

RESUMEN

Las enfermedades han emergido como un serio impedimento económico para el éxito de las granjas de camarón, evidenciando una amenaza a la sustentabilidad de los recursos debido a la presencia de virus exóticos y organismos oportunistas.

Para determinar los organismos patógenos que afectan el cultivo de camarón, *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931, en el Parque Acuícola "El Tobarí Cajeme, Sonora, se consideraron los organismos oportunistas y su asociación con los parámetros fisicoquímicos del agua, para implementar medidas de bioseguridad que eviten pérdidas mayores.

Un total de 132 camarones, *L. vannamei* Boone, 1931, fue examinado, encontrando una prevalencia total para *Vibrio alginolyticus* 34%; *V. parahaemolyticus* 17.4%; *V. vulnificus* 3.7%; *Zoothamnium penaei* 87.1% y *Nematopsis penaeus* 65.1%.

Las lesiones características, nódulos o granulomas, se encontraron en hepatopáncreas y órgano linfóide, con un diámetro promedio de 60.4µm entre un rango de 20-150µm, correspondiendo a lo estimado por Bell (1991). Además se observó descamación del epitelio hepatopancreático e intestino provocado por las especies de vibrios.

Vibrio alginolyticus, *V. parahaemolyticus*, *Zoothamnium penaei* y *Nematopsis penaeus* fueron más frecuentes en los meses de Junio y Agosto que estadísticamente presentaron diferentes grados de comportamiento basándose en el método de correlación de Spearman con los factores ambientales. Sobresaliendo principalmente el incremento de *V. alginolyticus* al aumentar la temperatura matutina y vespertina ($r = 0.103$ y 0.045), disminución del oxígeno disuelto matutino y vespertino ($r = -0.223$ y -0.018) y salinidad ($r = -0.232$). *V. parahaemolyticus* muestra un decrecimiento al aumentar la temperatura matutina y vespertina ($r = -0.300$ y -0.202), e incrementa al disminuir el oxígeno disuelto matutino y vespertino ($r = 0.330$ y 0.341) y salinidad ($r = 0.029$). *Zoothamnium* y *Nematopsis* siempre estuvieron presentes sin importar los factores ambientales registrados. Factores que indican un comportamiento similar a lo indicado por Bell (1991) con respecto al aumento de temperatura y salinidad. Las pérdidas de producción causada por la epizootia provocada por especies de *Vibrios* en camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931, fueron mayores del 60% en cada estanque y una pérdida total del 73.57 % para el Parque Acuícola "El Tobarí" con un rango de 60.10 % a 86.50 % en la localidad.

INTRODUCCION

Litopenaeus vannamei Boone, 1931, es la especie de camarón más ampliamente cultivada en México, por su fácil manejo, rango natural se extiende desde las costas del Pacífico Mexicano al Perú. La tendencia del cultivo de camarón en México, en general, se inclina hacia los semi-intensivos e intensivos, por lo tanto, los problemas de enfermedad están ampliamente influenciados por la intensidad de producción del sistema de cultivo. Las granjas de engorda con alta densidad de población o biomasa, se predisponen al fracaso de cosechas, lo cual resulta por el declinamiento de las condiciones ambientales y al ataque de enfermedades infecciosas (Brock y Main, 1994)

El impacto más significativo de las enfermedades en la producción, es la mortalidad en masa de los cultivos. Por la alta densidad de población, en el confinamiento de la engorda se produce estresamiento y algunos microorganismos oportunistas del camarón, ocasionalmente llegan a ser factores de enfermedad (Johnson, 1995)

Actualmente las enfermedades han emergido como un impedimento económico para el éxito de las granjas de camarón, convirtiéndose en una seria amenaza para la sustentabilidad de los recursos debido a la presencia de virus exóticos y organismos oportunistas.

Entre algunos patógenos más frecuentemente reportados en el Estado de Sonora, México, se encuentra el Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodermal y Hematopoyética (Infectious Hypodermal and Hematopoyetic Necrosis Virus = IHNV), Enfermedad del Virus *Baculovirus penaei* (*Baculovirus penaei* virus disease = BP), Virus de la Vacuolización del Organo Linfoide (Lymphoid Organ Vacuolization Virus = LOVV), bacterias *Vibrio* spp., *Leucothrix mucor*, hongos *Fusarium* sp. y *Langenidium* sp.; protozoarios *Zoothamnium* sp., *Vorticella* sp. y *Epistylis* sp.; gregarinas *Nematopsis* sp. y *Cephalolobus* sp.; microsporidios *Ameson* sp. (Lightner y Pérez, 1993).

Aunado al crecimiento y expansión del cultivo de camarón, ha aumentado el interés por evitar la propagación de enfermedades, mediante la aplicación de medidas de bioseguridad y monitoreos de detección de patógenos, que han puesto en dilema la capacidad de producción de las granjas de engorda de camarón y su rentabilidad económica.

Por lo tanto, es necesario conocer las enfermedades, sus medidas preventivas y correctivas que deben aplicarse para aspirar al éxito en una empresa camaronícola.

HIPOTESIS

Los agentes patógenos que actúan en forma secundaria u oportunista, generalmente se desarrollan más rápido bajo factores ambientales que les favorecen y actúan así como detonadores; en estrecha asociación con los parámetros fisicoquímicos presentes en un brote de enfermedad en camarón cultivado.

