I.- RESUMEN

La industria de la camaronicultura ha tomado gran importancia en nuestro país, debido a las grandes inversiones v entrada de divisas, va que el camarón que se produce es principalmente de exportación, además de generar empleos a miles de personas y dar utilidad a zonas rurales poco productivas para la agricultura. El camarón cultivado ocupa la rama más importante dentro de la acuacultura y es cada vez más aceptable en el consumo humano, sin embargo, los cultivos de camarón son afectados por la presencia de todo tipo de enfermedades entre las que se encuentran las de tipo viral. El objetivo del trabajo de investigación es analizar las patologías causadas por virus, bacterias y protozoarios durante las pérdidas masivas en condiciones de cultivo de la grania camaronícola denominada Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera Ejidal "El Pataque", ubicada en El Dorado. Sinaloa. México donde la especie cultivada fué *Litopenaeus vannamei*. Se describe al virus de la mancha blanca (WSSV) y otros agentes patógenos que afectan el cultivo de camarón basado en estudios histológicos y de microscopía electrónica de transmisión. Se colectaron los organismos con redes de malla, el muestreo dirigido fué hacia aquellos que presentaron síntomas de enfermedad. Las muestras para histología se fijaron en Davidson AFA y RF, para MET en glutaraldehido 6% a 4 °C y para bacteriología se trasladaron al laboratorio en solución salina 2.5 %. se trabajó en los laboratorios del Centro Nacional de Sanidad Acuícola en la U.A. N. L. El WSSV, en estudio histopatológico se observó en branquias y tejido subcuticular causando principalmente necrosis multifocal con inclusiones virales eosinofilicas o basofilicas intracelulares, cromatina marginal muy marcada, picnosis y atrofia nuclear. El virus del síndrome de Taura (TSV) en branquias y tejido subcuticular, causó lesiones multifocales, inclusiones virales basofilicas. con estadíos iniciales, agudos o crónicos. El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) se presentó en tejidos branquial y subcuticular, desarrollando los cuerpos de inclusión basofilicos e intracelulares, cromatina marginal, hipertrofia nuclear. En lo referente a protozoarios, se

encontraron gregarínas del género *Nematopsis* sp. en intestino y estómago. Adheridos a branquias y subcutícula: *Zootamnium* sp., *Epystilis* sp y *Acineta* sp. En estudio ultraestructural se presenta a WSSV como partículas no ocluídas en forma de varilla, con una extensión apical envuelta, los cuerpos de inclución se encontraron en el núcleo de la célula con tendencia hacia las orillas y la cromatina marginal muy marcada. Los viriones midieron 172.61 X 70.23 nm en promedio, la nucleocápcide 167.85 X 49.28 nm, la envoltura fué de 12.85 nm y tiene una estructura de pared trilaminar; la pared externa midió 6.90 nm en promedio. Se identificaron bacterias del género *Vibrio*, en mayor cantidad a *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* y *V. fluvialis*. Se realizó la correlación de Spearman entre los parámetros fisicoquímicos del agua más importantes y las enfermedades reportadas. Se encontró que no existe asociación significativa entre ambos.

IL-INTRODUCCION

La producción de camarón cultivado a nivel mundial ocupa el área de la acuacultura con mayor crecimiento. En años recientes la camaronicultura ha aportado hasta el 25-30 % del camarón que se comercializa en el mercado mundial. Existen granjas camaroneras en más de 55 paises alrededor del mundo pero la producción se concentra en unos 10-12 paises del Sudeste Asiático y América Latina (Rosenberry, 1999).

Ultimamente las enfermedades virales se han hecho más severas causando serios estragos en la industria, limitando la producción y expansión de la camaronicultura (Lightner et al., 1997).

Se han reportado mortalidades masivas de camarón en el sureste Asiático, causadas por el virus de la cabeza amarilla (Yelow head virus= YHV) y el virus de la mancha blanca (White spot sindrome virus = WSSV) (Flegel et al. 1997).

En América el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus= IHHNV) y el síndrome de taura (Taura sindrome virus= TSV) también han provocado pérdidas millonarias (Lightner, 1997).

Las especies más cultivadas en México son *Litopenaeus vannamei* Boone *y Litopenaeus stylirostris* Stimson, los estados que más producen son: Sinaloa, Sonora y Nayarit. (Rosenberry, 1997; SEMARNAP, 1998).

Durante 1998 la producción de camarón cultivado alcanzó niveles récord con un volúmen estimado en 737 200 Toneladas métricas (Tm), 12% más comparadas con 1997, de las cuales el hemisferio oriental produjo el 72% y el occidental el restante 28 %.

En 1999 la producción se estimó en 814 250 Tm, lo cual representa un aumento del 10 % con respecto a la producción de 1998. El hemisferio oriental produjo un 79 % de la producción anual en 1999, un aumento del 21 % con respecto al año anterior. El hemisferio occidental produjo unas 71 500 Tm que significan el 21 % de la producción mundial, una disminucuón del 17% en relación a 1998. Tailandia ocupa por octavo año consecutivo el primer lugar en la producción

mundial en camarón cultivado a pesar de los problemas de enfermedades causadas por virus; su producción disminuyó de 220 000 Tm a 160 000 en 1996 y en 1997 bajó hasta 150 000. El segundo lugar a nivel mundial y primero en Latinoamérica lo ocupa Ecuador, con 253 000 Tm en 1998 y 206 000 Tm en 1999, sin embargo en los primeros meses del año 2000 la producción se desplomó en un 80 %, se reportaron pérdidas hasta de 1 000 millones de dolares por WSSV. México posee el segundo lugar en America y séptimo a nivel mundial, nuestro país ha logrado mantener un nivel de desarrollo en esta actividad arriba del 15 % de crecimiento anual desde 1992.

