp Farming 1996*. (ed) San Diego: Shrimp News International, San Diego CA., 1996.

Rosenberry B., 2000. *World shrimp farming 2000*. Shrimp News International, San Diego, CA. 324 pp.

Rosenberry B. 2002. *World shrimp farming 2002*. Shrimp News International, 276 pp.

Rosenberry B., 2004. World shrimp farming 2004. Shrimp News International, San Diego, CA, 2004.

Roy L. A., Davis D. A., I. P. Saund y Henry R. P., 2007. Supplementation of potassium, magnesium and sodium chloride in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. *Aquaculture Nutrition* 13:104–113.

Sahul Hameed, A. S., M. X. Charles & M. Anilkumar. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 183:207-213.

Samocha T. M., A. D. Davis, A. L. Lawrence, C.R. Collins y P. Van Wyk, 2001. Intensive and super-intensive production of the Pacific white *Litopenaeus vannamei* in greenhouse-enclosed raceways systems. Book of Abstracts, Aquaculture 2001, Lake Buena Vista, Fl., 573 p.

Schuwert P. M., J. W. Lewis y Jones P.W., 2001. Pathological and physiological changes in the South African freshwater crab *Potamonautes warreni* calman induced by microbial gill infestations. *J. Invertebr Pathol*;77(4):269-79.

SEMARNAT, Comisión Nacional del Agua, Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua, 2002. Calidad del Agua del río Colorado conforme a Parámetros Físicos Químicos y biológicos 1990-2001.

Sonnenholzner S., J. F. Rodríguez, I. Pérez, F. Betancourt, Echeverría y Calderón J., 2002. Supervivencia y respuesta immune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. *Boletín El Mundo Acuícola* 8(1), 50-56. 73.

Tang K. F., C. R. Pantoja, R. M. Redman y Lightner D. V., 2007. Identification of a nodavirus (LvNV) that causes muscle necrosis in *Litopenaeus vannamei* and the development of in situ hybridization and RT-PCR assay for its detection. *Diseases of Aquatic Organisms*, in press.

Thompson J.A., T. J. Davidson, P.F. Frelie y Lawrence A. L., 1997. Epidemiology: what causes shrimp mortality? En: T.W. Flegel y MacRae I.H. (eds.) *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section, 195–201 p. Manila, Asian Fisheries Society.

Unzueta–Bustamante M. L., 2001. Distribución Incidencia y Trasmisión del WSSV en el Cultivo del Camarón Blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* Cultivado en el Noroeste de México. Tesis Doctoral. CICESE, Ensenada, B. C., México 110 pp.

Vargas-Albores F., M. A. Guzmán, Ochoa J. L., 1992. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp *Penaeus californiensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 299-303.

Wang Y.C., C. F. Lo, P. S. Chang y Kou G. H., 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquacult.* 164, 221-231.

Wang F. I. y Chen J. C., 2006. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Fish & Shellfish Immunology* 20, 671–681.

Wyban J. A. y Sweeney, J. N., 1991. Intensive shrimp production technology. High Health Aquaculture Inc., Hawaii. 158 pp.

Wyban J. A., J. S. Swingle, J. N. Sweeney y Pruder G. C., 1992. Development and commercial performance of high health shrimp using specific pathogen free (SPF) broodstock *Penaeus vannamei*. En: Wyban JA (ed) Proc Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, :254–260.

Yasuda K. y Kitao T., 1983. Bacterial flora in the digestive tract on prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, 19:229-234.

