

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero del Fondo de Contravalor de Japón, bajo el proyecto “Fortalecimiento de la actividad camaronera para mejorar los niveles productivos en zonas de pobreza extrema”.

Directora de Investigación

MSc. Agnés Saborío Coze.

Investigadores

*Lic. Zunilda Castellanos Corrales.
T. M. Erick José Sandoval Palacios.
MSc. Eduardo José Flores Coca.*

Colaboradores

*Lic. Kathia Chévez.
Laura Martínez Hernández.*

Edición y diseño

Lic. Nelvia Hernández.

Resumen

El estudio de prevalencia de organismos patógenos en tres granjas camaroneras, tuvo por objetivo determinar la presencia de organismos patógenos al camarón de cultivo a través de métodos histológicos, microbiológicos y PCR, dicho estudio se llevo a cabo de julio a octubre del 2001 en tres puntos del Estero Real: Boca del Estero, (Granja Camaronera CAMPA), parte media (Granja Camaronera CAMILO ORTEGA) y parte alta en Puerto Morazán (Granja Escuela CIDEA-UCA). En cada una de las granjas se realizó un total de seis muestreos: El primer muestreo se llevó a cabo el día de la siembra (día 0), segundo muestreo 15 días después de la siembra, tercer muestreo a los 30 días de cultivo y los 3 muestreos restantes 60, 90 y 120 días de cultivo respectivamente. Los resultados indican que en la zona están presentes los virus de Mancha Blanca, y Síndrome del Taura, y que las especies de *Vibrium* predominantes fueron *V. harveyii*, y *V. alginolyticus*, así también se confirmó la presencia de la bacteria NHP, la bacteria *Leucothrix mucor* se presentó solo en los últimos días de cultivo, junto a estos agentes etiológicos también se presentaron parásitos epicomensales tales como *Epistylis sp*, *Zoothamnium sp*, *Acineta sp*, y Gregarinas, la presencia de todos estos organismos biológicos son un alto riesgo para la Camaronicultura si no se toman medidas preventivas necesarias.

Referencia Bibliográfica

CIDEA-UCA. 2002. Estudio de prevalencia de organismos patógenos en tres granjas camaroneras, por métodos histológicos, microbiológicos y PCR. Managua, Nicaragua. 43 pp.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	4
II. OBJETIVOS	5
2.1- <i>Objetivo General:</i>	5
2.2- <i>Objetivos Específicos:</i>	5
III. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1- <i>Área de Estudio:</i>	6
3.1.1 Descripción de los sitios de muestreo.....	6
3.2- <i>Fase de Campo: Recolección de Muestras</i>	7
3.3- <i>Fase de Laboratorio</i>	8
3.3.1- <i>Análisis Microbiológicos</i>	8
3.3.2- <i>Métodos Moleculares: PCR</i>	9
3.3.3- <i>Métodos Histopatológicos:</i>	10
IV. RESULTADOS OBTENIDOS.....	13
4.1 <i>Resultados Microbiológicos</i>	13
4.2 <i>Resultados obtenidos con la técnica de PCR</i>	22
4.3 <i>Resultados obtenidos mediante técnicas de histopatología</i>	25
V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	31
5.1 <i>Virus</i>	31
5.2- <i>Protozoos epibiontes y parásitos</i>	32
5.3- <i>Bacterias</i>	35
VI. CONCLUSIONES.....	38
VII. LITERATURA CONSULTADA	39
ANEXOS	40

I. INTRODUCCIÓN

La industria camaronera en Nicaragua ha tenido un crecimiento importante a partir de 1990 llegando a un rápido nivel de crecimiento. Para el año 1998 se produjeron más de 8,000 libras de camarón lo que representaba para el país en ingresos de divisas un poco más de 30 millones de dólares. El Huracán Mitch en 1999 detuvo el crecimiento que se venía dando en la camaronicultura, bajándose los niveles de producción y de ingresos de divisas al país, pero en el año 2000 se recuperó la industria y se produjeron más de 10,000 libras lo que representó alrededor de 35 Millones de dólares de ingreso en divisas al país. La industria camaronera además de contribuir con la economía de nacional es una fuente fija de empleos directos e indirectos para centenares de personas que viven en las zonas de producción.

Sin embargo, esta industria debe tener especial cuidado con las enfermedades causadas por los distintos patógenos (virus, bacterias, parásitos y hongos), debido a que ellos pueden causar pérdidas económicas importantes para la industria, esto repercutiría en la economía del país, tal como sucedió con los brotes del virus de Taura (TSV) en 1996 y el virus de la mancha blanca (WSSV) en 1999, siendo este el caso más reciente y de mucha importancia, ya que se calcula que ocasionó pérdidas del 30% en la producción del camarón de cultivo de ese año.

Existen evidencias de que la virulencia de los brotes aumenta, en la medida que los organismos están más expuestos a otros agentes patógenos oportunistas como bacterias, hongos y parásitos epicomensales tipo protozoarios, los que a su vez se ven favorecidos por la mala calidad del agua utilizada en el cultivo o por la situación de estrés a las que pueden estar sometidos los camarones durante el cultivo, entre otras.

Hasta la fecha no se conoce con certeza cual es la incidencia y prevalencia de los patógenos presentes en las aguas utilizadas para el cultivo de camarones en nuestro país. Los datos con los que se cuentan se refieren a aspectos generales y a experiencias ocurridas en otros países y por lo tanto otros tipos de ecosistemas acuáticos. En México por ejemplo, se han identificado bacterias pertenecientes principalmente a las especies *Vibrio sp.*, *Aeromonas spp.*, y bacterias filamentosas; los expertos han llegado a estas conclusiones basándose en monitoreos continuos realizados en las granjas camaroneras de ese país.

Con el presente trabajo se pretende sentar las bases que permitan ir determinando el tipo de patógenos de camarones de cultivo presentes en las aguas del Estero Real, comenzando por establecer los tipos de virus, bacterias y algunos parásitos, a través de técnicas de diagnóstico microbiológicas, histológicas y PCR.

II. OBJETIVOS

2.1- Objetivo General:

- Determinar la prevalencia de organismos patógenos para el camarón en tres granjas camaroneras distribuidas uniformemente en la zona del Estero Real, a través de las técnicas de diagnóstico de histopatología, microbiología y PCR.

2.2- Objetivos Específicos:

- Conocer si existe presencia del virus de Mancha Blanca (WSSV), Síndrome de Taura (TSV) y Virus de la Cabeza Amarilla (YHV), en los estanques de las granjas CAMPA, CAMILO ORTEGA y GRANJA EXPERIMENTAL UCA utilizando técnicas de diagnósticos histopatológicos y PCR.
- Identificar la existencia del virus de la Necrosis Infecciosa Hipodermal y Hematopoyética (IHHNV) y Baculovirus Penaei (BP), mediante técnicas histopatológicas.
- Determinar la presencia de Protozoarios epicomensales en camarones de las tres granjas escogidas utilizando las técnicas de diagnósticos histopatológicos.
- Identificar bacterias del tipo *Vibrium sp.*, *Rickettsias* like NHP y *Leucothrix mucor* en tejidos de las muestras de camarones por medio de métodos de diagnósticos histopatológicos microbiológicos, análisis en fresco y PCR de las muestras de los estanques en estudio.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Área de Estudio:

Esta investigación se llevó a cabo en tres granjas camaroneras ubicadas en diferentes puntos del Estero Real: Boca del Estero (CAMPA), parte media (CAMILO ORTEGA) y parte alta en Puerto Morazán (CIDEA-UCA) (Ver mapa No.1 Ubicación de granjas, en anexos). Estas granjas camaroneras fueron elegidas porque están ubicadas en puntos representativos del Estero Real. En cada una de las granjas se eligieron dos estanques para hacer la recolección de las muestras, excepto en la cooperativa Camilo Ortega, donde solamente se muestreó un estanque

En cada una de las granjas se realizó un total de seis muestreos: El primero se llevó a cabo el día de la siembra (día 0), segundo muestreo 15 días después de la siembra, tercero a los 30 días de cultivo y los 3 muestreos restantes 60, 90 y 120 días de cultivo respectivamente.