En el 2000 los virus WSSV y TSV afectaron la actividad, causando mortalidades por encima de lo habitual y originando cosechas tempranas de tallas pequeñas, aún así la producción obtenida por la camaronicultura del estado de Sinaloa que es el principal productor llegó en el año 2000 a 15 454 Tm que significan un incremento del 12 % en relación al año anterior en el que la producción alcanzó 13 131 Tm. En cuanto a valores, debido a la disminución de exportaciones por las tallas chicas provenientes de las cosechas de pánico, que no tienen un mercado atractivo de exportación, se obtuvieron 34.5 millones de dolares contra los 44.8 millones del año anterior significando un diferencial a la baja del 22 %. (FAO 2000 Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). En México se explotan 20 000 Hectáreas (Ha) en 220 granjas camaronícolas.

Actualmente la producción de camarón cultivado está dominado por unos cuantos países; ésta tendencia posiblemente no cambie en el futuro inmediato, pero los países más productivos hoy podrían no ser los del mañana. En los países desarrollados como Estados Unidos que importa actualmente cantidades de camarón con valor superior a los 3 billones de dólares, se llevan a cabo grandes esfuerzos para desarrollar tecnologías de producción superintensivas con recirculación de agua y es posible que en el futuro las granjas de América Latina y Asia tengan que competir con éstas granjas superintensivas.

III.- HIPOTESIS

El establecimiento de agentes virales disminuyen la resistencia o inmunodeprimen al camarón favoreciendo infecciones secundarias por otros microorganismos patógenos u oportunistas provocando la mortalidad masiva de los crustáceos en condiciones de cultivo.

IV.- ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN

El presente estudio es el primer análisis sistemático donde se aplican las técnicas histopatológicas y ultraestructurales para determinar los agentes etiológicos de la severa epizootia ocurrida en las instalaciones de la comunidad ejidal "El Patagüe" localizada en El Dorado, Sinaloa, México.

V.- OBJETIVO GENERAL

Analizar las patologías causadas por virus, bacterias y protozoarios durante las pérdidas masivas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en condiciones de cultivo de la granja camaronícola Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera Ejidal "El Patagüe" en El Dorado, Sinaloa.

VI.- OBJETIVOS PARTICULARES

- 1).- Identificar y confirmar la presencia del virus WSSV, como patógeno primario al microscopio electrónico de transmisión.
- 2).- Identificar los agentes patógenos secundarios u oportunistas que afectan el cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en base a estudios histológicos.
- 3.- Cuantificar e identificar las bacterias V*ibrio* spp. presentes en los camarones enfermos.
- 4.- Relacionar los parámetros fisicoquímicos del agua con las enfermedades de camarón.

VII.- ANTECEDENTES

Los antedentes más importantes en lo que se refiere a enfermedades dé camarones peneidos, son los que se describen, de acuerdo al criterio de Lightner (1995) quien dividió como enfermededades de tipo infeccioso a las causadas por virus, bacterias, hongos, protozoarios; microsporidios y gregarinas, y como enfermedades de tipo no infeccioso a las ocasionadas por epicomensales como las bacterias, protozoarios epicomensales y algas.

1.- Síndrome de la mancha blanca (WSSV)

Flegel et al. (1996) consideran que los virus WSSV y YHV pueden afectar al mismo camarón concurrentemente y han causado grandes mortalidades en granjas camaronícolas cultivadas, en estudios realizados en camarones peneidos de Asia.

Nunan et al. (1997) detectaron dos virus que causan grandes mortalidades en camarón cultivado en Asia en 1992, que son WSSV y YHV, mientras que en Texas fueron detectados en 1995. En este estudio comprobaron la presencia de estos virus en camarones congelados importados de Asia. Mencionan que WSSV ha sido determinado como causa de mortalidades masivas en Asia (a menudo alcanzando del 80 al 100 %) de la población afectada. El YHV también ha causado serios decesos en camarón cultivado (Chantanachookin et al. 1993; Boonyaratpalin et al. 1993; Wongteerasupaya et al. 1995).

Durand et al. (1997) publicaron que las infecciones causadas por WSSV son tipicamente acompañadas por la presencia de manchas blancas en la cutícula. Describe al virión de WSSV como una partícula de forma alargada con una extensión apical envuelta. Nucleocápside cilíndrica con finales asimétricos, y apariencia superficial segmentada. La replicación de WSSV ocurrió en el núcleo

y esta indicado primero por marginación de cromatina e hipertrofia nuclear. La morfogénesis viral empieza por la formación de membranas de novo en el nucleoplasma y por la elaboración de túbulos largos, vacíos segmentados, éstos túbulos se rompen en fragmentos para formar nucleocápsides vacíos desnudos. Después de eso las membranas envuelven los cápsides dejando una extremidad abierta. Las nucleoproteínas las cuales tienen una apariencia filamentosa entran a los capsidios a través de ésta abertura final. Cuando el corion esta completamente formado, la envoltura se angosta en la avertura final y forma la cola apical de el virión maduro. Reporta que el virión mide cerca de 250X100 nanometros (nm). La envoltura de 6 a 7 nm de grosor y tiene una estructura de pared trilaminar. El area entre la nucleocápside y la envoltura varía de 2 a 7.5 nm. La nucleocápside es un cilindro de cerca de 200X65 nm con unos 6 nm de grosor de la pared externa. El core de la nucleocápside es electrodenso.

Galavíz (1999) mencionó que en cortes histológicos de camaron *Litopenaeus* vannamei Boone del Pacífico Mexicano infectado con WSSV encontró cuerpos de inclusión Cowdry, Tipo A, eosinofílicos ó basofílicos e intracelulares. Estos se observan en tejidos branquiales, tejido conectivo esponjoso, tejido muscular y tejido epitelial de la subcutícula e intestino medio anterior. La hipertrofia nuclear observada en las células dañadas, es más común en las fases tempranas de la enfermedad, donde estos se manifiestan como cuerpos eosinofílicos. Por el contrario los cuerpos de inclusión basofílicos corresponden a las fases tardías, se observa la cromatina marginal y atrofia nuclear. El complejo de virus que causan el síndrome se aloja en células de origen endotelial y mesodérmico, como se describió originalmente en brotes de Asia. En tejido conectivo adyacente a las glándulas antenales presentan cuerpos de inclusión eosinofílicos en menor grado de infección en comparación a los filamentos branquiales. Además de los cuerpos de inclusión se detecta necrosis masiva en epitelio cuticular y branquias, se observa la cariorrexis y picnosis

nuclear. En estos casos el desarrollo de cuerpos de inclusión basofilicos con la cromatina marginal es la más frecuente.