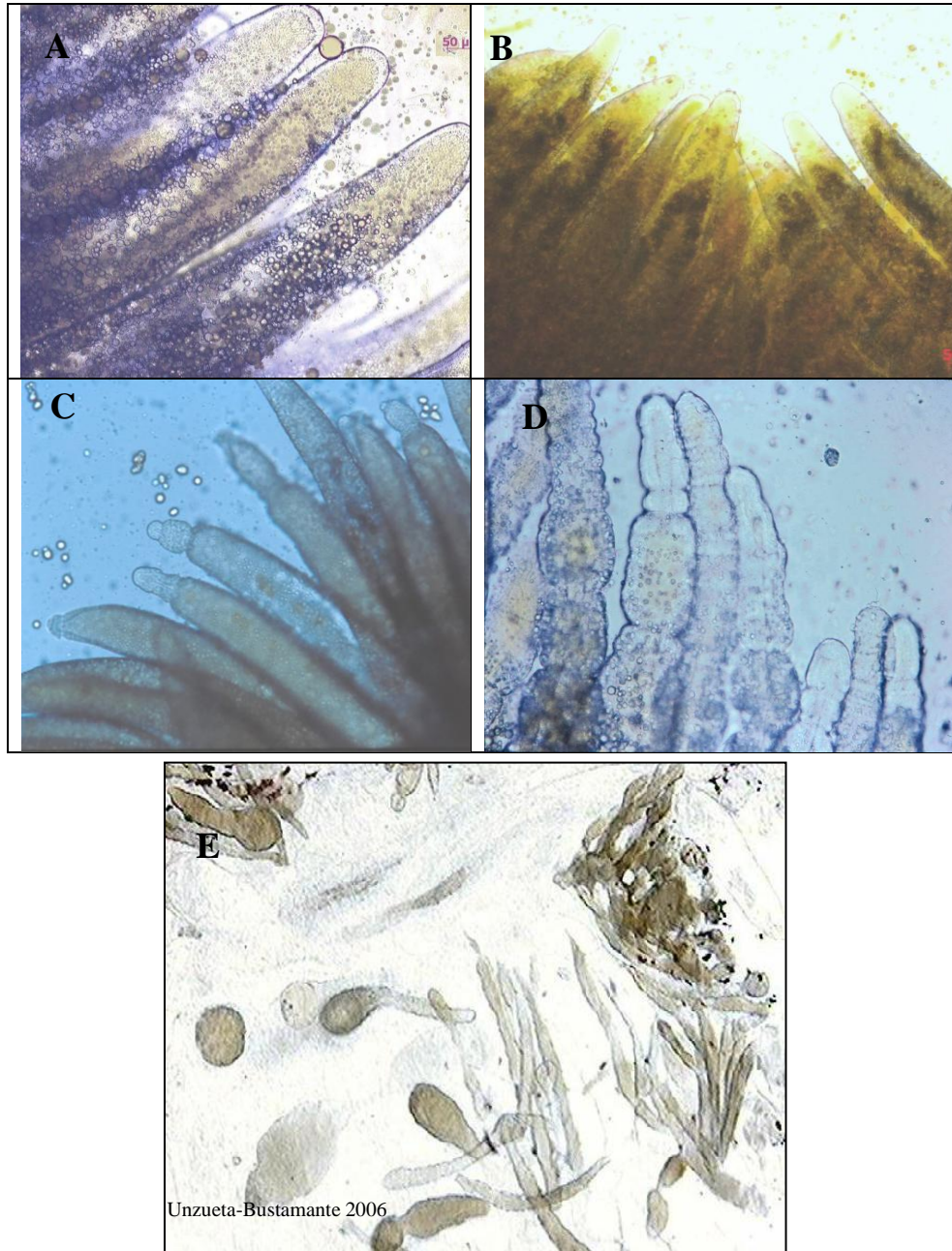
Yoganandhan K., S. Sathish, V. Murugan, R. B. Narayanan y Sahul Hameed A.S., 2003. Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques. *Aquaculture* 215.:21-29.

Zar J. H., 1974. 1984. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. USA. 620 p

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

Zimba P. V., A. Camusa, H. E. Allen y Burkholder J. M., 2006. Co-occurrence of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, mortalities and microcystin toxin in a southeastern USA shrimp facility. *Aquaculture*. 261 (3-1), :1048-1055 .