3.1.1 Descripción de los sitios de muestreo

A) Empresa Camarones del Pacífico (CAMPA).

Esta empresa camaronera se encuentra ubicada en el Estero Marota, ramal del Estero Real. Cuenta con un total de 800 Has, con 70 estanques rectangulares de 12. 2 Has. El sistema de producción que se emplea es el semi-intensivo con cero recambio de agua y con densidad promedio de 8 pL/m². La larva que se siembra es larva de laboratorio, importada desde Panamá y larva silvestre de los acopios ubicados en PoneLOYa principalmente.

En la fecha en que se inició el monitoreo en esta empresa, se sembró paralelamente estanques con larva silvestre y estanques con larva de laboratorio, por lo que se decidió tomar muestras de ambos estanques para hacer los resultados comparativos.

Se seleccionaron los estanques **S-32** (sembrado con larva silvestre de PoneLOYa) y el estanque **T-49** (sembrado con larva de laboratorio de Pacific Larval de Panamá). Ambos estanques fueron sembrados con el sistema de cultivo semi-intensivo, la densidad de siembra en cada estanque fue de 8 pL/m². En esta granja se hizo la primera colecta de muestras de larvas los días 21 y 22 del mes de junio.

B) Cooperativa Camilo Ortega Saavedra

Esta cooperativa camaronera está ubicada en Playa Grande, municipio de Puerto Morazán a orillas del Estero Real. Cuenta con un área de 237 Has. Se emplean los sistemas de producción extensivo y semi-intensivo. Existen 140 Has que son manejadas de forma extensiva, el resto son cultivadas de manera semi-intensiva. El tamaño de los estanques varía desde 4.5 Has hasta 40 Has. El estanque monitoreado para esta investigación es el número **4** con 12 Has bajo sistema semi-intensivo y con densidad de siembra de 12 pL/m². La larva sembrada fue de origen silvestre, adquirida en los centros de acopios ubicados en Jiquilillo, Aserradores y El Realejo principalmente.

C) Granja Demostrativa CIDEA-UCA.

Esta granja está ubicada en la entrada del poblado de Puerto Morazán, a 30 Km aproximadamente de la ciudad de Chinandega, al occidente del país. Posee un área de 26 Has, con 2 estanques rectangulares de 10 Has cada uno y 6 estanques de 6 Has. El sistema de cultivo empleado es el semi-intensivo con bajas densidades de siembra (5 pL/m^2). La larva sembrada durante el periodo de cultivo en que se realizó esta investigación fue larva de laboratorio ubicado en Jiquilillo. En esta granja se muestrearon los estanques **A6** de 6 Has y el estanque **B1** de 10 Has.

3.2- Fase de Campo: Recolección de Muestras

Durante el primer muestreo se colectaron al azar 150 larvas del lote total a sembrar en cada granja, de estas muestras una parte se fijó en Davidson para análisis histopatológicos, otra parte se fijó en etanol 95% para los análisis de PCR y las demás fueron transportadas vivas, en bolsas plásticas saturadas con oxígeno al laboratorio de Patología del CIDEA-UCA para realizar las pruebas microbiológicas (Fotos 1 y 2).



Foto 1: Transporte de Camarones Vivos



Foto 2: Saturación de la muestra con oxígeno

En el segundo muestreo se colectaron al azar 60 postlarvas en cada uno de los estanques elegidos, 20 para cada tipo de análisis, a partir del tercer muestreo se colectaron sistemáticamente 20 muestras con síntomas de enfermedades: antenas rojas, apéndices amarillentos o rojos, urópodos rojos, manchas negras en el cefalotórax (Foto 3). Debido a que ya los camarones tenían tamaño significativo, en el caso de los análisis de PCR y microbiología, podían compartirse las muestras.

Los procedimientos de fijación y transporte utilizados fueron los mismos empleados desde el inicio, con la variante en el caso de las muestras histopatológicas, los juveniles tempranos, tardíos y adultos fueron inyectados directamente con el fijador Davidson y luego sumergidos en los frascos conteniendo este mismo fijador (Fotos 4 y 5).



Foto 3. Selección de camarones enfermos



Foto 4. Fijación con Davidson



Foto 5. Transporte de muestras fijadas

3.3- Fase de Laboratorio

3.3.1- Análisis Microbiológicos

Para realizar los análisis microbiológicos se utilizaron muestras del hepatopáncreas, hemolinfa y branquias, para determinar la presencia de *Vibrio sp.*, en tejido, Rickettsias like NHP y bacterias filamentosas (Foto 6 y 7).



Foto 6. Extracción del hepatopáncreas y branquias



Foto 7. Siembra en medios de cultivo de las muestras extraídas

A) Análisis cualitativo y cuantitativo en tejidos

Estos análisis se realizaron con el fin de diagnosticar e identificar el agente causal de enfermedad y mortalidad. Se analizaron entre 10 - 15 camarones enfermos o moribundos por estanque.

a.1) Muestras de larvas:

Antes de analizar estas muestras se lavaron con solución salina, luego se maceraron en tubos Ependorff conteniendo esta misma solución, este proceso se hizo con la finalidad de realizar posteriormente diluciones 1:10. Luego se sembró la dilución 0.1ml en platos de agar TCBS y TSA y se incubaron por 24 horas a 37°C.

a.2) Muestras de juveniles y adultos:

A cada una de las muestras de camarones tanto juveniles como adultos se les realizó un **examen externo**, para observar la presencia de signos indicativos de enfermedades, tales como: deformidades en el rostrum, manchas negras en el exoesqueleto, antenas quebradas y rojizas, apéndices rojos o amarillentos, urópodos rojos y con ampollas. Las observaciones hechas fueron anotadas en un formato previamente elaborado.

Posterior al examen externo, las muestras se enjuagaron con agua destilada, alcohol al 70% y solución salina para realizar la disección. Se extrajeron muestras de branquias y hepatopáncreas en cada individuo, las que también se sembraron en agar TCBS y TSA e incubadas por 24 horas a 37°C.

a.3) Análisis de hemolinfa:

La hemolinfa fue extraída con jeringas de 1cc, luego ésta fue sembrada en platos con agar TCBS y TSA sembradas por separado incubándose por un periodo de 24 horas a 37°C.

Las cepas sospechosas que crecieron en el agar TCBS fueron suspendidas en solución salina y resembradas en agar TSA conteniendo 1.5% de Cloruro de Sodio e incubadas nuevamente a 37°C por 24 horas más. A las colonias que crecieron en el agar TSA se les realizaron las pruebas de Gram: movilidad en fresco, catalasa y oxidasa.

a.4) Pruebas bioquímicas

Estas pruebas se hicieron en NaCl al 2%, agares TSI, Kligler, Simmons, Movilidad e Índole, Ornitina, Arginina, Gelatina, Caseína, Lisina, Medio basal OF, y a diferentes concentraciones de Solución salina: 0%, 0.5%, 3%, 8%, 10%.

B) Diagnostico en Fresco

b.1) Bacterias filamentosas: *Leucothrix mucor*

La presencia de este tipo de bacterias se determinó mediante el análisis en fresco de las branquias de cada una de las muestras de camarones. Para esto, los individuos ya habían sido previamente enjuagados con agua destilada, alcohol al 70% y solución salina. Las muestras extraídas fueron colocadas en un portaobjetos limpio con una gota de solución salina y examinadas en el microscopio con objetivos 10x, 20x y 40x para revisar completamente los filamentos branquiales. Los resultados obtenidos de este análisis, también fueron anotados en el formato utilizado para el examen externo.

C) Diagnostico de bacterias Rickettsias Like NHP

La identificación de estas bacterias se hizo por medio de métodos moleculares (PCR), empleándose el KIT de diagnostico de Diagxotic para NHP. Utilizándose solamente las muestras del ultimo muestreo.

3.3.2- Métodos Moleculares: PCR

A) Determinación del Virus de Mancha Blanca (WSSV)

Las larvas y postlarvas se fijaron en etanol al 95%, de los camarones juveniles y adultos se fijaron los pleópodos de los mismos ejemplares utilizados en los análisis microbiológicos, en tubos de ensayo estériles igualmente con etanol al 95% en una proporción 1:10.