2.- Síndrome de Taura (TSV)

Jiménez (1996) y Casillas (1994) coincidieron en que el TSV fue aislado por primera véz en junio de 1992 en granjas camaroneras localizadas en la boca del río Taura en el Golfo de Guayaquil, Ecuador, de ahí su nombre y se ha extendido a la mayoría de las granjas del Parú, Colombia, Honduras, Hawai, Estados Unidos y México.

Pantoja (1995) menciona que el TSV ha sido catalogado como un picornavirus, debido a su tamaño pequeño de 30 nm aproximadamente, a su forma icosaédrica y a que su genoma está constituído por una cadena simple de acido ribonucleico.

Buenaventura (1996) reporta que TSV puede presentarse tanto en camarones silvestres como en camarones de laboratorio, la sintomatología es específica ya que solo afecta camarones entre 0.5 y 3.0 gramos (g) de peso. La infección se adquiere principalmente durante el período de muda. El exoesqueleto presentó color rosado-claro, con manchas de color marrón claro debajo de la cutícula debido a múltiples lesiones melanizadas en la epidermis cuticular. Los camarones infectados presentan tipicamente el intestino vacío y nadan erráticamente siendo presa fácil de las aves. Estudios histológicos revelaron necrosis multifocal en la epidermis cuticular, con estadíos iniciales y agudos ó crónicos, con ausencia virtual de inflamación ó infiltración de hemocitos. No se observan alteraciones en la organización celular y de tejidos del hepatopáncreas y no fue común la infección por bacterias quitinoclásticas en el exoesqueleto ni la presencia de virus u otros patógenos en las lesiones de estos camarones.

Lightner et al. (1995) utilizaron Litopenaeus vannamei para sus experimentos los cuales presentaban los signos macroscópicos característicos de TSV en la fase preaguda y de recuperación o crónica, colectados en granias del Ecuador. Perú y-Colombia. Comentan que los signos microscópicos inician en fase de postlarva de 14 a 40 días los camarones son de 0.1 a menos de 5 g pero también los camarones grandes pueden ser afectados con menor frecuencia. Los organismos moribundos presentan expansión de cromatóforos rojos en los apéndices, especialmente en los urópodos, telson, pleópodos y en la superficie del cuerpo. Los camarones que mostraron estos signos de TSV preagudo estaban tipicamente en el estadio D tardio del ciclo mudal y por eso presentaron una cutícula suave y el intestino vacío. El TSV preagudo culmina con la muerte durante el proceso mudal. Los sobrevivientes desarrollan lesiones cuticulares melanizadas similares a la enfermedad bacteriana del caparazón, con o sin cutícula suave y expansión de los cromatóforos rojos con un comportamiento normal y buena alimentación. Se propuso que es la segunda fase de la enfermedad y que los camarones presentan signos de recuperación o una forma crónica de TSV.

En histopatología las lesiones se caracterizan por areas multifocales de necrosis en el epitelio cuticular de la superficie general del cuerpo, todos los apéndices, branquias, intestino posterior, esófago y estómago. Rara véz el epitelio tubular de las glándulas antenales es afectado. Frecuentemente el tejido conectivo subcuticular y fibras musculares estriadas basales adyacentes al epitelio cuticular estuvieron involucradas. Fueron características las lesiones mutifocales cuticulares y extremadamente abundantes los cuerpos de inclusión esféricos citoplasmáticos (1 a 20 micrómetros (μm) de diámetro).

El estudio ultraestructural de las lesiones multifocales en casos preagudos confirmó las observaciones en Microscopía de Luz (ML). Las inclusiones intracitoplasmáticas esféricas fueron abundantes en los tejidos afectados (branquias, epitelio cuticular, subcutícula y músculo de apéndices) observándose de electrodensos a electrolúcidos. Se encontró que algunos contenían cristales en forma de aguja. La morfología de estos cristales fue

idéntica a la reportada para el fosfato de calcio asociados a la patología de las lesiones causadas por TSV lo cual se considera que apoya la hipótesis de la etiología tóxica.

SEMARNAP (1998) consideró que en México en el transcurso de 1995-97 se detectaron casos agudos y crónicos de un síndrome semejante en granjas camaronícolas de la República Mexicana, sin embargo autoridades sanitarias negaron que se tratara de TSV, identificándolo como NEC (necrosis del epitelio cuticular) y "síndrome similar al Taura". La enfermedad afectó al 50 % de la producción de Nayarit, invadiendo 40 de las 90 granjas de la entidad. En los estados de Sinaloa y Sonora la producción de camarón blanco fue abatida en porcentajes de 40 al 70 % de las granjas. En Sinaloa la enfermedad se presentó en camarones de 1 a 15 g durante el proceso de muda, la diferencia fue que ésta última solo se había reportado en organismos de menos de 5 g.

3.- Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV).

Bonami et al. (1990) describen el virus IHHNV como no envuelto, de forma icosaédrica, de una medida aproximada a los 22 nm de diámetro y una densidad de 1.40 gramos por mililitro (g/ml) en cloruro de cesio, el genoma como una molécula de DNA de cadena simple con un tamaño aproximado de 4.1 Kilobases (kb). En cuanto a las proteínas de la cápside derterminadas por electroforesis en geles de acrilamida, menciona cuatro polipéptidos aproximados a las 74 KiloDalton (kD), 47 kD, 39 kD y 37.5 kD respectivamente; de acuerdo a éstas características se propuso como un virus perteneciente a la familia de los parvovirus.