OBJETIVO

Determinar los agentes patógenos que afectan el cultivo de camarón en el Parque Acuícola "El Tobarí", mediante la identificación de organismos patógenos u oportunistas y su asociación con los parámetros fisicoquímicos del agua, con lo cual se implementarán medidas de bioseguridad para evitar pérdidas mayores.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1. Identificar los agentes patógenos que afectan el cultivo de camarón, *Litopenaeus vannamei*, en el Parque Acuícola "El Tobarí" mediante un diagnóstico rápido y oportuno para una referencia futura.**
- 2. Determinar la prevalencia de patógenos asociados a la enfermedad mediante un conteo muestral para su ordenamiento por importancia.**
- 3. Determinar la correlación de patógenos con las variables fisicoquímicas de cada punto de muestreo mediante el análisis de Spearman para su interpretación significativa con la enfermedad.**

ANTECEDENTES

Foster *et al.* (1978) realizan un estudio de ultraestructura de ectocomensales peritrichios *Zoothamnium* sp. de *Penaeus aztecus* y *P. setiferus*. Observan que el espasmonema contráctil está rodeado de túbulos estriados que parecen desarrollarse del cilio escopular. La superficie pelicular es crenada y tiene numerosos poros. La base del tallo ciliar forma un disco circular que se fusiona con la epicutícula pero no penetra la cutícula o el epitelio del camarón. Las microfibrillas entrelazadas y las partículas osmofílicas en el tallo se acumulan a lo largo de la base y se fusiona con la superficie cuticular de la cubierta. Concluyen que este modo de fijación no inflige daño al tejido del hospedero y no produce una respuesta patológica. El camarón aparentemente se sofoca cuando colonias densas reducen el área de superficie respiratoria.

Lightner (1985) afirma que muchas de las enfermedades importantes son causadas por organismos que son parte de la microflora y microfauna normal del camarón. Por lo tanto, los patógenos oportunistas causan enfermedad solo bajo condiciones que les favorecen sobre el hospedero.

Anderson *et al.* (1987) encuentran que histológicamente las rickettsias parecen ser las responsables primarias de la enfermedad con infecciones bacterianas secundarias contribuyendo a mortalidades de *Penaeus monodon* cultivado en estanques con agua salobre en Malasia. Aseguran que el virus

***Baculovirus monodon* (MBV) y un virus parecido a Reo pueden facilitar la infección rickettsial o contribuir al debilitamiento del camarón.**

Egusa *et al.* (1988) realizan un estudio en camarones infectados naturalmente con *Vibrio* sp. y otros infectados experimentalmente, comparados histopatológicamente no encontraron diferencias entre los dos ensayos, observaron que la mayoría de los cambios histopatológicos son necrosis extensiva causada por una severa invasión bacteriana y múltiple formación de nódulos melanizados en el órgano linfoide.

Jiménez (1991) efectuó un análisis de gregarinas asociado al deterioro del crecimiento en *Penaeus vannamei*. Concluye que la mayor concentración de gregarinas está asociada a intestinos vacíos o parcialmente vacíos, con tasas de crecimiento con promedios bajos entre 12 g y 15 g. Afirma que, cuando el desarrollo del parásito es masivo en camarones de menor talla, origina mortandad asociada a un fuerte desarrollo de protozoarios epibiontes e infecciones bacterianas avanzadas hasta septicémicas y los camarones que registran mayor número de gregarinas tienen una tendencia de mayor grado de incidencia de *Baculovirus penaei*, posiblemente asociado a una infección primaria.

Miller y cols. (1991) realizan un análisis de *Nematopsis* en *Penaeus vannamei* y concluyen que existe una relación indirecta entre la supervivencia y la severidad de la infección Nematopsica. Mencionan que los alimentos medicados administrados no mitigan la infección como para mejorar la supervivencia, sino

que, la procedencia de las larvas parece ser un factor importante ya que las salvajes mostraron menor severidad por la infección y mayor supervivencia que las de laboratorio.

Nash *et al.* (1992) mencionan que la bacteria oportunista del género *Vibrio* es un serio problema en cultivos intensivos del camarón tigre gigante, *Penaeus monodon*, en el área Central dentro del Golfo de Tailandia. Consideran la infección como secundaria, relacionada al estrés causado por condiciones ambientales no óptimas o inestables, alta densidad de población o manejo inadecuado. Registran en análisis bacteriológicos e histológicos desde 1988, las especies de vibrios identificadas como *Vibrio parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. damsela* y *V. alginolyticus* con variaciones por estación y prevalencia. Histológicamente revelan una necrosis significativa e inflamación especialmente en el órgano linfoide, levemente severa en branquias, corazón, hepatopáncreas y algunas veces otros tejidos.

Li *et al.* (1992) realizan un estudio histopatológico y de ultraestructura en el hepatopáncreas con enfermedad de la pata roja y branquia amarilla de *Penaeus chinensis*. Observan una severa invasión bacteriana caracterizada con una necrosis extensiva en el hepatopáncreas.

Chen y Zhang (1993) observan en cortes histopatológicos de la enfermedad pudrición de la branquia en *Penaeus monodon*, lesiones de filamentos branquiales atrofiados y necrosis por infección de bacilos. Encuentran el epitelio

lamelar desfoliado, masas bacilares en sangre branquial y el hepatopáncreas, estomago, intestino y corazón, presenta morfotropismo de la necrosis de tejido en la lesión por toxina. Concluyen que la mortalidad del camarón es causada por la bacteria y que el resultado de la bacteriotoxina en las branquias y hepatopáncreas bloquean su funcionalidad.

Miller *et al.* (1994) desarrollan un método de diagnóstico relativamente rápido para determinar la incidencia y severidad de la infección por la gregarina *Nematopsis* en poblaciones de camarón en estanques de granjas en Ecuador. Además realizan pruebas de alimento medicado en un esfuerzo por controlar el parásito.