En el laboratorio de PCR del CIDEA-UCA, se hizo la extracción del ADN de las muestras según el protocolo de extracción para este fin. Los reactivos de PCR utilizados fueron los del kit IQ-2000, para hacer Nested-PCR, los que se prepararon tanto para la primera reacción como para la segunda, tal como lo establece la metodología del kit empleado, requiriendo además de etanol 95%, etanol 70% y agua bidestilada. Los resultados de las reacciones se analizaron a través de electroforesis en gel de Agarosa al 2%.

B) Determinación del Virus de Cabeza Amarilla (YHV)

Se usaron las branquias y tejidos frescos de las muestras. Una vez en el laboratorio, se hizo la extracción de ARN como establece el protocolo de extracción respectivo. Los reactivos que se usaron fueron los del kit IQ-2000 para Nested-PCR, además en la extracción de ARN se utilizó Cloroformo, Isopropanol y agua con DEPC para eliminar RNAsas. Los resultados se analizaron por medio de electroforesis en gel de Agarosa al 2%.

C) Determinación del Virus del Síndrome de Taura (TSV)

Para determinar la presencia de este tipo de virus también se utilizaron muestras frescas de tejidos de las branquias, utilizándose parte de las que se usaron para YHV. Ya que este es también un virus de ARN y que ha sido endémico en el país desde su aparición

3.3.3- Métodos Histopatológicos:

A) Fijación de los individuos

El fijador utilizado fue el *Davidson normal (AFA)* y fue realizada en el campo. Las postlarvas y larvas se fijaron por inmersión directa en frascos de boca ancha con tapón de rosca conteniendo el fijador seleccionado, donde permanecieron por un periodo de 12 a 24 horas. Los juveniles y adultos antes de ser sumergidos en el fijador se les inyectó parte del mismo en diferentes partes del cuerpo. El primer órgano fijado fue el hepatopáncreas debido a que su proceso de descomposición es más rápido que los demás órganos. Se utilizaron jeringas de 3cc para inyectar el fijador directamente en el hepatopáncreas desde diferentes ángulos. Posteriormente se fijaron los 6 segmentos restantes inyectando directamente el fijador en cada segmento.

Una vez realizada la fijación en juveniles y adultos se hizo un corte longitudinal con la ayuda de un bisturí en la parte ventral de cada uno de los camarones, cuidando de no dañar los órganos internos. Finalizado este proceso, se sumergió a los individuos en un frasco conteniendo el fijador Davidson. El periodo de fijación fue de 24 a 72 horas.

Transcurrido el proceso de fijación, los individuos (larvas, postlarvas, juveniles y adultos) se trasladaron a frascos conteniendo alcohol 70%, donde permanecieron hasta que se hizo el proceso de deshidratación.

B) Obtención de las muestras

Antes de iniciar el proceso de deshidratación, a los individuos juveniles y adultos se les cortó las anténulas, antenas, periópodos y pleópodos. Los ojos y la glándula antenal no se cortaron. Posteriormente se cortó longitudinalmente al individuo separándolo en dos mitades. Mediante corte transversal, se separó el cefalotórax del abdomen y se extrajeron muestras de hepatopáncreas y branquias. En los tres primeros segmentos se realizaron cortes transversales y se tomaron muestras del primer y tercer segmento, la última muestra que se extrajo fue la del sexto segmento. Las postlarvas y larvas se procesaron enteras, como una sola pieza.

C) Proceso de Deshidratación

El proceso de deshidratación de las muestras obtenidas se hizo en el **procesador automático de tejidos Histokinette** (Foto 8). Las muestras se colocarán en pequeños cassettes plásticos debidamente rotulados y se colocaron en una canastilla para ser procesados en el procesador automático de tejidos. El proceso de deshidratación tuvo una duración de 16 horas por lo que se realizó durante la noche, para optimizar el tiempo de análisis de las muestras, y se realizó de la siguiente manera:



Foto 8. Proceso de deshidratación de las muestras

- | | |
|------------------------|--------------------------------|
| - Alcohol Etílico 70% | 2 baños de 1 hora y ½ cada uno |
| - Alcohol Etílico 80% | 2 baños de 1 hora y ½ cada uno |
| - Alcohol Etílico 96% | 2 baños de 1 hora y ½ cada uno |
| - Alcohol Etílico 100% | 2 baños de 1 hora y ½ cada uno |
| - Xileno | 2 baños de 1 hora cada uno |
| - Parafina | 2 baños de 1 hora cada uno |

D) Inclusión en Parafina

Finalizado el proceso de deshidratación, las muestras se sacaron del procesador automático de tejidos para realizar la inclusión en parafina. Primeramente se colocaron los moldes de metal en el **embebedor de tejidos**, se les adicionó un poco de parafina líquida y con ayuda de pinzas metálicas de punta fina se colocaron las piezas en el molde, de manera que quedara hacia abajo la parte de interés para ser cortada. Se terminó de llenar el molde con más parafina y colocó encima el cassette de modo que este quedara adherido a la parafina contenida en el molde. Cada molde se colocó luego en la **placa fría** (-5°C) para ayudar a que el bloque de parafina se solidificara. Una vez fríos los bloques, se separó el molde de metal y el bloque de parafina quedó adherido al cassette, listo para hacer los cortes en el micrótopo.

E) Obtención de los Cortes

Una vez que los bloques estuvieron lo suficientemente solidificados, se procedió a realizar los cortes de las muestras en el **micrótopo** (foto 9). Se hicieron cortes de $4\ \mu\text{m}$ de grosor y se colocaron en el baño de flotación conteniendo agua destilada con gelatina, a temperatura de 40°C . La gelatina sirvió para la adhesión de los cortes al portaobjetos donde se hicieron posteriormente las tinciones y los montajes de las muestras.

Cuando se obtuvo el corte adecuado, se extrajo en un portaobjetos limpio y de borde esmerilado con su clave respectiva escrita en la parte esmerilada del portaobjetos. Luego se colocaron en una canastilla para coloración y se dejarán por 1 o 2 horas en la **placa caliente a 50°C** para escurrir la parafina.



Foto 9. Corte de muestras en bloques de parafina

F) Tinción de los Cortes

Se empleó la rutina de tinción de Hematoxilina & Eosina/Floxina de la siguiente:

- Xileno 2 cambios de 5 min. cada uno
- Etanol 100% 2 cambios, 10 sumergidas en cada uno
- Etanol 96% 2 cambios, 10 sumergidas en cada uno
- Etanol 80% 2 cambios, 10 sumergidas en cada uno
- Etanol 50% 1 cambio, 10 sumergidas
- Hematoxilina 5 min.
- Agua corriente 4 min.
- Eosina 2 min.
- Etanol 96% 2 cambios, 10 sumergidas en cada uno
- Etanol 100% 2 cambios, 10 sumergidas en cada uno
- Xileno 4 cambios, 10 sumergidas en cada uno

G) Montaje y conservación de las preparaciones

Una vez teñidas las preparaciones, se hizo el montaje de las mismas adicionando 1 gota de resina sintética sobre el preparado, se cubrió con un cubreobjetos teniendo mucho cuidado que no se formaran burbujas que pudieran interferir en la observación y lectura de los tejidos.

H) Observación y lectura de los preparados al microscopio

Cada preparado se observó cuidadosamente en el microscopio con objetivos de aumento de 4x, 10x, 20x y 40x, para determinar la presencia de organismos patógenos en los tejidos, tales como bacterias intracelulares, virus y parásitos objetos de esta investigación (foto 10).

IV. RESULTADOS OBTENIDOS

4.1 Resultados Microbiológicos

4.1.1- Empresa Camarones del Pacífico (CAMPA)

- **En el muestreo del día 0**, Los resultados obtenidos de la siembra de las larvas de origen silvestre fue 120 UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias por Mililitro) de *Vibrio alginolyticus* y 69 UFC/ml de *Vibrio parahaemolyticus*. Mientras que las larvas de origen panameño (laboratorio) tuvieron un resultado de 280 UFC/ml de *Vibrio alginolyticus*
- **En el muestreo del día 15**, los resultados obtenidos de la siembra de larva silvestre (Poneloya) fueron: 70 UFC/ml de *Vibrio parahaemolyticus* y 200 UFC/ml de *Vibrio alginolyticus*, mientras que en la larva de laboratorio (Pacific Larval de Panamá) fueron 30 UFC/ml de *V. parahaemolyticus*, y 120 UFC/ml de *V. alginolyticus*.
- **En el muestreo del día 30**, dado que los camarones ya tenían tamaño de juvenil temprano, se sembraron muestras de hemolinfa y hepatopáncreas en Agar TCBS. En las branquias se buscaron bacterias filamentosas por medio del **Método del Análisis en Fresco**, siendo el resultado **NEGATIVO** para ambos grupos de larvas.