Lightner et al. (1991 a) llevan a cabo un seguimiento de la introducción de IHHNV en camarones cultivados del noroeste de México, mencionan que antes de 1989 no existían casos de IHHNV en granjas camaronícolas que rodean el Golfo de California o en cultivos derivados de esa región de México, los primeros diagnósticos positivos son de 1989-1990 en sitios previamente

negativos para el virus. Involucran a los camarones importados como la fuente de IHHNV que causó severas epizootias, en el Estado de Sonora, que coincidieron con la introducción de larvas de *Litopenaeus vannamei* adquiridas en Centro América y Estados Unidos en esos años.

Zenyuan (1996) destacó que la República de China alcanzó el mayor crecimiento a nivel mundial en cultivo de camarón en tan sólo 10 años (1981-1991), la superficie cultivada se multiplicó en 11.3 veces y la producción 60.8 veces. Sin embargo en 1993 se presentó una epizootia provocada por el virus IHHNV que afectó a la mayoría de las granjas, causando grandes pérdidas económicas.

4.- Otros virus causantes de enfermedades en camarones peneidos

Lightner et al. (1989) reportan a (Baculovirus Penaei= BP) como el primer virus descrito de los que afectan a los cultivos de camarón, el cual representa una distribución geográfica amplia para *Litopenaeus stylirostris* Stimpson que incluye de Florida a Texas en el Golfo de México, Brasil, Perú, Ecuador, Panamá y Costa Rica. Informan de ocluciones virales en larvas de *L. stylirostris* con prevalencias del 100 %. La frecuencia y severidad de la infección se agudiza en el estadío de misis y persiste hasta postlarva. Las características citopatológicas concuerdan con las que se presentan en *Farfantepenaeus duorarum* Burkenroad y *Penaeus .aztecus* Ives, pero las características únicas observadas son la remarcada afinidad de ubicarse en los microfilamentos nucleares pero no en el citoplasma.

Lightner (1995) menciona que entre los agentes más importantes que causan enfermedades en los camarones peneidos se encuentran los virus como IHHNV, BP, (Monodon baculovirus= MBV), Parvovirus hepatopancreático (Hepatopancreatic parvovirus= HPV) y Baculovirus de la glándula del intestino medio (Baculoviral midgut gland necrosis= BMN).

5.- Enfermedades causadas por bacterias Vibrio spp.

Lightner et al. (1991a) hacen una revisión de las enfermedades de mayor importancia económica en camarones de las Américas y del Indopacífico, encontrando a Vibrio luminiscentes en larvas de Penaeus monodon Fabricius y Penaeus. merguiensis de Men en Indonesia, Tailandia y Filipinas en las cuales colonizó los apéndices bucales y la cavidad oral, causando mortalidades epizooticas, también detectaron vibriosis en cultivos de Penaeus japonicus en Malasia e Indonesia como el causante de serias enfermedades, debido a que infectan órgano linfoide desarrollando nódulos hemocíticos melanizados. Además reportan los casos de Ecuador y Texas donde la especie afectada fué L. vannamei.

Zenyuan (1996) describe otras patologías de las más comunes, como han sido la enfermedad de los apéndices rojos causada principalmente por una bacteria del género *Vibrio* spp. y la enfermedad de las adherencias, ocasionada por protozoarios *Zoothamnium* spp. y *Epystilis* spp.

Benaventura (1996) menciona que Ecuador alcanzó su mayor crecimiento en 12 años (1977-1989), período en el cual multiplicó la superficie cultivada 41.9 veces, cuadruplicando sus exportaciones. Sin embargo en 1990 se presentó por primera vez una epizootia provocada por una enfermedad llamada "síndrome de la gaviota", la cual redujo considerablemente la producción. También reporta la hepatopancreatis necrotizante (HPN), causada principalmente por bacterias intracelulares similares a rickettsias. La necrosis infecciosa de la epidermis cuticular (NIEC), causada por bacterias intracelulares y/o virus; "enteritis hemocitica bacteriana" (EHB) la cual ha sido asociada directamente a la presencia masiva de gregarinas. También han sido reportadas bacterias Gram negativas, principalmente del género *Vibrio* spp. en estómago e intestino.

6.- Gregarinas y protozoarios epicomensales.

Lightner et al (1995) describieron por lo menos tres géneros de gregarínas (Protozoa:Apicomplexa) que afectan cultivos de camarones Nematopsis spp., Cephalolobus spp. y Paraophioidina spp. considera que las poblaciones afectadas severamente pueden reducir su crecimiento y disminuir el factor de conversión alimenticio, los individuos pueden presentar coloración amarillenta del intestino medio, vista en la cutícula del abdomen. En larvas y postiarvas los tofozoitos de gregarinas fueron facilmente visibles a 10X o 20X, o en preparaciones frescas directamente (fase o campo de luz brillante reducido). La infección ocurrió a través de hospederos intermediarios como moluscos y anélidos. En este grupo de gregarinas pueden ser inter o intracelulares, las células del hospedero pueden ser destruídas por las intracelulares, las mayoría de las especies no son consideradas patogénicas. El daño a la mucosa del intestino medio puede proveer una ruta de entrada a una bacteria letal por vibrios oportunistas.

Alessio (1996) detectó en camarón blanco *L. vannamei* los protozoarios ciliados *Zootamnium* sp, *Epistilis* Doflein y *Acineta* Doflein en branquias, exoesqueleto y pereiópodos, al gregarínido *Nematopsis* Sprague en intestino medio y posterior.

Clifford (1997) mencionó que aunque las gregarinas no impactan de manera directa la salud del camarón, afectan la digestión de los nutrientes y sus órganos de fijación sobre el epitelio del tracto intestinal pueden crear puntos de penetración para una invasión bacteriana.

7.- Parámetros fisicoquímicos del agua.

Boyd (1990) mencionó algunos rangos ideales en el cultivo de camarón, tales como; temperatura 26-28 °C, salinidad 15 a 25 gramos por litro (gr/Lt), pH 6.5 a 9, alcalinidad 20 ppm. para *P. vannamei*.