## ANEXO I



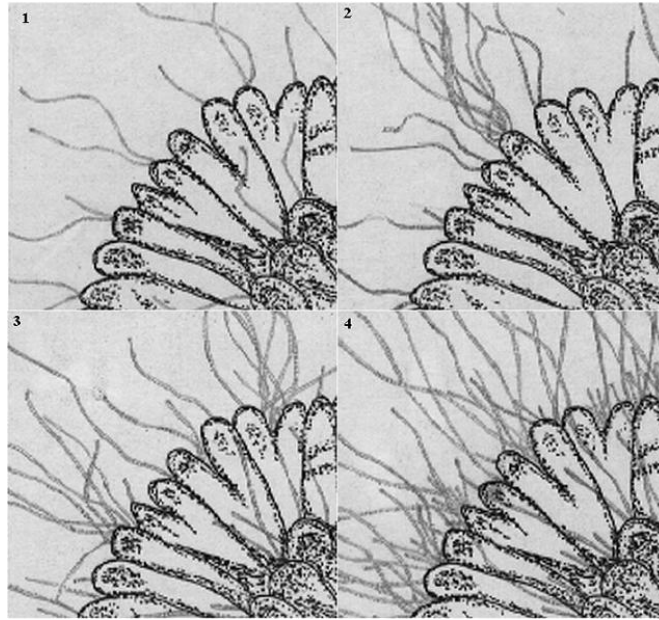
**Figura A-I-1.** Grados de severidad en la deformidad de los túbulos del hepatopáncreas las imágenes A, B, C, D y E muestran los criterios para asignar los grados de severidad 0, 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