Tabla 1. Resultados de *Vibrio sp.* encontradas en larva silvestre (día 30)

N° de Muestra	Órgano Examinado	
	Hepatopáncreas	Hemolinfa
Camarón 1	68UFC/ml Colonias A*	6 UFC/ml Colonias A*
Camarón 2	45UFC/ml	12 UFC/ml
Camarón 3	23UFC/ml	40 UFC/ml
Camarón 4	18UFC/ml	18 UFC/ml
Camarón 5	80UFC/ml	1 UFC/ml
Camarón 6	15UFC/ml	6 UFC/ml
Camarón 7	30UFC/ml	2 UFC/ml
Camarón 8	27UFC/ml	0 UFC/ml
Camarón 9	60UFC/ml	9 UFC/ml
Camarón 10	14UFC/ml	0 UFC/ml

* Colonias Amarillas

En la tabla 1 se pueden observar los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón, provenientes del estanque S-32, como se pueden observar los niveles de *Vibrium sp* en cada camarón están normales si se comparan con los valores permisibles que son $<1.0 \times 10^3$ UFC/ml en la hemolinfa de los camarones, las especies de *Vibrio* encontradas en la hemolinfa y hepatopáncreas de los camarones de este estanque fueron *Vibrio harveyi*.

Tabla 2. Resultados de *Vibrio sp.* encontradas en la larva de laboratorio (día 30)

N° de Muestra	Órgano Examinado	
	Hepatopáncreas	Hemolinfa
Camarón 1	45 UFC/ml Colonias A*	14 UFC/ml Colonias A*
Camarón 2	8 UFC/ml	9 UFC/ml
Camarón 3	3 UFC/ml	3 UFC/ml
Camarón 4	9 UFC/ml	6 UFC/ml
Camarón 5	5 UFC/ml	0 UFC/ml
Camarón 6	6 UFC/ml	2 UFC/ml
Camarón 7	2 UFC/ml	12 UFC/ml
Camarón 8	14 UFC/ml	3 UFC/ml

* Colonias Amarillas

En la tabla 2 se observan los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón, provenientes del estanque T-42 a como se pueden observar los niveles de *Vibrium sp* en cada camarón están normales si se comparan con los valores permisibles que son $<1.0 \times 10^3$ UFC/ml en la hemolinfa de los camarones, si se comparan con los valores de los camarones del estanque S32 estos valores están mucho mas bajos que esos, la especie de *Vibrium* encontrada en la hemolinfa y hepatopáncreas de los camarones de este estanque fue *Vibrio alginolyticus*.

- **En el muestreo del día 60** se obtuvieron resultados de la siembra de Hemolinfa, hepatopáncreas y del análisis en fresco de las branquias de camarones juveniles, en este muestreo se tomó muestra del estanque sembrado con larva silvestre y del estanque sembrado con larva de laboratorio

Tabla 3. Resultados de *Vibrio sp.*, y *Leucothrix mucor* en las muestras de Larva Silvestre (día 60)

N° de Muestra	Órgano Examinado		
	Hepatopáncreas	Hemolinfa	Branquias
Camarón 1	Incontables	Incontables	No se observó
Camarón 2	Incontables	100 UFC/100ml	No se observó
Camarón 3	100 UFC/100ml	15 UFC/100ml	No se observó
Camarón 4	Incontables	33 UFC/100ml	No se observó
Camarón 5	Incontables	Incontables	No se observó
Camarón 6	Incontables	Incontables	No se observó
Camarón 7	Incontables	Incontables	No se observó
Camarón 8	Incontables	Incontables	No se observó
Camarón 9	Incontables	Incontables	No se observó
Camarón 10	Incontables	Incontables	No se observó

En la tabla 3 se observan los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón, provenientes del estanque S-32 se puede observar que los niveles de *Vibrio sp.* en cada camarón están demasiado altos $>1.0 \times 10^3$ UFC/ml si se comparan con los valores permisibles que son $<1.0 \times 10^3$ UFC/ml en la hemolinfa de los camarones, esto indica que ya hay una septicemia causada por *Vibrium* en el 70% de los camarones de este estanque, no obstante en las branquias no se observó la presencia de

bacterias filamentosas *Leucothrix mucor*, las especies de *Vibrio* encontradas en la hemolinfa y hepatopáncreas de los camarones de este estanque fueron *V. harveyi* y *V. anguillarum*.

Tabla 4. Resultados de *Vibrio sp.* y *Leucothrix mucor* en las muestras de larva de Laboratorio (día 60)

N° de Muestra	Órgano Examinado		
	Hepatopáncreas	Hemolinfa	Branquias
Camarón 1	90 UFC/ml A*	50 UFC/ml A	No se observó
Camarón 2	Incontables A	Incontables A	No se observó
Camarón 3	100 UFC/ml A	47 UFC/ml A	No se observó
Camarón 4	100 UFC/ml A	100 UFC/ml A	No se observó
Camarón 5	100 UFC/ml A	Incontables A	No se observó
Camarón 6	Incontables A	Incontables A	No se observó
Camarón 7	100 UFC/ml A	Incontables A	No se observó
Camarón 8	Incontables A	Incontables A	No se observó
Camarón 9	100 UFC/ml A	103 UFC/ml A	No se observó
Camarón 10	No se aisló	No se aisló	No se aisló

* Colonias Amarillas

En la tabla 4 se observan los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón provenientes del estanque T-49, se puede observar que los niveles de *Vibrio sp.* que 50% de los camarones presentaron un nivel mayor a 1.0×10^3 UFC/ml, cuando los valores permisibles son $< 1.0 \times 10^3$ UFC/ml en la hemolinfa de los camarones, lo cual nos indica que ya hay un septicemia de *Vibrium sp.*, en por lo menos el 50% de los camarones de este estanque, no obstante en las branquias no se observó la presencia de bacterias filamentosas *Leucothrix mucor*, la especie de *Vibrio* encontradas en la hemolinfa y hepatopáncreas de los camarones de este estanque fue *Vibrio alginolyticus*.

- **En el muestreo del día 90** se obtuvieron los resultados de la siembra de hemolinfa y hepatopáncreas de camarones juveniles en la búsqueda de *Vibrium sp.* y de bacterias filamentosas *Leucothrix mucor* en las branquias.

Tabla 5. Resultados obtenidos de *Vibrio sp.* y *Leucothrix mucor* en las muestras de larva silvestre (día 90)

N° de Muestra	Órgano Examinado		
	Hepatopáncreas	Hemolinfa	Branquias
Camarón 1	Incontables A* y V**	Incontables A y V	No se observó
Camarón 2	Incontables A y V	Incontables A y V	Grado 2
Camarón 3	Incontables A y V	Incontables Ay V	Grado 1
Camarón 4	Incontables A y V	No se aisló	Grado 1
Camarón 5	Incontables Ay V	13 UFC/ V	Grado 1
Camarón 6	Incontables A y V	No se aisló	Grado 1
Camarón 7	133 UFC/ V,	100 UFC/V, 25 A	No se observó
Camarón 8	183 UFC/ V	6 UFC/V	Grado 1
Camarón 9	Incontables A	Incontables A	No se observó
Camarón 10	Incontables A	Incontables A	No se observó

* Colonias Amarillas

** Colonias Verdes

En la tabla 5 se observan los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón, provenientes del estanque S-32, se pueden observar los niveles de *Vibrium sp* en un 50% de los camarones analizados tienen un nivel mayor a 1.0×10^3 UFC/ml en la hemolinfa cuando los valores permisibles son $<1.0 \times 10^3$ UFC/ml en la hemolinfa de los camarones, lo cual nos indica que la septicemia persiste, pero también observamos que un 80% de los camarones de este estanque también tienen niveles demasiado elevados de *Vibrio* en el hepatopáncreas siendo este una señal de afectación a este importante órgano, en las branquias se empieza a observar la presencia de bacterias filamentosas *Leucothrix mucor*, en grados 1 y 2 siendo estos los grados más bajos ya que el grado mayor de afectación es de 6, las especies de *Vibrio* encontradas en la hemolinfa y hepatopáncreas de los camarones de este estanque fueron *Vibrio harveyi* y *V. anguillarum*.