Clifford (1997) mencionó rangos ideales de temperatura de 28-32 °C, oxígeno disuelto de 3.0-6.0 p.p.m., salinidad de 14-45, pH 8.1-9.0, alcalinidad de 100-140, disco de Sechi de 35-45 centímetros (cm), amonia total de o.1-1.0, amonia no ionizada menor a 0.10, sulfato de hidrógeno 0.10 p.p.m., nitrito (NO2) menos de 0.10, nitrato (NO3) 0.4-1.4, nitrógeno inorgánico 0.5-2.0 mg/Lt, clorotita-a 50-75 mg/Lt, sólidos totales en suspensión 50-150 miligramos por litro (mg/Lt).

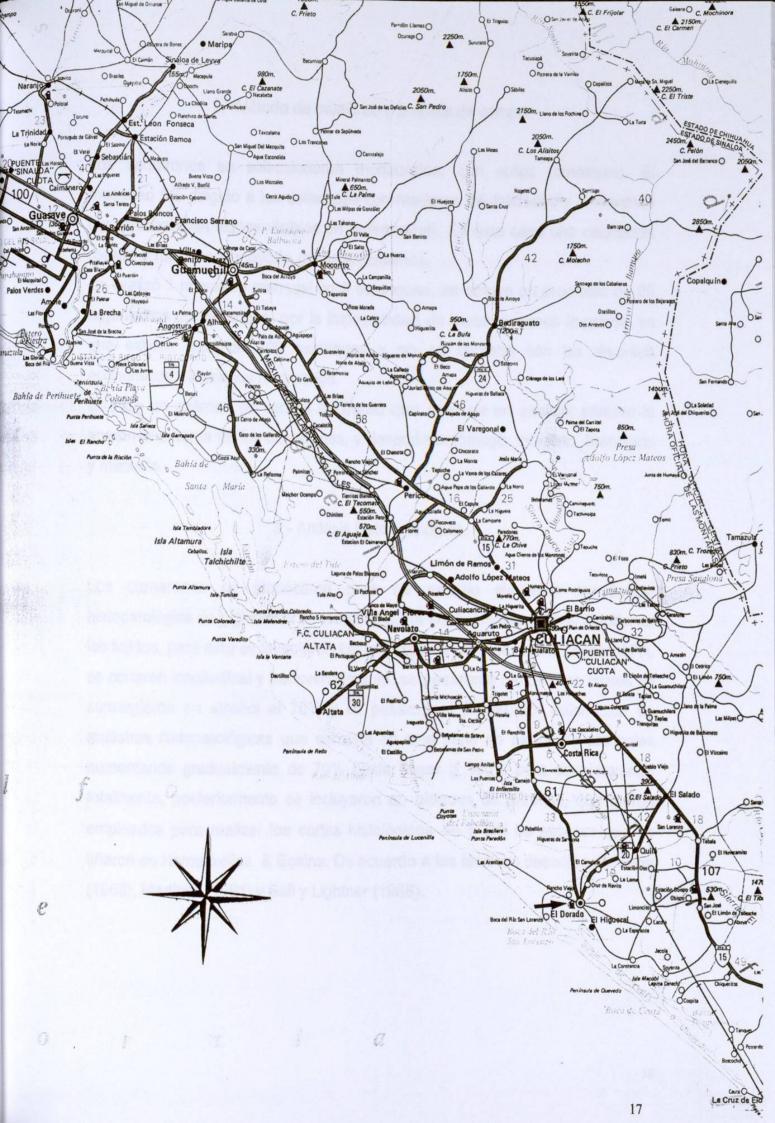
De la Cerda (1999) reportó que la temperatura durante el ciclo de cultivo osciló entre 30.3 a 30.4 y la concentración de oxígeno disuelto de 4.0 a 4.7, ambos en los rangos recomendados por los diferentes autores, la salinidad varió de 34.66 a 38.66 g/Lt., la dureza tuvo un promedio de 7430.8 mg/lt., la cual se considera muy dura puesto que excede los 300 mg/Lt. recomendados, hace notar que estos resultados son aptos para un cultivo de camarón ya que se obtuvieron cosechas record hasta de 3750 Toneladas por hectárea (Ton/ha).

VIII.- MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Descripción del area de estudio.

La Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera "El Patague" se encuentra localizada en el municipio de El Dorado, Sinaloa, a 54 Kilómetros (Km) al sur de la ciudad de Culiacán, en las costas del estado de Sinaloa. (Mapa 1). Es una sociedad conformada por más de 50 socios que en algún tiempo fueron ejidatarios, pero cambiaron el uso de las tierras debido a que eran poco productivas para la agricultura y percibieron que se podía aprovechar la cercanía del mar para establecer cultivos de camarón.

Existen más de 100 estanques que van desde 15 hasta 20 hectáreas (Ha). El suelo de los estanques es fangoso arenoso. La profundidad media es de 1.50 metros (m). La zona se caracteriza por tener clima subtropical-tropical, húmedo. Los vientos predominantes son los del noroeste en Invierno y los del suroeste en verano. Hay un período de lluvias en agosto, septiembre y enero, acompañado de tormentas tropicales o chubascos (Servicio Metereológico de la SARH,1991-1992). Los estanques muestreados fueron nueve: 3B4, 4C, 1B, 3B5, 4F1, 3B5, 4A2, 2S2, 4Cres. Se escogieron unicamente esos estanques debido a la dificultad para realizar los muestreos ya que se necesita contar con recursos económicos y humanos además de ser de los que presentaron más problemas de enfermedades desde el principio de la siembra. El camarón sembrado proviene del medio silvestre o de diferentes laboratorios. Se sembraron tres especies de camarón; blanco, azul y café. Se trabajó con organismos provenientes de laboratorios. La especie estudiada fué camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.



2.- Método de muestreo y análisis de campo.

Los camarones se seleccionaron moribundos, con redes (atarrayas). El muestreo fué dirigido a los estanques con mayores mortalidades y camarones que presentaban signos visibles de enfermedad. En este caso una coloración rosada a rojiza en la mayoría de los organismos.

Se realizó 1 muestreo mensual en 9 estanques, se obtuvo un promedio de 25 organismos por estanque, por la imposibilidad de muestrear toda la granja, ya que existen más de 100 estanques y no se contaba con los recursos económicos y humanos necesarios.