## Anexo II

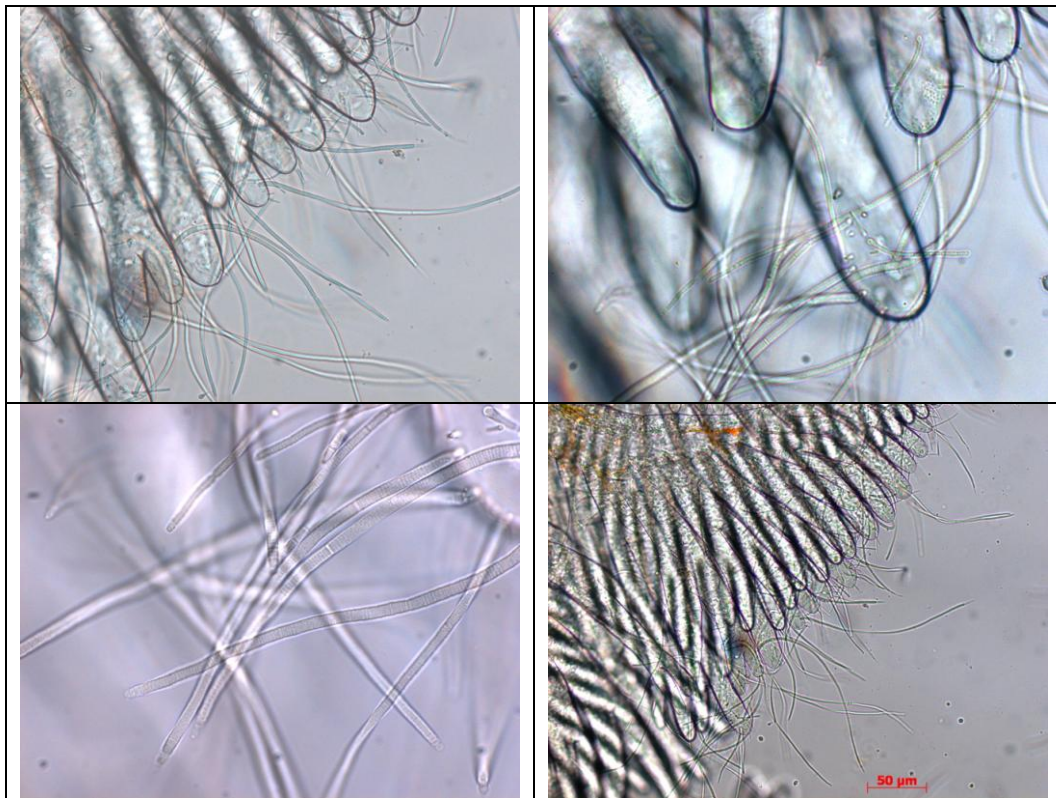


**Figura A-II-1.** Apariencia externa de camarones afectados por epibiontes (las figuras trapezoides señalan el área afectada). De izquierda a derecha grado 1, 2, 3 y 4 de severidad. En grado 1, es probable que los organismos no presenten cambios observables a simple vista, dado la poca cantidad de epibiontes presentes, sin embargo, en grados 2, 3 y 4 los camarones suelen presentar claras señales de la infestación, distinguibles por cambios de coloración en las branquias, incluso observables a través de la pleura branquial. Observaciones al microscopio revelaran los tipos de epibiontes presentes y posibles lesiones en los tejidos.





**Figura A-II-2.** Detalle esquemático de la cantidad de epibiontes presentes en una preparación en fresco de branquias donde se representa infestación por *Leucothrix* sp en lamelas branquiales del camarón, tomada de Lightner, (1996a).



**Figura A-II-3.** Preparación en fresco con diferentes grados de severidad por *Leucothrix* sp.

## **ANEXO III**

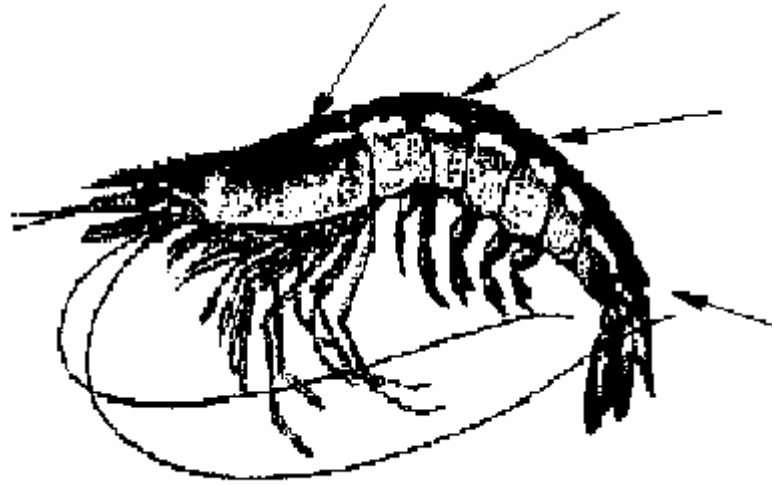
### **Proceso histológico**

#### **1.1. Fijado del camarón**

La fijación es una operación destinada a la conservación de los tejidos y su propósito es mantener los tejidos de la forma más parecida a como cuando estaban vivos, evitando hasta donde sea posible la autólisis y la putrefacción (Lightner, 1996a). Se utilizó solución Davidson para la fijación de los camarones como a continuación se describe:

- 1.- Se inyectó de 0.1 a 10 ml. de fijador (dependiendo del tamaño del camarón), en la región dorso lateral del hepatopáncreas, por ambos lados (Figura A-III-1).
- 2.-Se inyectó fijador en ambos lados de la región anterior, media y posterior del abdomen.
- 3.-Se realizaron cortes superficiales de cutícula en región céfalo torácica, justo en la línea media dorsal, procurando no penetrar en los tejidos.
- 4.- Para una mejor penetración del fijador se realizaron cortes subcuticulares en ambos lados de la región media lateral, y cortes transversales hasta poco más de la mitad de profundidad (sin cortar completamente las porciones corporales) en el primer y quinto segmento abdominal.
- 5.- Por último se sumergió en un frasco de boca ancha con solución Davidson durante un periodo de 24 a 72 hrs dependiendo del tamaño del organismo. Para asegurar una correcta fijación se procuró guardar una proporción de 1:10 organismo:fijador (Shaw y Battle, 1957).
- 6.- Posteriormente el camarón se transfirió a una solución al 50 - 70% de alcohol etílico o bien solución Davidson conservante (mismos ingredientes excepto ácido acético glacial) donde se almacenó hasta su procesado.





**Figura A-III-1.** Patrón de fijación sobre un organismo adulto. Las flechas indican los lugares donde se inyecta la solución Davidson.