Tabla 6. Resultados obtenidos de *Vibrio sp*, y *Leucothrix mucor* en las muestras de larva de laboratorio (día 90)

N° de Muestra	Órgano Examinado		
	Hepatopáncreas	Hemolinfa	Branquias
Camarón 1	245 UFC/V**	Incontables V	No se observó
Camarón 2	Incontables V	56 UFC/V	No se observó
Camarón 3	24 V, Incontables A*	73 V, Incontables. A	No se observó
Camarón 4	20 UFC/ V	13 UFC/V	No se observó
Camarón 5	59V, Incontables. A	No se aisló	No se observó
Camarón 6	36 V, Incontables. A	1 UFC/V	No se observó
Camarón 7	84 V, Incontables. A	65 UFC/V	No se observó
Camarón 8	50 V, Incontables. A	5 UFC/V	No se observó
Camarón 9	55 V, Incontables. A	100 V, 10 A	No se observó
Camarón 10	48 V, Incontables. A	24 V.	No se observó

* Colonias Amarillas

** Colonias Verdes

En la tabla 6 se observan los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón, provenientes del estanque T-49. También se observan los niveles de *Vibrio sp* en los camarones analizados los que tienen un nivel menor o igual a 1.0×10^3 UFC/ml, en la hemolinfa de los camarones, mas sin embargo en el hepatopáncreas se observan unos niveles $>1.0 \times 10^3$ UFC/ml. Lo que muestra un ataque a este órgano de vital importancia para los camarones, en las branquias no se observan bacterias filamentosas *Leucothrix mucor*, las especies de *Vibrio* encontradas en la hemolinfa y hepatopáncreas de los camarones de este estanque fueron de la especie *Vibrio alginolyticus*.

- **El muestreo del día 120**, este no se pudo realizar debido a que cosecha se hizo antes de los 120 días.

4.1.2 Cooperativa Camilo Ortega Saavedra

- **En el muestreo del día 0**, de las larvas silvestres (Realejo) se obtuvieron los resultados de 73 UFC/ml de *V. alginolyticus*, y 10 UFC/ml de *V. harveyi*.

- **En el muestreo del día 15**, los resultados obtenidos de las muestras de larvas sembradas en Agar TCBS para la búsqueda de *Vibrium sp.*, en las larvas silvestres (El Realejo) fueron: 19 UFC/ml de *V. parahaemolyticus* y 23 UFC/ml de *V. alginolyticus*.
- **En el muestreo del día 30**, dado que los camarones ya tenían tamaño de juvenil temprano, se sembraron muestras de hemolinfa y hepatopáncreas en Agar TCBS para determinar *Vibrium sp.* En las branquias se buscaron bacterias filamentosas por medio del Método del Análisis en Fresco, siendo el resultado **NEGATIVO**.

Tabla 7. Resultados obtenidos de *Vibrio sp.* y *Leucothrix mucor* en las muestras de larva silvestre (día 30)

N° de Muestra	Órgano Examinado		
	Hepatopáncreas	Hemolinfa	Branquias
Camarón 1	90 UFC/ml V**	150 UFC/ml V**	No se observó
Camarón 2	3 UFC/ml	0 UFC/ml	No se observó
Camarón 3	8 UFC/ml	0 UFC/ml	No se observó
Camarón 4	250 UFC/ml	0 UFC/ml	No se observó
Camarón 5	250 UFC/ml	14 UFC/ml	No se observó
Camarón 6	56 UFC/ml	1 UFC/ml	No se observó
Camarón 7	3 UFC/ml	3 UFC/ml	No se observó
Camarón 8	9 UFC/ml	1 UFC/ml	No se observó
Camarón 9	16 UFC/ml	41 UFC/ml	No se observó
Camarón 10	159 UFC/ml	100 UFC/ml	No se observó

** Colonias Verdes

En la tabla 7 se observan los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón, provenientes del estanque 4, se puede observar que los niveles de *Vibrium sp.* en los camarones analizados tienen un nivel menor a 1.0×10^3 UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro), en la hemolinfa y hepatopáncreas de los camarones, lo cual indica que no sufrieron una septicemia bacteriana, en las branquias no se observó la presencia de bacterias filamentosas *Leucothrix mucor*, la especie de *Vibrio* encontradas en la hemolinfa y hepatopáncreas de los camarones de este estanque fue *Vibrio harveyii*.

- **En el muestreo del día 60** se obtuvieron los resultados de la siembra de hemolinfa y hepatopáncreas de camarones juveniles para determinar la presencia de especies de *Vibrio*, y en las branquias bacterias filamentosas.

Tabla 8. Resultados obtenidos de *Vibrio sp.*, y *Leucothrix mucor* en las muestras de larva silvestre (día 60)

N° de Muestra	Órgano Examinado		
	Hepatopáncreas	Hemolinfa	Branquias/filamentosas
Camarón 1	9 UFC/ml A*	0 UFC/ml	No se observó
Camarón 2	100 UFC/ml A	0 UFC/ml	No se observó
Camarón 3	4 UFC/ml A	0 UFC/ml	No se observó
Camarón 4	1 UFC/ml A	1 UFC/ml	No se observó
Camarón 5	74 UFC/ml A	0 UFC/ml	No se observó
Camarón 6	35 UFC/ml A	0 UFC/ml	No se observó
Camarón 7	3 UFC/ml A	0 UFC/ml	No se observó
Camarón 8	1 UFC/ml A	0 UFC/ml	No se observó
Camarón 9	0 UFC/ml A	0 UFC/ml	No se observó
Camarón 10	97 UFC/ml A	0 UFC/ml	No se observó

* Colonias Amarillas

En la tabla 8 se observan los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón, provenientes del estanque 4, se observa que los niveles de *Vibrium sp.* en los camarones analizados presentaron un nivel menor a 1.0×10^3 UFC/ml, en la hemolinfa y en el hepatopáncreas de los camarones, lo que indica que estaban sanos. La especie de *Vibrio* encontradas en el hepatopáncreas fue *Vibrio harveyii* y *V. hollisae*. En las branquias no se encontraron bacterias filamentosas *Leucothrix mucor*.

- Los resultados del muestreo efectuado a los **90 días** de cultivo se muestran en la tabla 9

Tabla 9. Resultados obtenidos de *Vibrio sp.*, y *Leucothrix mucor* en las muestras de larva silvestre (día 90)

N° de Muestra	Órgano Examinado		
	Hepatopáncreas	Hemolinfa	Branquias
Camarón 1	128 UFC/A*	No se aisló	Grado 1
Camarón 2	121 UFC/A	10 A, y 7 V	No se observó
Camarón 3	Incontables A	Incontables A	No se observó
Camarón 4	Incontables	13 A, y 7 V	Grado 1
Camarón 5	Incontables A y V**	1 UFC/A	No se observó
Camarón 6	131 V, y 100 A	No se aisló	No se observó
Camarón 7	Incontables A	32 A, y 8 V	No se observó
Camarón 8	64 V, Incontables. A	No se aisló	No se observó
Camarón 9	44 V, Incontables. A	No se aisló	No se observó
Camarón 10	20V, Incontables. A	1 A	No se observó

* Colonias Amarillas

** Colonias Verdes

En la tabla anterior se observan los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón, provenientes del estanque 4. Los niveles de *Vibrium sp.* en los camarones analizados tuvieron niveles menores a 1.0×10^3 UFC/ml, en la hemolinfa, en el hepatopáncreas del 50 % de los camarones mostraron niveles mayores de 1.0×10^3 UFC/ml, lo que indica que hubo afección bacteriana este órgano. En las branquias, en el

90% de los camarones no se observó la presencia de bacterias filamentosas *Leucothrix mucor*, solamente en el 10% de los mismos se observó y en grado 1, siendo el grado mayor 6. La especie de *Vibrio* encontradas en el hepatopáncreas y hemolinfa fue *Vibrio harveyii*.