Se hizo un exámen de campo en fresco que consiste en analizar primero la anatomía externa de los camarones, y después estómago, intestino, branquias y músculo.

3.- Análisis histopatológico.

Los camarones se procesaron para su estudio siguiendo la técnica histopatológica de Lightner et al. (1983,1985) la cual comienza con la fijación de los tejidos, para esto se inyectaron los organismos con solución Davidson AFA, se cortaron longitudinal y transversalmente, se pasaron a moldes, los cuales se sumergieron en alcohol al 70% y se pasaron al procesador automático de muestras histopatológicas que consiste en una serie de baños de alcoholes aumentando gradualmente de 70% hasta llegar a 100% para deshidratarlas totalmente, posteriormente se incluyeron en bloques de parafina, que fueron empleados para realizar los cortes histológicos de 5 µm de espesor que se tiñeron en Hematoxilina & Eosina. De acuerdo a las tecnicas descritas por Luna (1968), Martinez (1981) y Bell y Lightner (1988).

4.- Microscopía electrónica de transmisión.

Se tomaron muestras frescas (1 cm³), que se fijaron en glutaraldehído al 6% a 4 °C en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 Molar (M); se añadió NaCl al 3 % hasta ajustar osmolaridad entre 700 y 800 micromoles por kilogramo (mmol/kg), a un pH de 7.2. Posteriormente las piezas se lavaron en solución amortiguadora de fosfatos 0.15 M y pH 7.2 por 5 minutos, se pasaron al fijador utilizando tetraóxido de osmio por lo menos una hora y posteriormente se deshidrataron en una serie de baños de etanol (70, 80, 90 y 100 %) durante 10 minutos cada uno, el último cambio se realizó 3 veces.

Las muestras ya deshidratadas se pasaron a óxido de propileno, se embebieron en resina Embed-812 y se incluyeron en cápsulas de polietileno a 60 °C por 48 horas. Una vez formado el bloque se hicieron cortes semifinos de 0.5 mμ de grosor con cuchilla de vidrio o cuchilla de diamante y se tiñeron con azul de toluidina.

Se seleccionaron los bloques donde se detectaron enfermedades y se hicieron cortes ultrafinos de aproximadamente 0.1 µm en un ultramicrotomo Porter Blum MT-1 con cuchilla de vidrio o de diamante. Se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo por 1 minuto y se volvieron a lavar en agua destilada (Dawes, 1988).

Los cortes se examinaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Em-190 para su interpretación.

Las medidas de los viriones se obtuvieron con la ayuda de un lente de aumento (10X) con escala graduada en décimas de milímetros y se transformaron en dimensiones reales con la fórmula siguiente:

Tf= Tr x Af Tr= Tamaño real del virus

Tf= Tamaño de la foto

 $Tr = Tf = Xmm \times 10^6 = Xnm$ Af= Aumento de la foto

Af Af

Considerando que: 1 mm = 10⁶ nm

5.- Análisis bacteriológico.

- a).- Toma de muestras y diagnóstico presuntivo.- En el campo se midió el tiempo de coagulación de la-hemolinfa tomando como referencia los 20 segundos de límite para coagular para un diagnóstico positivo preliminar Lightner (1996), se realizaron analisis en fresco de hemolinfa entre cubre y portaobjetos, se observaron al microscopio para verificar la presencia de bacterias. Se colocaron unas gotas de hemolinfa en un tubo con solución salina al 2.5 %, el cual sirvió como medio de transporte. Con un isopo estéril se tomó una muestra del hepatopáncreas de cada uno de los organismos colectados y se colocaron en tubos con el mismo medio de transporte. (Conroy et al, 1990; Lightner, 1996). Se realizaron tres pruebas generales: tinción Gram, motilidad y prueba de la oxidasa.
- b).- Procesamiento en el laboratorio y cuantificación de bacterias .- Las muestras fueron sembradas en medio de enriquecimiento (caldo nutritivo suplementado con 2.5 % de NaCl), se cultivó en tiosulfato, citrato, sales biliares y sucrosa (TCBS) para esto se utilizó una asa calibrada previamente esterilizada al mechero y enfriada. Se inoculó en una caja de petri que se colocó en forma invertida y se incubó por un tiempo de 24 horas (h) a temperatura de 28-30 °C. A las 12 h de incubación se recomienda monitorear la luminiscencia. Después de transcurrido el período de incubación, se realizó la lectura de las colonias tanto verdes como amarillas y se les multiplicó por el factor 200 (diámetro del asa –4 mm.) 10 μl). Los resultados se reportaron como "Unidades Formadoras de Colonias" por mililitro (UFC/ml).
- c).- Identificación de bacterias Vibrio sp.- Se realizó la purificación de bacterias en Agar Soya Tripticas (TSA) con el fín de prevenir la posibilidad de que las colonias no estuvieran bien aisladas o cuando el cultivo superó las 24 h para evitar contaminación y errores en la identificación. Se seleccionaron las colonias para la resiembra que se realizó en TSA ajustado a la salinidad del medio y se incubó a 28-30 °C por 18-20 h. Las colonias que crecieron en TSA nos sirvieron para realizar antibiogramas, así como para la identificación bacteriana. El

método de identificación fue el API 20 NE. El cual es muy confiable y nos permite identificar la especie de bacteria.

6.- Parámetros fisicoquímicos del agua.

Los registros de los parámetros fisicoquímicos del agua se tomaron de las bitácoras de la granja. De estos se obtuvo el coeficiente de correlación de Spearman, realizando tablas cruzadas en el progama SPSS 10.0 para window, entre los parámetros fisicoquímicos con las siguientes enfermedades: WSSV, TSV, IHHNV, Zootamnium, Epystilis, Acineta y Nematopsis sp. Se graficó a los parámetros fisicoquímicos en los meses de agosto, septiembre y octubre. Se presentan medidas estadísticas como la media, desviación estándar, mínimo y máximo, en el programa Statisticas 8.0. Se graficó a todas las enfermedades contra cada parámetro fisicoquímico del agua, en el programa Statisticas 8.0.