Mohney *et al.* (1994) mencionan una epizootia masiva de vibriosis, llamada "Síndrome de Gaviota" por los granjeros locales de camarón, desde 1987 hasta 1990 en estanques de cría y engorda en granjas localizadas en el Golfo de Guayaquil cerca de Guayaquil, Ecuador. Registran niveles acumulativos desde leves en algunos estanques hasta más del 90 % en otros. Examinan el camarón afectado, *Penaeus vannamei* Boon, e identifican las especies predominantes como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. alginolyticus* usando el sistema API-NFT. Afirman que las epizootias coinciden con el segundo año de sequía severa en el Ecuador. De esta manera, la descarga de agua dulce del Río Guayas se redujo y la salinidad y la concentración relativa de nutrientes se elevaron en el Golfo de Guayaquil. Estas condiciones ambientales fueron ideales para el incremento de crecimiento de los vibrios causales en las aguas del estuario y

creen que son los factores que contribuyeron a las epizootias ocurridas entre 1989-1990.

Bower (1996) efectúa una sinopsis de la enfermedad de gregarinas de camarones penaeidos, su impacto en el hospedero, técnicas de diagnóstico y métodos de control. Describe que los trofozoitos y gametocitos se presentan en el lumen y frecuentemente unidos al revestimiento interior del intestino, interfieren la reabsorción en lumen del intestino o bloqueos intestinales ocasionales, siendo de poca importancia patológica en el hospedero, sin embargo pueden ocurrir infecciones severas en el cultivo de *Penaeus vannamei*.

Krishna *et al.* (1997) estudian un brote catastrófico del virus de la mancha blanca, devastando el cultivo de camarón en la India. Encuentran obstrucciones por *Zoothamnium* sp. , bacterias como *Vibrio* sp. y *Aeromonas* sp., mediante técnicas histológicas. Concluyen que el problema fue provocado por una enfermedad viral primaria con una severa infección secundaria por *Vibrio* spp., como consecuencia de la pobre calidad de agua y fondo.

MATERIAL Y METODO

Localización del área de estudio.

El estudio se realizó en los estanques de los nueve grupos ejidales que conforman el Parque Acuícola "El Tobarí" afiliados a la Unión de Ejidos del Sur de Sonora (Fig. 1). Su localización geográfica se ubica en la costa del Estado de Sonora, México, cerca del estero Jiamora a los 27°09'56" Latitud Norte y 110°03'08" Longitud Oeste; (INEGI, carta topográfica G12B43).

Colecta y examen en el área de estudio.

Se colectaron un total de 132 camarones durante los meses de junio, julio y agosto. Diez ejemplares de uno, ocasionalmente dos estanques de cultivo, de cada uno de los nueve grupos ejidales del Parque Acuícola "El Tobarí", utilizando una atarraya de 3 m de diámetro con una luz de malla de ½ pulgada.

El muestreo se realizó en función a una única muestra mensual para la obtención de medias de parámetros, porcentajes de prevalencias y determinación de la presencia o ausencia de la enfermedad. El método de muestreo fue no probabilístico de conveniencia, ya que se decide que organismos forman parte de la muestra, en función de poseer o no un signo característico de enfermedad (Ortega y de Blas, 1998).

Para el análisis microbiológico, las muestras de hemolinfa fueron extraídas de la arteria ventral de camarones vivos con jeringas de 3 ml ó 1ml. También se extrajeron asépticamente pequeñas biopsias de tejido de hepatopáncreas del camarón. Además se tomaron algunas postlarvas de camarón de menos de 1 cm de longitud. El material colectado se colocó en tubos con solución salina al 2.5 % para su transporte al laboratorio de diagnóstico. Para el análisis histológico, en su momento, se procedió a la fijación de organismos con solución AFA-Davidson para los exámenes histopatológicos (Bell y Ligthner, 1988; Ligthner, 1996).

Los registros de parámetros fisicoquímicos de cada estanque de muestreo fueron temperatura matutina y vespertina, oxígeno matutino y vespertino, salinidad, pH y turbidez, sobre la base de que contribuyen al mejor balance fisiológico de los organismos en cultivo, además de presentar una interrelación entre ellos mismos, cuyos efectos resultan en la predisposición a los agentes infecciosos oportunistas.

Identificación de organismos patógenos.

1). Determinación Bacteriológica.

Las muestras de hemolinfa y hepatopáncreas se inocularon en un medio de enriquecimiento de caldo soya tripticasa adicionado con el 2.5 % de NaCl para un mayor crecimiento de bacterias, incubando a 25-30°C por 24hr. Enseguida se inocularon de 1 a 3 asadas por estría cruzada en placas conteniendo agar TCBS

para el aislamiento de colonias características del patógeno, incubando a 25-30°C por 24hr. Posteriormente al crecimiento bacteriano obtenido, se registraron las características morfológicas y se realizó la prueba de Gram y oxidasa (Carvaca, 1990). Por último la cepa aislada se inoculó en tubos inclinados con agar soya tripticasa adicionado con el 2.5 % de NaCl para su envío al Centro Nacional de Sanidad Acuícola, para su seguimiento en el sistema de identificación API-NFT.

2). Determinación Histopatológica.

Los organismos preservados en Davidson se procesaron por la técnica histopatológica mediante la realización de cortes con un microtomo marca Erma y teñidos con Hematoxilina & Eosina (Bell y Ligthner, 1988; Ligthner, 1996), para su posterior interpretación.

Los cortes histológicos observados positivamente se fotografiaron con la ayuda de un fotomicroscopio Carl Zeiss III y cámara fotográfica Nikon montada en un microscopio compuesto Olympus CH 30. Por otra parte, a las lesiones características de enfermedad se les realizó un análisis morfométrico con un ocular 8X calibrado y objetivo 40X, montados en un microscopio Carl Zeiss Jr.

3). Determinación de prevalencia de patógenos.

Se determinó la prevalencia de cada uno de los patógenos como uno de los parámetros de medición del proceso patológico, que determina la frecuencia con

la que el proceso patológico se presenta en una población acuícola y se define de la siguiente manera:

No. Animales enfermos

$$P = \frac{\text{No. Animales enfermos}}{\text{Población total en riesgo de presentar la enfermedad}}$$

Donde, P equivale a la relación entre el número de animales enfermos en el momento o periodo de tiempo que se ha definido y el número total de animales en riesgo de padecerla, incluido los enfermos (Ortega y cols, 1998)

Por otra parte, se determinó el grado de severidad (infección/infestación) para protozoarios ciliados epicomensales y gregarinas basándose en el criterio de Lightner (1996).