- En el muestreo del día 120, este no se realizó debido a que los socios de la cooperativa se vieron obligados a cosechar antes de los 120 días, sin previo aviso.

4.1.3- Granja Demostrativa CIDEA-UCA.

- En el muestreo del día 0, se encontraron 270 UFC/ml de *Vibrio harveyii*
- En el muestreo del día 15, se encontraron los resultados de 360 UFC/ml de colonias de *Vibrio harveyii*
- En el muestreo del día 30 se muestrearon los estanques A6, y B1, donde se buscó en la hemolinfa, hepatopáncreas y branquias agentes patógenos bacterianos.

Tabla 10. Resultados obtenidos de *Vibrio sp*, y *Leucothrix mucor* en las muestras de larva silvestre (día 30)

N° de Muestra	Órgano Examinado		
	Hepatopáncreas	Hemolinfa	Branquias
Camarón 1	153 A*	No se aisló	No se observó
Camarón 2	Incontables A	No se aisló	No se observó
Camarón 3	100 A	No se aisló	No se observó
Camarón 4	18 A y 1 V**	No se aisló	No se observó
Camarón 5	100 A y 2 V	No se aisló	No se observó
Camarón 6	100 A y 1 V	No se aisló	No se observó
Camarón 7	Incontables A	No se aisló	No se observó
Camarón 8	Incontables A	No se aisló	No se observó
Camarón 9	Incontables A	No se aisló	No se observó
Camarón 10	Incontables A	No se aisló	No se observó

* Colonias Amarillas

** Colonias Verdes

En la tabla 10 se observan los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón, provenientes del estanque B1. No se logró aislar ni una colonia bacteriana procedente de la hemolinfa donde su valor normal es de $<1.0 \times 10^3$ UFC/ml, mientras que en el hepatopáncreas el 50 % de los camarones tuvieron niveles mayores de 1.0×10^3 UFC/ml, siendo evidencia de afección presentada en este órgano. La especie de *Vibrio* encontradas en el hepatopáncreas de los camarones de este estanque fue *Vibrio harveyii*. En las branquias no se encontró presencia de bacterias filamentosas *Leucothrix mucor*.

Tabla 11. Resultados obtenidos de *Vibrio sp.* y *Leucothrix mucor* en las muestras de larva silvestre (día 30)

N° de Muestra	Órgano Examinado		
	Hepatopáncreas	Hemolinfa	Branquias
Camarón 1	94 V y 9 A*	No se aisló	No se observó
Camarón 2	23 V y 2 A	No se aisló	No se observó
Camarón 3	Incontables V y A	Incontables V y 47 A	No se observó
Camarón 4	23 V y 10 A	No se aisló	No se observó
Camarón 5	Incontables V y 16 A	No se aisló	No se observó
Camarón 6	176 V y 18 A	No se aisló	No se observó
Camarón 7	18 A y 120 V**	Incontables V y A	No se observó
Camarón 8	110 V 47 A	56 V	No se observó
Camarón 9	Incontables A y V	Incontables V y 9 A	No se observó
Camarón 10	Incontables A y V	Incontables A	No se observó

* Colonias Amarillas

** Colonias Verdes

En la tabla 11 se observan los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón, provenientes del estanque A-6. El 40 % de los camarones de este estanque sufrieron septicemia bacteriana, ya que los niveles de bacterias en la hemolinfa son mayores a 1.0×10^3 UFC/ml, lo mismo sucede en el hepatopáncreas lo que indica que hay una clara afección a este órgano. Las especies de *Vibrio* encontradas en el hepatopáncreas y hemolinfa de los camarones de este estanque fueron *Vibrio harveyii* y *V. alginolyticus*. En las branquias de los camarones no se observó la presencia de bacterias filamentosas.

- **En el muestreo del día 55** se muestrearon los estanques A-6, y B-1, para determinar presencia de agentes bacterianos en la hemolinfa, hepatopáncreas, y branquias.

Tabla 12. Resultados obtenidos de *Vibrio sp.* y *Leucothrix mucor* en las muestras de larva silvestre (día 60)

N° de Muestra	Órgano Examinado		
	Hepatopáncreas	Hemolinfa	Branquias
Camarón 1	150 V**	12 V	No se observó
Camarón 2	21 V, y 2 A*	108 V, y 8 A	No se observó
Camarón 3	115 V	Incontables A	No se observó
Camarón 4	56 V, y 26 A	No se aisló	No se observó
Camarón 5	156 V, incontables A	No se aisló	No se observó
Camarón 6	56 V, y 5 A	8 V	No se observó
Camarón 7	65 V, y 8 A	14 V y 1 A	No se observó
Camarón 8	1 V	No se aisló	No se observó
Camarón 9	5 V	No se aisló	No se observó
Camarón 10	Incontables V y A	4 V	No se observó

* Colonias Amarillas

** Colonias Verdes

En la tabla 12 se observan los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón, provenientes del estanque A-6; se observó disminución de los niveles bacterianos en la hemolinfa de los camarones de este estanque $< 1.0 \times 10^3$ UFC/ml, lo mismo sucede en el hepatopáncreas. La especie de *Vibrio* encontrada en el hepatopáncreas y hemolinfa de los camarones de este estanque fue *Vibrio harveyii*. En las branquias de los camarones no se observó la presencia de bacterias filamentosas *Leucothrix mucor*.

Tabla 13. Resultados obtenidos de *Vibrio sp*, y *Leucothrix mucor* en las muestras de larva silvestre (día 90)

N° de Muestra	Órgano Examinado		
	Hepatopáncreas	Hemolinfa	Branquias
Camarón 1	Incontables A	8 V y 9 A*	No se observó
Camarón 2	Incontables A	Incontables A	No se observó
Camarón 3	Incontables A	Incontables A	No se observó
Camarón 4	265 A	Incontables A	No se observó
Camarón 5	Incontables A	1 V**	No se observó
Camarón 6	48 A y 1 V	Incontables A	No se observó
Camarón 7	Incontables A	291 A	No se observó
Camarón 8	Incontables A	7 A	No se observó
Camarón 9	Incontables A	Incontables A	No se observó
Camarón 10	Incontables A	Incontables A	No se observó

* Colonias Amarillas

** Colonias Verdes

En la tabla 13 se observan los resultados obtenidos de la siembra de la hemolinfa y hepatopáncreas de cada camarón, provenientes de el estanque B1, se observó septicemia bacteriana en el 60 % de estos camarones donde los niveles de bacterias en la hemolinfa son mayores de 1.0×10^3 UFC/ml, también se observó que hubo afectación al hepatopáncreas. La especie de *Vibrio* encontrada en el hepatopáncreas y hemolinfa de los camarones de este estanque fue *Vibrio harveyii* en las branquias no se observó la presencia de bacterias filamentosas.

- **En el muestreo del día 90**, este fue el día de la cosecha, los camarones fueron recolectados al momento de la cosecha y luego puestos en bolsas plásticas con agua y oxígeno del estanque pero al parecer el alto estrés y el transporte provocó que los camarones murieran antes de llegar al laboratorio por lo que solo se pudo tomar la muestra de NHP para PCR antes de que tejido empezara su autólisis.

◆ **Resultados de Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP)**

Tabla 14. Resultados obtenidos de NHP en las muestras de camarones de las granjas CAMPA, Camilo Ortega y CIDEA-UCA

Días de cultivo	# de muestras	Granjas				
		CAMPA		Camilo O	CIDEA	
		T-49	S-32	E-4	A-6	B-1
90 (17-09-01)	10 adultos		Neg			
90 (17-09-01)	10 adultos	Neg				
90 (27-09-01)	10 adultos			Neg		
90 (25-10-01)	10 adultos				Neg	
90 (25-10-01)	10 adultos					Neg

En la tabla 14, se muestran los resultados de NHP, estos resultados son de los últimos muestreos realizados en cada granja, utilizándose muestra de los pleópodos de cada camarón que fijados en alcohol al 95%, no lográndose detectar la presencia de esta bacteria en ninguna de las muestras.