### **1.2. Seccionado de muestras**

El camarón se cortó con un bisturí o navaja, las porciones de interés fueron colocadas en un casete plástico mismo que contuvo las muestras durante todo el procesado hasta la preparación de los bloques; para larvas y juveniles pequeños no es necesario la disección; siendo suficiente con solo incluir los organismos en los casetes, para el caso de larvas se pueden envolver en papel secante o pañuelos de papel, para evitar que salgan del casete durante el procesado.

1.- Primeramente se tomaron registros de las características físicas externas y se anotaron en la bitácora datos como longitud, sexo, apariencia, color, presencia de manchas o deformidades, etcétera o información que sirva de apoyo para un mejor diagnóstico histopatológico.

2.- Posteriormente se realizó un corte transversal en la región media del primer segmento abdominal, separando así la porción céfalo torácica de la abdominal.

3.- Se realizó corte longitudinal en la línea media ventral del cefalotórax se parando el cefalotórax en dos porciones iguales.

4.- Se tomó una porción y cortaron los apéndices (pereiópodos, maxilípedos antenas, etc.).

5.- Se extrajo cuidadosamente la mandíbula y exceso de alimento (esto para evitar melladuras en la navaja), cuidando de no retirar tejido epitelial, pues éste resulta de gran importancia en el diagnóstico de ciertas enfermedades como el TSV (Síndrome Viral del Taura).

6.-Se Realizó un corte transversal en la parte anterior del cefalotórax, a la altura de la base del pedúnculo ocular.

7.-Posteriormente la porción resultante se introdujo dentro del casete, en muestras muy grandes y gruesas fueron rebajadas de tal forma que el casete contenedor no la presionara (grosor de 4 mm aprox.) para el caso de organismos grandes estos fueron seccionados por partes perfectamente identificadas en el casete, procurando incluir en estas porciones los órganos o tejidos de mayor interés (órgano linfoide, corazón, estómago, hepatopáncreas, tejido hematopoyético, branquias y glándula antenal entre otros).

8.- El casete se señaló con la clave correspondiente a la muestra.

9.-Todos los casetes preparados son introducidos en solución al 70% de alcohol etílico (Lightner, 1996a).

### **1.3. Deshidratación de tejidos**

La deshidratación tiene como función la eliminación del agua para lograr la infiltración de la parafina, ya que esta no es soluble en agua; el proceso consiste en llevar los tejidos a una concentración de alcohol etílico de una forma gradual comenzando con una concentración de alcohol al 70% hasta alcohol al 100% con un tiempo de inmersión de una hora en cada una de las soluciones alcohólicas, hasta la inclusión de una solución de xileno (anexo 4). Para la realización de este proceso se utilizó un procesador de tejidos (Marca Leica modelo TP1040) (Lightner, 1996).

### **1.4. Infiltración en parafina y formación de bloque**

Una vez deshidratada la muestra, se sumerge en parafina líquida (56°C) durante dos horas, se recomienda para tal efecto realizar dos cambios de parafina con tiempos de una hora en cada uno de ellos, para después continuar con la elaboración de los bloques, procurando eliminar las burbujas, se recomienda que el tejido se coloque de una forma

estratégica, de tal manera que la porción de interés este orientada por el lado que será cortado por la navaja del microtomo, una vez listos estos se almacenan en un refrigerador a una temperatura de 5° C para facilitar su corte (Lightner, 1996).

### **1.5. Corte en microtomo**

- 1.-Una vez elaborados los bloques se procedió a cortar al microtomo a un grosor no mayor de 5 micrones.
2. Los cortes se extendieron en un recipiente con agua a 45° C y 0.12% de gelatina pura.
- 3.-Se seleccionó de la tira de cortes extendidos el que reuniera las mejores características e incluyera los tejidos de interés.
- 4.-Se montó sobre un portaobjetos el cual estaba previamente señalado con la clave correspondiente al tejido.
- 5.- Se dejó secar el tejido durante 24 hrs. a temperatura ambiente o bien en la estufa a 60° C con un tiempo de 30 minutos (Lightner, 1996).
- 6.- Posteriormente las preparaciones histológicas quedaron listas para ser observadas en microscopio de luz en objetivos de 10, 20, 40 y 100 X.