4). Correlación de patógenos con variables fisicoquímicas.

Posteriormente se realizó el análisis estadístico de los datos de frecuencias y/o ausencia de patógenos contra las variables fisicoquímicas, de temperatura matutina y vespertina, oxígeno matutino y vespertino, salinidad, pH y turbidez, mediante la Correlación de Spearman (Zar, 1999), haciendo uso del paquete estadístico, SPSS (Statistical Package Science Social) Version 8.0 for Windows and NT(C), para determinar la asociación significativa con la enfermedad.

Calle Tres Calle Uno Calle Meridiano



Calle 1900

Fig. 1. Microlocalización del Parque Acuicola "El Tobarí", su ubicación geográfica se encuentra en la costa del estado de Sonora, México, cerca del estero Jiamora a los 27°09'56" Latitud Norte y 110°03'08" Longitud Oeste; (INEGI, carta topográfica G12B43)

RESULTADOS

1). Identificación de organismos patógenos.

BACTERIOSIS.

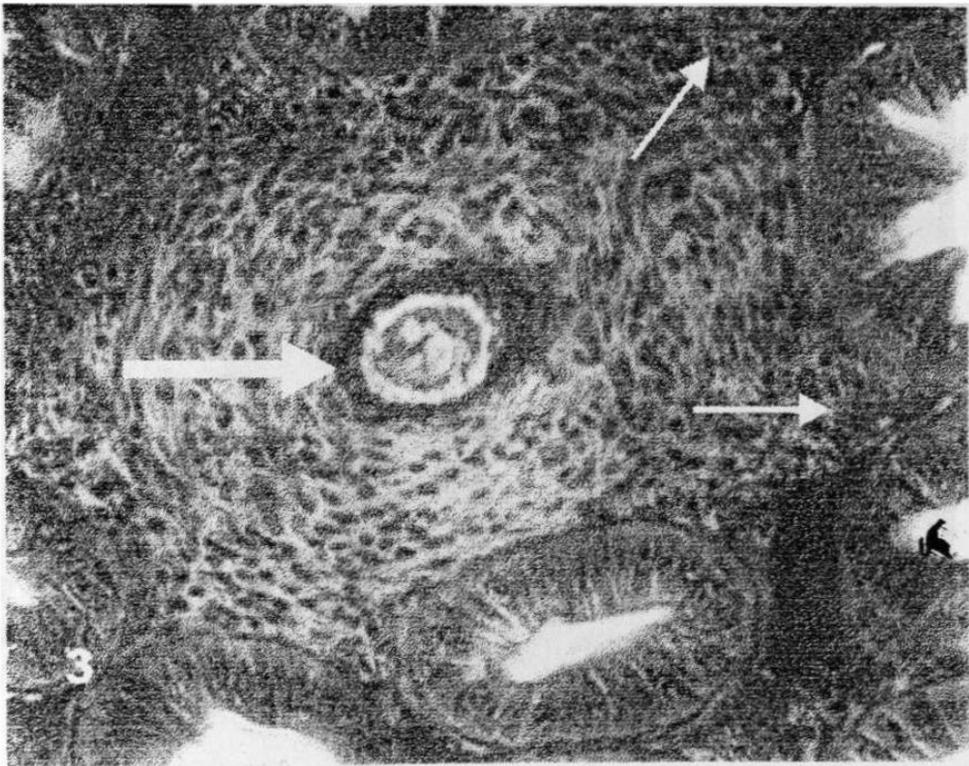
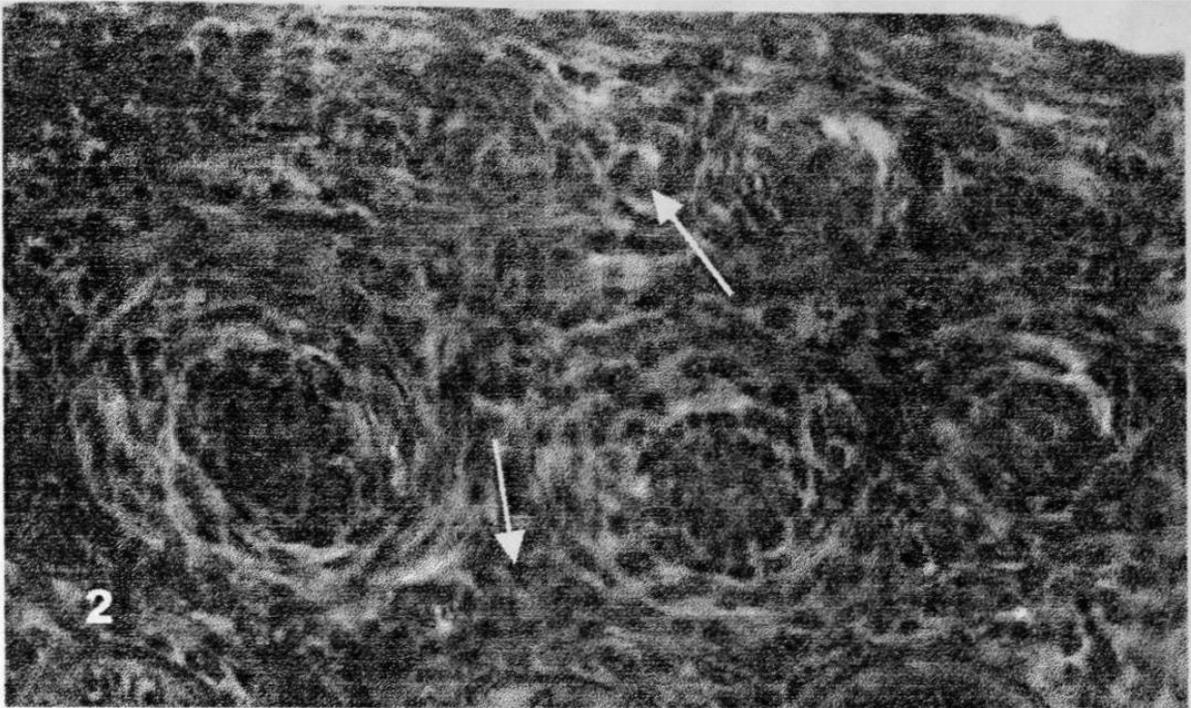
Observación de signos: Los camarones mostraron signos de cambio de coloración, de translúcidos verdosos hasta un blanco opaco. Algunos organismos mostraron lesiones cuticulares melanizadas en los bordes ventrolaterales del caparazón. Otros presentaron un ligero oscurecimiento de la porción dorsal del integumento, debido a la expansión de melanoforos integumentales, además de tener los periopodos y pleopodos rojizos, usualmente mostrado por algunos camarones. Unos pocos presentaron el hepatopáncreas de color café claro a oscuro y branquias sucias cafezosas.