4.2 Resultados obtenidos con la técnica de PCR

Para el análisis de los virus mancha blanca (WSSV), cabeza amarilla (YHV) y Síndrome del virus Taura (STV), se utilizaron Kits de PCR, estos kits son de la empresa IQ 2000, para cada virus se utilizó un kit específico.

En el caso de la toma de la muestra del día 0 (Siembra), se tomaron 300 larvas antes de ser sembradas en los estanques estas fueron fijadas en alcohol 95% y transportadas en frascos de vidrio con tapón a presión, esto mismo sucedió con las larvas del día 15. Del mismo modo también fueron transportados los camarones del día 30 con la excepción de que en esos días se tomaron un total de 10 camarones por cada muestreo. En los muestreos de los días 60 y 90 se tomó como muestra los pleópodos, branquias y músculo de 10 camarones juveniles que se tomaron para la muestra de microbiológica y que fueron transportados vivos al laboratorio en bolsas plásticas con agua del estanque y saturada con suficiente oxígeno.

4.2.1 Empresa Camarones del Pacífico (CAMPA)

En la tabla 15, se puede observar que las larvas de origen silvestre estaban infectadas con el virus de la mancha blanca, el mismo resultado se obtuvo de las post larvas del día 15, sin embargo se observó que en el muestreo del día 30 resultaron negativas cada una de las 10 muestras de ese muestreo, mientras que en el muestreo del día 60 solo 3 camarones resultaron positivos de los 10 que ese día se muestrearon, mientras que en el muestreo del día 90 solo 1 camarón resultó positivo, todos los resultados del virus de cabeza amarilla fueron negativos. En el caso del virus Taura se puede observar que este apareció en esta granja hasta el día 90 de cultivo lográndose detectar en un solo individuo.

Tabla 15. Resultados de la prevalencia obtenidos para los virus de WSSV, YHV, TSV en el estanque S-32

Días de cultivo	N° muestras	Resultados (% Ind. positivos)		
		WSSV	YHV	TSV
0 (21-06-01)	60 larvas	100	0	0
15 (05-07-01)	30 pl.	100	0	0
30 (16-07-01)	10 juveniles	0	0	0
60 (20-08-01)	10 adultos	30	0	0
90 (17-09-01)	10 adultos	10	0	10

En la tabla 16, se muestra que las larvas de laboratorio llegaron infectadas con mancha blanca a esta granja, luego se observó en los muestreos de los días 15 y 30 no se detectó el virus de la mancha blanca, luego se presentó una clara ascendencia en el número de los casos, en el día 60 de los 10 camarones que esa vez se muestrearon solo 3 resultaron positivos por mancha blanca, pero para el día 90 se detectaron 6 camarones infectados, lo que indica que la infección estaba aumentando, En el caso del virus de la cabeza amarilla no se detectó. El virus de Taura se detectó en un solo individuo.

Tabla 16. Resultados de la prevalencia obtenidos para los virus de WSSV, YHV, TSV en el estanque T-49

Días de cultivo	N° muestras	Resultados (% Ind. positivos)		
		WSSV	YHV	TSV
0 (22-06-01)	60 larvas	100	0	0
15 (05-07-01)	30 pl.	0	0	0
30 (16-07-01)	10 juveniles.	0	0	10
60 (20-08-01)	10 adults	30	0	0
90 (17-09-01)	10 adults	60	0	0

4.2.2 Cooperativa Camilo Ortega Saavedra

En la tabla 17, se muestra que el virus de la mancha blanca se detectó en el día 0 (Siembra) pero en los siguientes muestreos este virus no se detectó. El virus de cabeza amarilla no se detectó en ningún muestreo. Mientras que el virus Taura resultó positivo en este estanque donde se detectaron 2 camarones infectados.

Tabla 17. Resultados de la prevalencia obtenidos para los virus de WSSV, YHV, TSV en Estanque 4

Días de cultivo	N° muestras	Resultados (% Ind. positivos)		
		WSSV	YHV	TSV
0 (25-06-01)	60 larvas	100	0	0
15 (09-07-01)	30 pl.	0	0	0
30 (30-07-01)	10 juveniles	0	0	0
60 (29-08-01)	10 adultos	0	0	10
90 (27-09-01)	10 adultos	0	0	10

4.2.3 Granja Demostrativa CIDEA-UCA.

En la tabla 18, se observa que el virus de la mancha blanca mostró resultados negativos en este estanque, al igual que el virus de la cabeza amarilla, caso contrario con el virus de Taura cuyos resultados mostraron que 9 camarones en total de los examinados resultaron infectados con este virus.

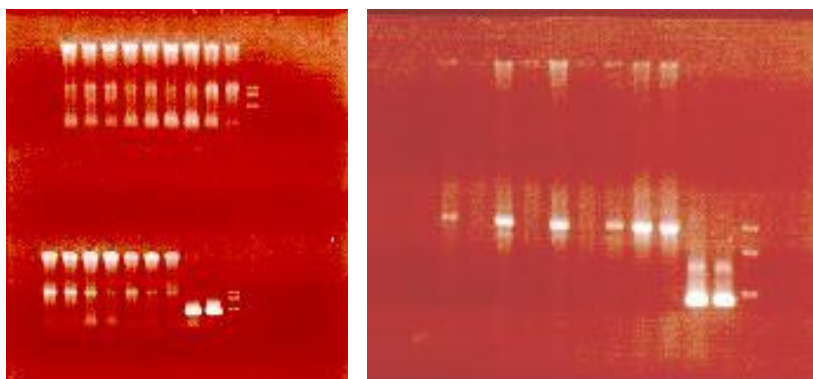
Tabla 18. Resultados de la prevalencia obtenidos para los virus de WSSV, YHV, TSV en el estanque A-6

Días de cultivo	N° muestras	Resultados (% Ind. positivos)		
		WSSV	YHV	TSV
0 (01-08-01)	60 larvas	0	0	0
15 (15-08-01)	30 pl.	0	0	60
30 (01-09-01)	10 juveniles	0	0	30
60 (25-09-01)	10 adultos	0	0	0
90 (25-10-01)	10 adultos	0	0	0

En la tabla 19, se muestra que no se detectó la presencia del virus de mancha blanca en este estanque y granja, sucediendo lo mismo con el virus de la cabeza amarilla. Caso contrario con el virus de Taura quien si estuvo presente en el estanque en el cual 6 camarones en total se identificaron infectados con este virus.

Tabla 19. Resultados de la prevalencia obtenidos para los virus de WSSV, YHV, TSV en el estanque B-1

Días de cultivo	N° muestras	Resultados (% Ind. positivos)		
		WSSV	YHV	TSV
0 (01-08-01)	60 larvas	0	0	0
15 (15-08-01)	30 pl.	0	0	30
30 (01-09-01)	10 juveniles	0	0	30
60 (25-09-01)	10 adultos	0	0	0
90 (25-10-01)	10 adultos	0	0	0



Fotos 11 y 12: Algunos resultados negativos de Mancha blanca (WSSV) obtenidos en las tres granjas muestreadas

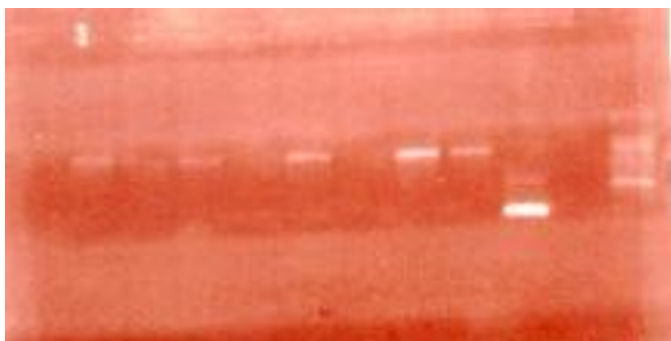


Foto 13: Resultados negativos de Cabeza amarilla YHV en las tres granjas muestreadas

4.3 Resultados obtenidos mediante técnicas de histopatología

4.3.1 Empresa Camarones del Pacífico (CAMPA)

En esta empresa se realizó un total de 5 muestreos. Se tomaron muestras de post-larvas a partir del día 15, después de realizada la siembra. Se analizó un total de **70** muestras entre post-larvas, juveniles y adultos. A continuación se describe el comportamiento de los patógenos encontrados por estanque.