IX.- RESULTADOS

1.- Histopatología del virus de la mancha blanca (WSSV).

a).- Signos clínicos macroscópicos

Los organismos que se analizaron y se encontraron infectados con WSSV presentaron signos clínicos macroscópicos muy marcados, como es la expansión de cromatóforos rojos en el cuerpo, coloración rosada a rojiza, flacidéz generalizada, pérdida de apéndices; antenas, pleópodos y pereiópodos. No se observaron manchas blancas en el caparazón como se describe en algunas bibliografías asiáticas (Foto No. 1).

b).- Signos clínicos microscópicos

En el analisis histopatológico se encontraron cuerpos de inclusión Coudry tipo A (Foto No. 2) fueron eosinofílicos o basofílicos intracelulares, en etapas tempranas se observa hipertrofia nuclear en las células dañadas que a menudo se observaron eosinofílicos (Foto No. 3) y en etapas tardías basofílicos respectivamente, presentaron cromatina marginada muy notable, atrofia nuclear y picnosis.

c).- Sitios de infección

WSSV se encontró infectando los tejidos branquiales del camarón y epidermis subcuticular. Algunos organismos adquirieron infecciones virales por WSSV y TSV concurrentemente (Fotos No. 4 y 12), los mismos sitios de infección fueron observados cuando se encontraron juntos los dos virus.

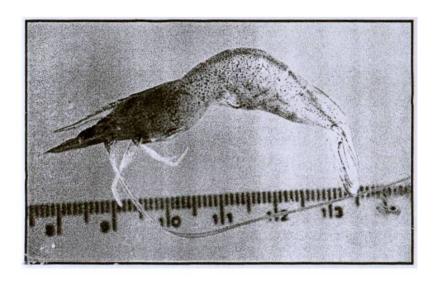


Foto No. 1.- Expansión de cromatóforos rojos en el cuerpo. Camarón infectado con WSSV. Se observa coloración rosada a rojiza del cuerpo, flacidéz, pérdida de pleópodos, pereiópodos y antenas.

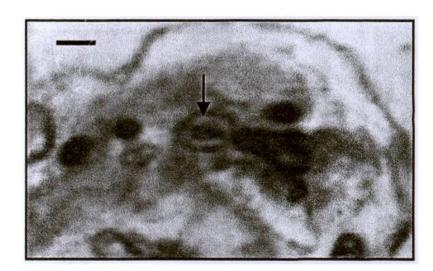


Foto No. 2.- Cuerpos de inclución Coudry tipo A. Se observa una célula con la cromatina marginada y atrofia nuclear. 40X H & E. Escala= 10 μm.

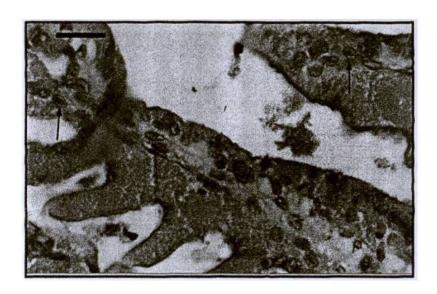


Foto No. 3.- Células hipertrofiadas. Corte histológico de tejido branquial de camarón blanco Litopenaeus vannamei. H & E. 25X. Escala = 20 µm.



Foto No. 4.- WSSV (flechas cortas) y TSV (flechas largas). Corte histológico de branquias de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Η & E. 25X. Escala= 20 μm.

2.- Ultraestructura

2.a).- Descripción patológica

En el estudio ultraestructural se observó a las células infectadas con partículas virales de WSSV las cuales son no ocluidas, en forma alargada y están dentro del núcleo. En etapas tempranas la cromatina se encontró en aglomeraciones distribuidas por todo el núcleo y los cuerpos de inclusión están situados en el centro, también se observan túbulos vacíos. (Foto No. 5), en cambio en etapas más avanzadas los viriones tienen una tendencia a establecerse en las orillas del núcleo y la cromatina se encuentra completamente en el margen (Foto No. 6).

2.b).- Estructuras; forma y tamaño.

Con respecto a las formas y medidas de los viriones, son de forma largada con un final apical o cola, poseen una pared externa, envoltura de la cápside y nucleocápside, las medidas del virión completo son desde 108.33 nm de largo por 58.33 de diámetro los más pequeños, hasta viriones de 266.66 nm de largo por 75 de diámetro, con un promedio de 172.61 nm de largo por 70.23 de diámetro. (Foto No. 7). Se observan también cortes transversales redondeados que tienen medidas promedio de 70.23 nm de diámetro.

La pared externa a simple vista se observa gruesa, tiene medidas desde 5 nm hasta 8.33, con un promedio de 6.90 nm de grosor. La envoltura tiene una apariencia de pared trilaminar que a menudo en los finales se extiende formando una cola y las medidas son desde 11.33 nm hasta 13.33 de grosor, con un promedio de 12.85. La nucleocápcide es de forma cilindrica, se observa electrodensa, está rodeada por la envoltura y se encontraron medidas desde 75 nm de largo por 41.66 de diámetro, hasta de 166 nm de largo por 61.66 de diámetro. (Foto No. 8).

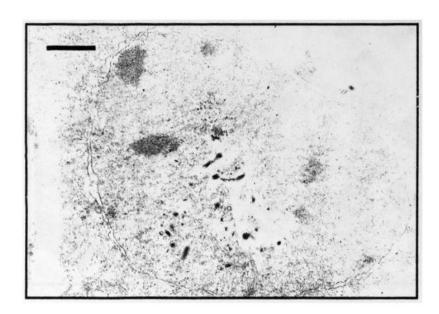


Foto No. 5.- Fase inicial de WSSV. Corte de una célula infectada donde se observa la cromatina en aglomeraciones que están distribuídas por todo el núcleo y los viriones en forma de varilla se encuentran centrados, también se observan túbulos vacíos longitudinales y transversales. Contrastado con citrato de uranilo y acetato de plomo. Escala= 500 nm.