Durante el mes de julio se observó típicamente al camarón más letárgico, nadando despacio cerca de la superficie y bordes del estanque, por lo que era presa fácil de un número moderado de aves acuáticas tal como las gaviotas.

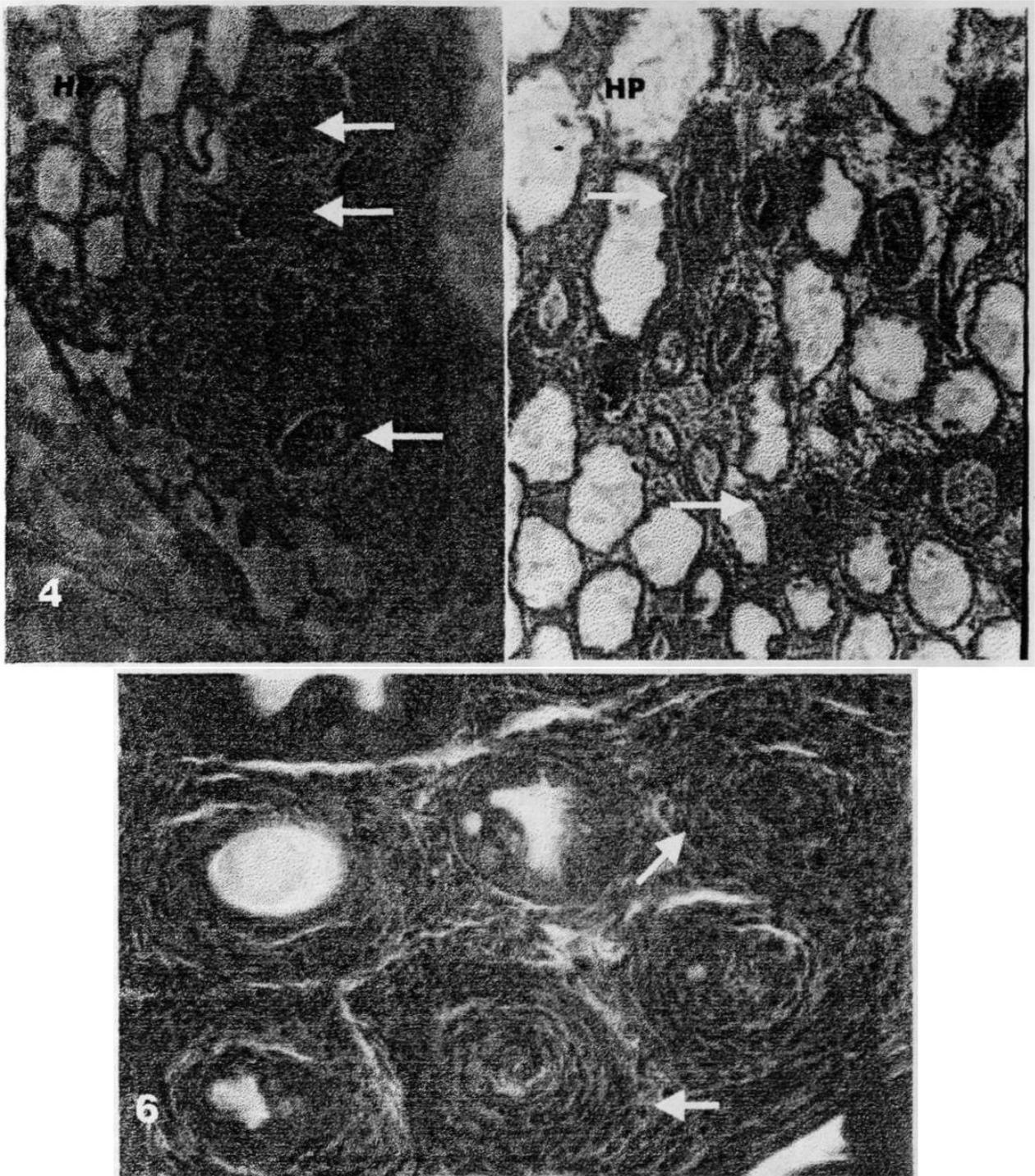
Aislamiento e identificación: Los cultivos puros aislados de camarón con signos de enfermedad examinados de los estanques de engorda de los grupos ejidales que conforman al Parque Acuícola "El Tobarí", Cajeme, Sonora. Fueron identificados como organismos Gram negativos y oxidasa positiva del género

***Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. Vulnificus*, *Aeromonas* spp. y *Bacillus* spp (Tabla 1).**

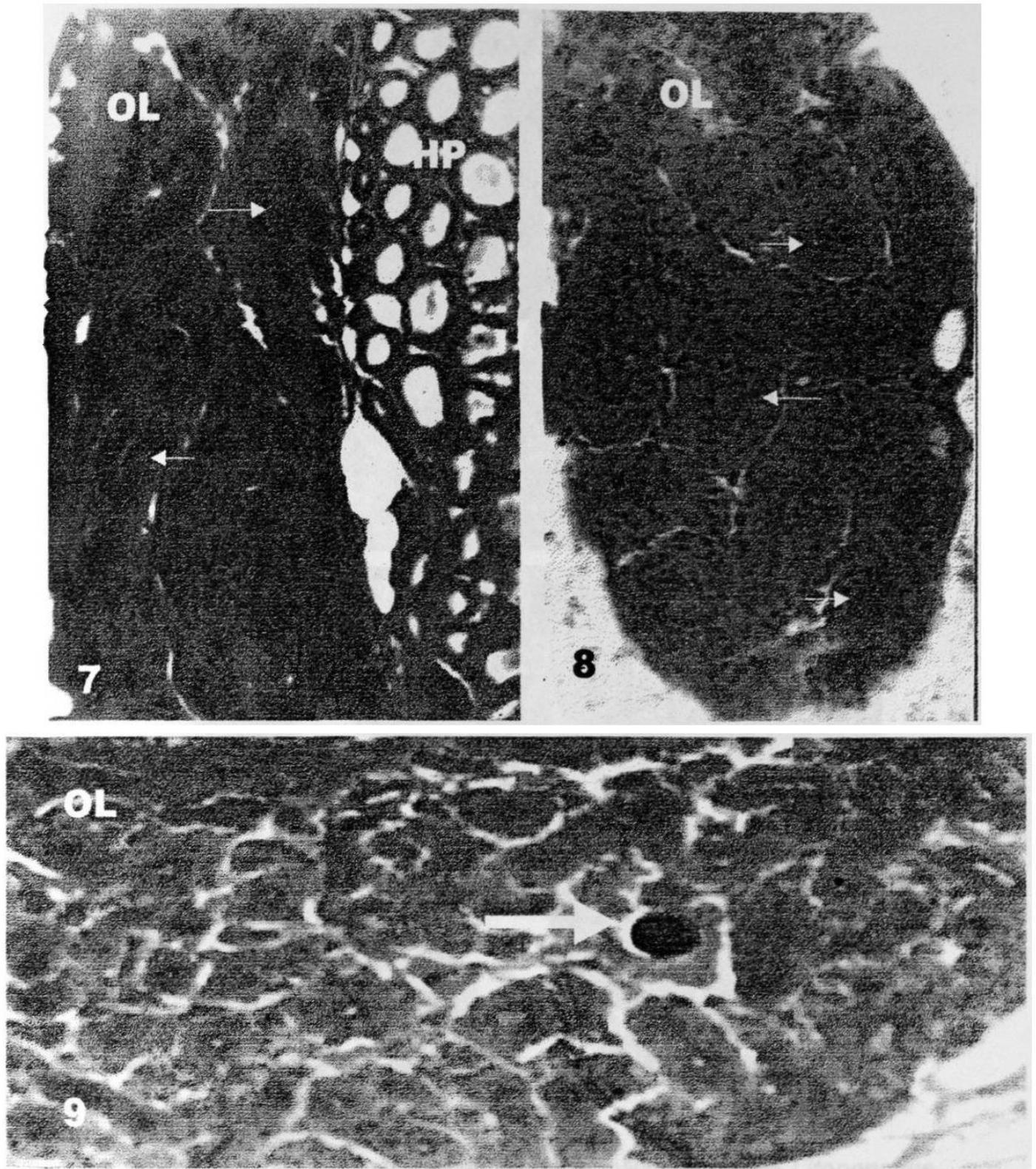
Histopatología: En un examen riguroso de los cortes histológicos de los camarones infectados con bacterias se encontró que contienen pequeñas y numerosas lesiones focales y nódulos hemocíticos no melanizados con centros sépticos en el tejido hepatopancreático con expansión significativa de los senos (Figs. 2 y 3), pero frecuentemente se observan lesiones granulomatosas melanizadas o nódulos con agregados de hemocitos o bacterias en las áreas necróticas de los hepatopanceocitos o en el lumen del túbulo hepatopancreático. Las estructuras fibrosas o parecidas a granulomas midieron de diámetro promedio de 60.4 μm entre un rango de 20-150 μm (n=50) de un total de 50 nódulos observados (Figs. 4, 5 y 6). En órgano linfoide se encontraron áreas necróticas en el lumen de la matriz de células estromales (Figs. 7 y 8), en otros se observan lesiones granulomatosas melanizadas o nódulos con agregados de hemocitos o bacterias en las áreas necróticas del lumen de la matriz de células estromales (Fig. 9). Otro hallazgo fue la presencia de los túbulos hepatopancreáticos hipertrofiados (Figs. 10 y 11) y descamación de las células del epitelio de hepatopáncreas y del intestino medio (Figs. 11, 12 y 13).