## ANEXO IV

### 2.1. Diagnóstico mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

- Se utilizó el kit comercial IQ2000™ (Copyright 2006 Farming IntelliGene Tech. Corp) para diagnóstico de WSSV el cual se empleó según especificaciones del fabricante y que se resume a continuación:
- Primer PCR PreMix (incluye amortiguador de reacción, dNTPs e iniciadores específicos de WSSV).
- PCR anidado PreMix (incluye búfer de reacción, dNTPs e iniciadores específicos de WSSV).
- Control positivo (contiene plásmidos del ADN de WSSV).
- ADN polimerasa IQzyme (enzima polimerasa).
- Marcador de peso molecular (contiene fragmentos de 848, 630 y 333 pares de bases).
- Búfer de Lisis (no especifica su contenido)

### 2. 2. Extracción de ADN

1) Una porción de tejido branquial y/o pleópodos de camarón de  $\approx 100 \mu\text{g}$  se puso en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.6 mL, enseguida se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de búfer lisis y con un pistilo estéril se maceraron perfectamente.

2) Posteriormente se calentó a  $95^\circ \text{C}$  en baño María durante 10 minutos, luego se centrifugó a 12,000 g durante 10 minutos.

3) Se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un nuevo tubo al cual se le adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de etanol al 95%.

4) Se mezcló con vórtex por 20 segundos y se centrifugó a 12,000 g durante 5 minutos, se eliminó el etanol por decantación y el resto del alcohol se dejó para evaporación durante 10 minutos a temperatura ambiente (en el fondo del tubo es visible un precipitado blanco donde se encuentra el ADN).

5) El precipitado se disolvió en 100  $\mu$ L de búfer TE agitándose con vórtex. En casos donde no fue posible continuar con el proceso descrito a continuación la muestra se guardó a  $-20^{\circ}$  C para posterior análisis.

### **2.3. Condiciones de reacción**

El empleo del IQ2000 <sup>TM</sup> comprende el uso de un PCR anidado descrito como un método mucho mas sensitivo en la determinación de infecciones sub-letales por WSSV que una PCR convencional.

Para lo cual fue necesario ingresar en el termociclador el siguiente programa de temperaturas.

a) Programa de primer reacción de PCR:

-Programar el termociclador a  $94^{\circ}$  C durante 30 segundos;  $62^{\circ}$  C durante 15 segundos;  $72^{\circ}$  C durante 30 segundos repetir 5 ciclos.

-Programar  $94^{\circ}$  C durante 15 segundos,  $62^{\circ}$  C durante 15 segundos,  $72^{\circ}$  C durante 20 segundos repetir durante 15 ciclos.

-Un ciclo final a  $72^{\circ}$  C durante 30 segundos y  $20^{\circ}$  C durante 30 segundos.

b) Programa de reacción de PCR anidado

Correr  $94^{\circ}$  C durante 20 segundos,  $62^{\circ}$  C durante 20 segundos y  $72^{\circ}$  C durante 30 segundos, repetir 25 ciclos.

Y por último un ciclo a  $72^{\circ}$  C durante 30 segundos y  $20^{\circ}$  C durante 30 segundos.

### **2.4. Preparación de reactivos.**

a) Mezcla de reactivos de reacción de primer PCR (8  $\mu$  L / reacción)

En un tubo de microcentrífuga de 1.6 mL se adicionó la siguiente mezcla de reactivos por cada muestra:

Primer PCR PreMix	7.5 $\mu$ L
IQzyme DNA polimerasa 2 U / $\mu$ L	0.5 $\mu$ L

b) Mezcla de reactivos de reacción para PCR anidado: 15  $\mu$  L / reacción

En otro tubo de microcentrífuga de 1.6 mL se adicionó la siguiente mezcla de reactivos por cada muestra:

PCR anidado PreMix	14 $\mu$ L
IQzyme DNA polimerasa 2 U / $\mu$ L	1 $\mu$ L

## **2.5. Procedimiento de la reacción**

1. Primero se prepararon los reactivos de ambas reacciones como se indicó arriba de acuerdo al número de muestras. Para cada mezcla de reacción fue necesario incluir tres controles positivos ( $10^3$ ,  $10^2$  y  $10^1$ ).
2. Se adicionan 8  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reactivos de la primer reacción de PCR (**a**) a cada tubo de 0.2 mL (tubo de reacción).
3. Se adicionan 2  $\mu\text{L}$  de la muestra “templado” o del estándar (control positivo) al tubo de reacción.
4. Se ponen los tubos de reacción en el termociclador y se corre el programa de la primer reacción de PCR.
5. Una vez concluido el primer programa se adiciona a cada tubo 15  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reactivos de la reacción de PCR anidado (**b**).
6. Se da inició al programa de reacción de PCR anidado.
7. Después de que el programa termina se toman del tubo de reacción 5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR y se mezclan y con 1  $\mu\text{L}$  de colorantes de carga 5X (xilencianol y azul de bromofenol en Ficoll). Esta mezcla esta lista para cargar el gel de electroforesis.
8. Los tubos de reacción con los productos de PCR se guardan a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  como respaldos.

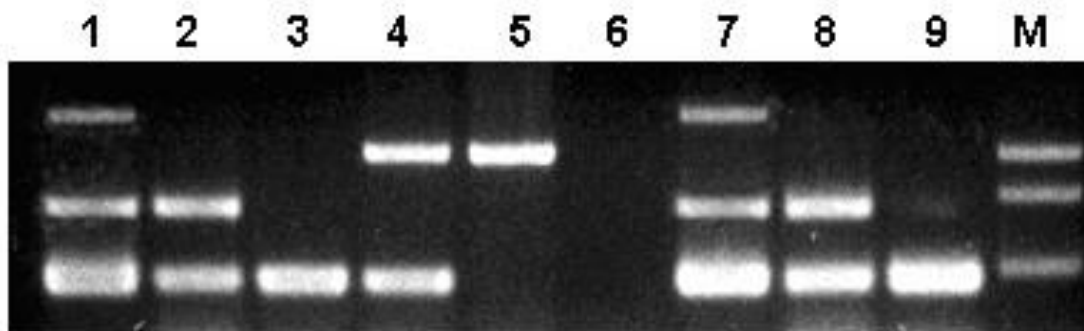
## **2.6. Electroforesis**

Los productos de PCR se visualizaron por medio de la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2.0%. Una vez cargados los pozos del gel, se cubrió con búfer TE y se aplicó una carga de 100 voltios por 1 hora. El gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Como referencia se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular incluido en el kit (fragmentos de 848, 630 y 333 pares de bases).

## **2.7. Diagnóstico**

Se hicieron las siguientes consideraciones de acuerdo a los patrones de bandas típicas observadas en el gel de electroforesis (Figura 4). Además se consideraron casos positivos

las bandas formadas en 296 pares de bases y/o 550 pares de bases. Asimismo, como lo indica el instructivo una sola banda formada en 848 pb se consideró caso negativo de WSSV y bandas no observadas en el gel se asociaron ADN de mala calidad.



**Figura A-IV-1.** Resultados típicos del diagnóstico obtenidos en el kit de detección IQ2000™ para WSSV (información proporcionada por el fabricante). Carril 1 (C-1): muestra con infección severa del WSSV, C-2: muestra con infección media del WSSV, C-3: muestra con infección ligera del WSSV, C-4: muestra con infección muy ligera del WSSV, C-5: Muestra negativa del WSSV, C-6: Agua tridestilada, C-7: WSSV P(+) estándar, 2000 copias/reacción, C-8: WSSV P(+) estándar, 200 copias/reacción, C-9: WSSV P(+) estándar, 20 copias/reacción, C-M: marcador del peso molecular, 848 pbs, 630 pbs, 333 pbs.