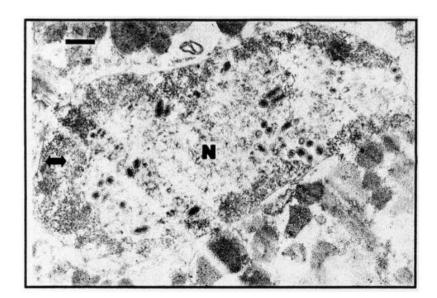


Foto No. 6. – Cromatina marginada (flecha doble). Etapa avanzada de la infección por WSSV. Se observan los viriones con tendencia a situarse en la orilla del núcleo (N). Contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 7000x3X. Escala= 333.33 nm.

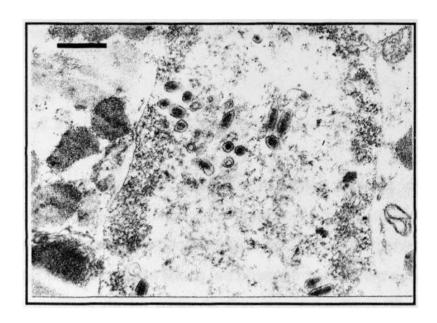


Foto No. 7.- Morfología de WSSV. Viriones en forma alargada con medidas de hasta 266.66 μ m de largo por 75 de diámetro y cortes transversales redondeados con medidas promedio de 70.23 μ m de diámetro. Contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 20000X3X. Escala = 200 nm.

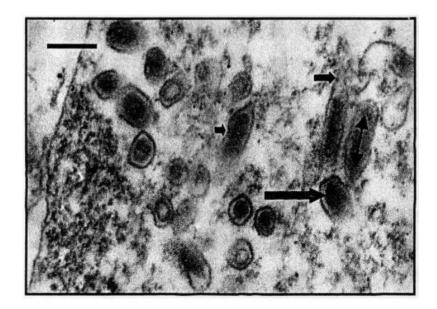


Foto No. 8.- Estructuras virales. Corte de un núcleo que muestra las partículas virales en las cuales se observa la envoltura con apariencia de pared trilaminar (flecha grande), la membrana externa (flecha chica), la extensión apical (flecha cortada) y la nucleocápside cilíndrica (flecha doble). Acetato de uranilo y citrato de plomo. 30000X3X. Escala = 112.5 nm.

2.- Histopatología del síndrome de Taura (STV).

2.a).- Signos-clínicos macroscópicos.

Los camarones infectados con TSV presentaron signos clínicos como la coloración rosada o rojiza, la expansión de cromatóforos rojos en el cuerpo, cola roja, pérdida de pleópodos, pereiópodos y antenas, la flacidez generalizada fué característica así como la cutícula suave, se observaron lesiones cuticulares melanizadas en organismos de un peso de 6 g en promedio o 60 días de sembrados. (Foto No. 9).

2.b).- Signos clínicos microscópicos.

En histología fueron abundantes los cuerpos de inclusión basofilicos esféricos citoplasmáticos. (Foto No. 10). Se encontraron areas multifocales de necrosis, cariorexis y picnosis nuclear en el epitelio subcuticular y en las branquias. No se encontró infiltración hemocítica. (Foto No. 11).

2.c).- Sitios de infección.

Se encontraron lesiones agudas en el epitelio subcuticular y en lamelas branquiales mostrando los signos típicos de TSV ya descritos. También se encontró a TSV asociado con WSSV en un mismo organismo y en los mismos sitios de infección. (Foto No. 12).

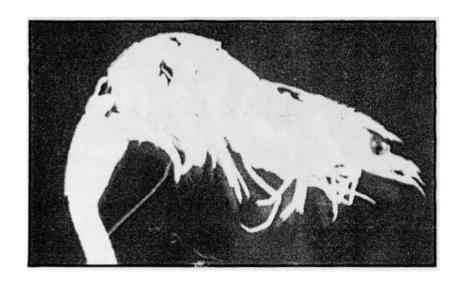


Foto No. 9.- Fase crónica de TSV. Algunos de los síntomas característicos de la fase crónica de esta enfermedad son la coloración rosada, cola roja, manchas color marrón en la cutícula, expansión de cromatóforos, flacidez generalizada.

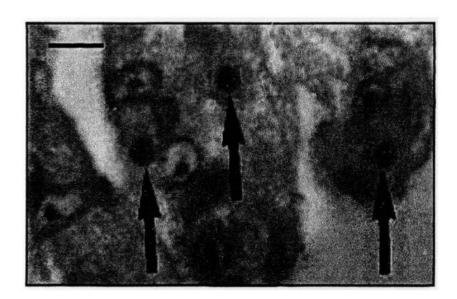


Foto No. 10 .- Cuerpos de inclusión basofilicos. Lesiones multifocales en tejido branquial de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. H & E. 60X. Escala= 5 μm.

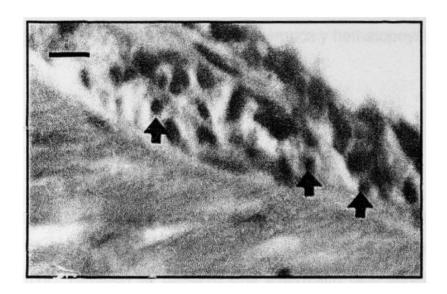


Foto. No.11.- Cariorexis y picnosis nuclear. Se observan lesiones multifocales en el epitelio subcuticular causadas por una fuerte infección producida por el TSV, H & E. 40X. Escala= $10 \mu m$.

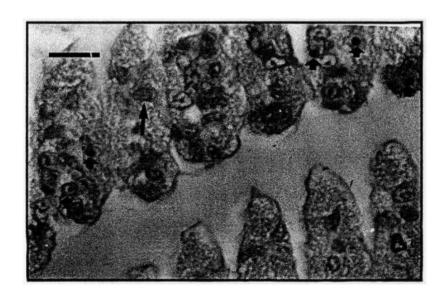


Foto No. 12.- TSV (flechas cortas) y WSSV (flecha largas). Concurrentemente se presentaron estos dos virus infectando a un mismo organismo. H & E. 25X. Escala= 20 μm.