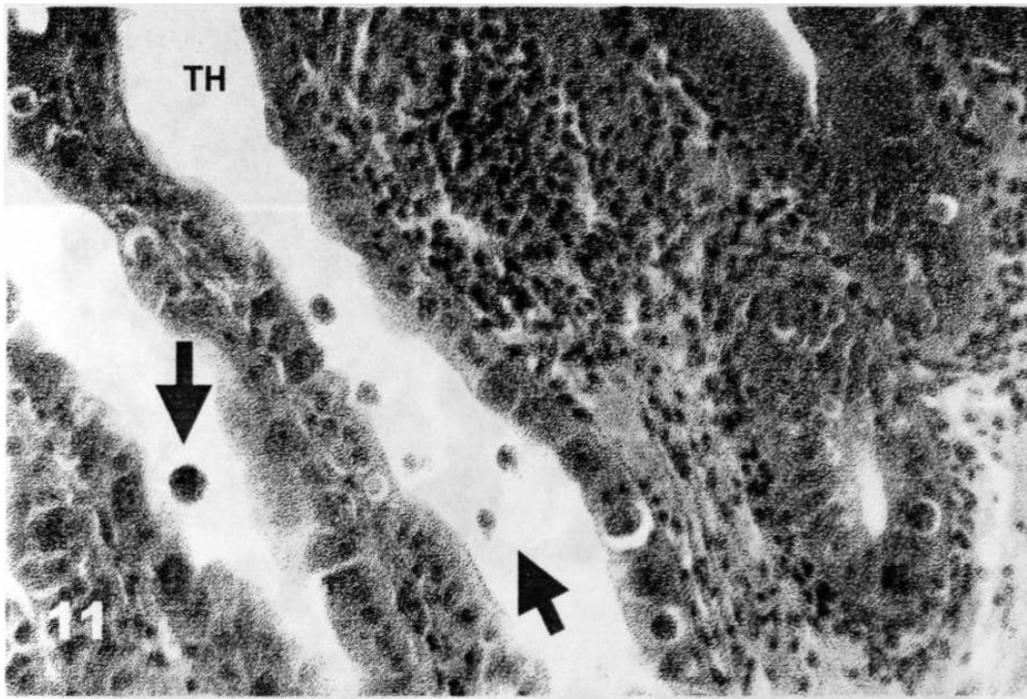
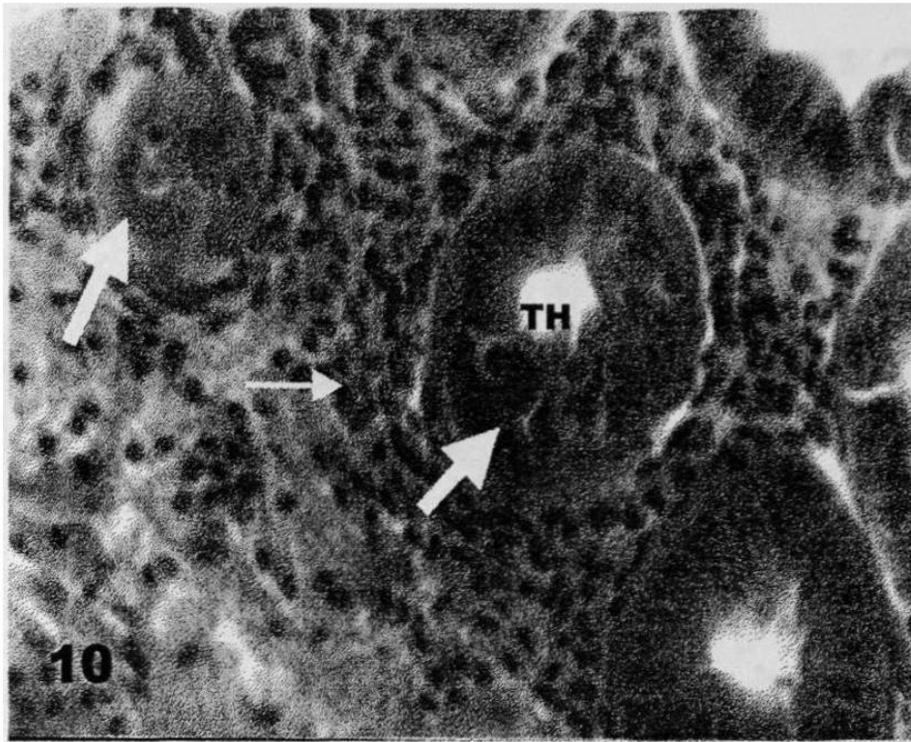
Figs. 2-3 Lesiones histopatológicas en hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* del Parque Acuícola "El Tobarí" Cajeme, infectado con *Vibrio* spp. Nódulo hemocítico melanizado (flecha amarilla gruesa) con expansión significativa de los senos entre los hepatopancreocitos (flechas amarillas delgadas) teñidos con H&E a 200X.



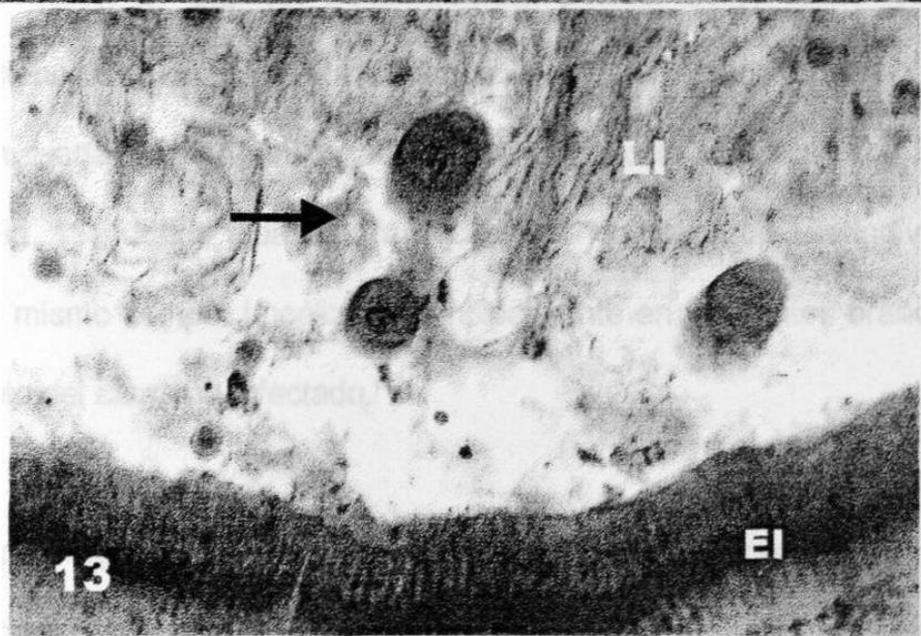
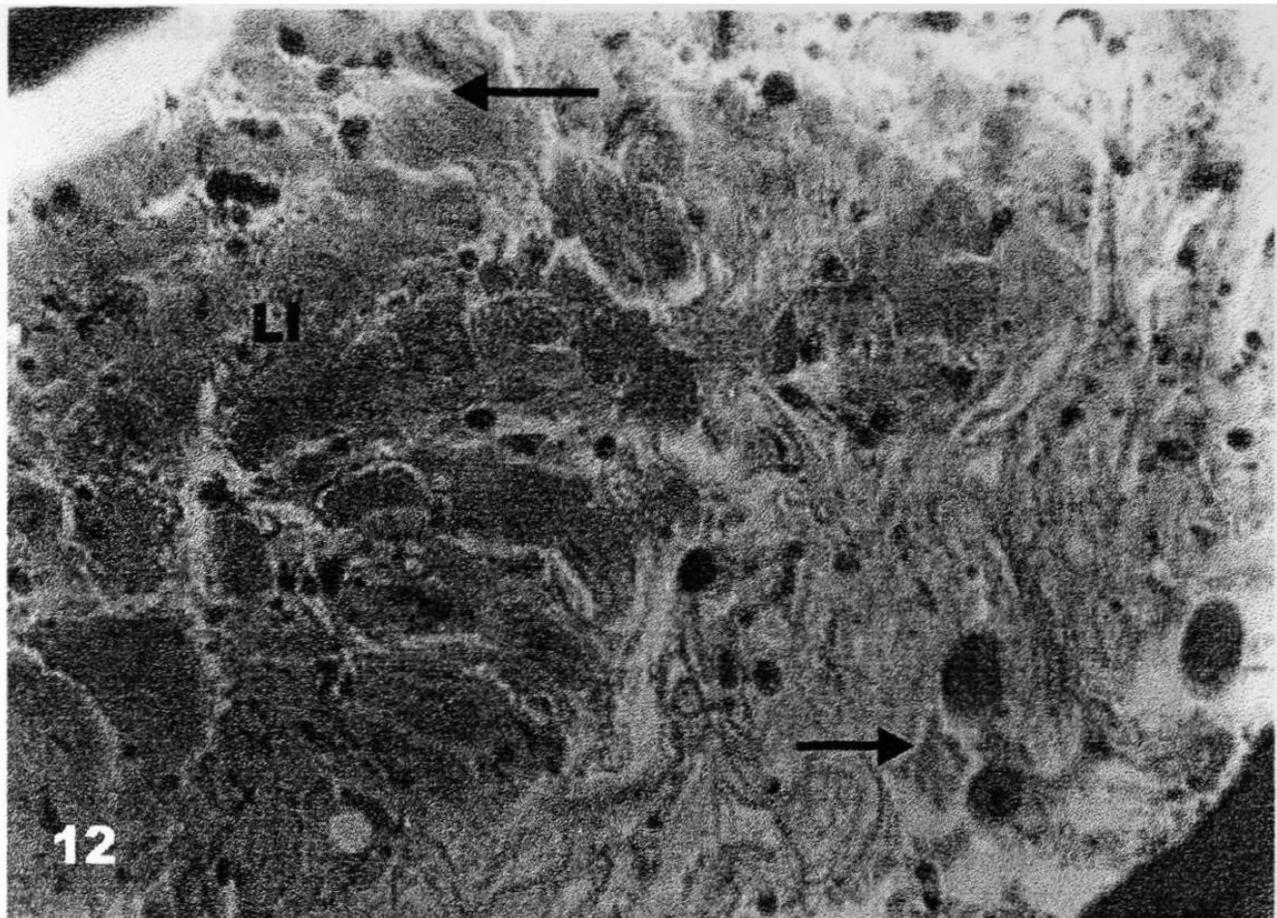
Figs. 4-6 Cambios histopatológicos en hepatopáncreas (HP) de *Litopenaeus vannamei* del Parque Acuícola "El Tobarí" Cajeme, infectado con *Vibrio* spp. Fig. 4 y 5: Vista panorámica de lesiones granulomatosas melanizadas (flechas amarillas) en lumen de túbulos hepatopancreáticos teñidos con H&E a 35X. Fig. 6: Acercamiento de nódulos con agregados hemocíticos (flechas blancas) en áreas necróticas en el lumen del túbulo hepatopancreático teñidos con H&E a 200X.



Figs. 7-9 Cambios histopatológicos en órgano linfoide (OL) de *Litopenaeus vannamei* del Parque Acuícola "El Tobarí" Cajeme, infectado con *Vibrio* spp. Fig. 7-8: Áreas necróticas en el lumen de la matriz de células estromales (flechas amarillas delgadas) en órgano linfoide teñidos con H&E a 45X. Fig. 9: Acercamiento de lesión gránulomatosa melanizada (flechas amarilla gruesa) en el lumen de la matriz de las células estromales teñidas con H&E a 100X.



Figs. 10-11 Lesiones histopatológicas en hepatopancreocitos de *Litopenaeus vannamei* del Parque Acuícola "El Tobarí" Cajeme, infectado con *Vibrio* spp. Fig. 10: Túbulo hepatopancreático hipertrofiado con proceso de descamación de las células epiteliales de hepatopancreocitos (flechas amarillas gruesas) con agregados de células hemocíticas (flecha amarilla delgada) teñidos con H&E a 632X. Fig. 11: Descamación de células epiteliales en el lumen del túbulo hepatopancreático (flechas rojas) teñido con H&E a 100X.



Figs. 12-13 Descamación de células epiteliales (flecha azul) en el lumen del intestino medio (LI) en *Litopenaeus vannamei* del Parque Acuícola "El Tobarí" Cajeme, infectado con *Vibrio* spp. Teñido con H&E a 400X.