Estanque S-32: Tal como se ha mencionado anteriormente, este estanque fue sembrado con larva silvestre colectada en Poneloya. La presencia de patógenos en este estanque fue relativamente baja. Se encontraron dos tipos de virus: mancha blanca (WSSV) en grado 1 (G-1) y el virus del Síndrome de Taura (TSV) en G-1 y G-2 (Ver tabla N° 25. Grados de infección, en anexos). Respecto a la presencia de bacterias, se encontraron bacterias del tipo de *Vibrio sp.*, los grados de infección varían desde G-1, G-2, G-3 y G-4, encontrándose que el grado de infección predominante fue el G-1. Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP) se encontró en G-1 y *Leucothrix mucor* también en grado de infección 1. Dentro de las tres especies de bacterias encontradas, se observó que *Vibrio sp.* afectó al mayor número de camarones respecto a las otras especies. El número de muestras positivas representó el 10% del total de muestras analizadas.

Con relación a las especies de parásitos protozoos, se encontraron dos especies: *Epistylis sp.*, y *Zoothamnium sp.*, ambas especies en el menor grado de infección (G-1), observándose que la primera especie afectó a más muestras (11.4%). Otro tipo de patógenos encontrados fue Gregarinas en dos de sus estadios de desarrollo: Gametocistos y Trofozoitos de 1, 2 y 3 divisiones; el grado de infección encontrado fue G-1 y en las especies infectadas se observó la predominancia de Trofozoitos. En la tabla N° 20 se muestra el tipo de patógenos encontrados por fecha de muestreo, así como el número de muestras afectadas por cada uno de ellos.

Tabla 20. Número de muestras infectadas por diferentes patógenos en el estanque S-32

Fechas de muestr.	Virus		Bacterias			Protozoos epibiontes			Gregarinas	
	WSSV	TSV	<i>Vibrio sp.</i>	NHP	<i>Leucotrix mucor</i>	<i>Epistylis sp.</i>	<i>Zoothamnium sp.</i>	<i>Acineta sp.</i>	Gametocistos	Trofozoitos
Julio-05-2001	0	0	5	0	1	0	1	0	0	0
Julio-16-2001	1	1	9	0	0	1	3	0	0	3
Agost-20-2001	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3
Sept.-17-2001	0	0	0	2	2	3	0	0	1	2
Oct-15-2001	0	0	0	1	0	4	1	0	0	0
TOTAL	1	1	14	3	3	8	5	0	6	8

El porcentaje de prevalencia de los patógenos encontrados en este estanque fue el siguiente: WSSV y TSV fue de 1.4 %. *Vibrio sp.*, representó el 20%, NHP y *Leucothrix mucor* 4.3%, *Epistylis sp.*, 11.4%, *Zoothamnium sp.*, 7.17%, Gametocistos de gregarinas 8.6% y los trofozoitos 14.4%. (Ver tabla 26. Cálculo de porcentaje de prevalencia, en anexos).

Estanque T-49: Sembrado con larva procedente de laboratorio, en este estanque solamente se encontró un tipo de virus, WSSV, en G-1 en un individuo de los 70 analizados, a diferencia del estanque S-32, no se encontró presencia del virus de Taura. Dentro del grupo de las bacterias se observó presencia de *Vibrio sp.* en grados de infección 1, 2 y 3 a diferencia del estanque S-32 donde se alcanzó el grado máximo de infección (G-4), también el número de individuos afectados fue menor respecto al estanque S-32, por lo tanto el porcentaje de prevalencia de estas bacterias es menor en este estanque T-49. NHP fue negativo mientras que las bacterias filamentosas *Leucothrix mucor* se presentó en pocas muestras pero en G-2 y G-3, más alto en relación con el estanque anterior.

Los parásitos branquiales que se encontraron corresponden mayormente a *Epistylis sp.*, pero el grado de infección de los organismos fue el más bajo (G-1), al igual que en el estanque S-32. *Zoothamnium sp.*, se observó infectando a un solo organismo en G-1. Los parásitos intestinales encontrados también corresponden a Gregarínidos en dos fases de desarrollo Gametocistos G-1 en un individuo y trofozoitos de 1, 2 y 4 divisiones en grados 1 y 2. El número de individuos afectados y el tipo de patógenos encontrados se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Número de muestras infectadas por diferentes patógenos en el estanque T-49

Fechas de muest.	Virus		Bacterias			Protozoos epibiontes			Gregarinas	
	WSSV	TSV	<i>Vibrio sp.</i>	NHP	<i>Leucotrix mucor</i>	<i>Epistylis sp.</i>	<i>Zoothamnium sp.</i>	<i>Acineta sp.</i>	Gameto cistos	Trofozoitos
Julio-05-2001	0	0	7	0	2	0	0	0	0	1
Julio-16-2001	1	0	4	0	0	5	0	0	0	2
Agost-20-2001	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Sept.-17-2001	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Oct-15-2001	0	0	1	0	1	2	1	0	0	0
TOTAL	1	0	12	0	3	13	1	0	1	3

La prevalencia de los patógenos encontrados en este estanque corresponde al 1.4% para WSSV, 17.1% *Vibrio sp.*, 4.3% bacterias filamentosas *Leucothrix mucor*, 18.6% *Epistylis sp.*, 1.4% *Zoothamnium sp.*, 1.4% gametocistos de gregarinas y 4.3% los trofozoitos.

4.3.2 Cooperativa Camilo Ortega Saavedra

En esta cooperativa se realizaron 4 muestreos a partir del día 15 después de realizada la siembra, el muestreo correspondiente a los 120 días no se realizó debido a que se cosechó antes de que el cultivo alcanzara este periodo de tiempo, por las altas mortalidades registradas. En la misma se tomaron muestras del estanque 4, sembrado con larva silvestre de El Realejo. Al igual que en CAMPA se analizaron un total de 70 muestras en los estadíos de vida del camarón de post-larva, juveniles y adultos.

Según los resultados obtenidos en este estanque, el virus de la mancha blanca (WSSV) no se registró en este estanque, no así el virus del síndrome de Taura (TSV) el cual fue encontrado en dos camarones juveniles tardíos, el grado de afectación en estas muestras fue 1, 2 y 3 y los órganos afectados fueron el órgano linfóide, las branquias, tejido epitelial del estómago y el tejido conectivo. Las bacterias que se pudieron observar corresponden a *Vibrio sp.*, en grados 1, 2 y 3, el órgano donde se observaron en mayor número fue en el hepatopáncreas donde el grado de infección alcanzó el G-3. Las bacterias NHP fueron observadas en el último día de muestreo en tres de las muestras analizadas, los grados de severidad corresponden a G-1 y G-2.

Los protozoos parásitos que más infección causaron a los organismos en cultivos corresponden a la especie *Epistylis sp.*, donde los grados registrados fueron G-1, G-2 y G-3 y el número de individuos afectados fue bastante alto, tal como se observa en la tabla 22. *Zoothamnium sp.*, fue registrada en grados 1 y 2, mientras que *Acineta sp.*, afectó a menor número de individuos en relación a las dos especies anteriores, el grado de infección alcanzado fue G-1. La presencia de Gregarinas en sus estados de gametocistos y trofozoitos fue baja y los grados de infección registrados fueron G-1 y G-2, encontrándose mayormente en el intestino posterior.

Tabla 22. Número de muestras infectadas por diferentes patógenos en el estanque 4

Fechas de muestr.	Virus		Bacterias			Protozoos epibiontes			Gregarinas	
	WSSV	TSV	<i>Vibrio sp.</i>	NHP	<i>Leucotrix mucor</i>	<i>Epistylis sp.</i>	<i>Zoothamnium sp.</i>	<i>Acineta sp.</i>	Gametocistos	Trofozoitos
Julio-09-2001	0	0	8	0	1	1	0	0	0	0
Julio-30-2001	0	0	5	0	1	7	2	0	0	0
Agost-29-2001	0	2	2	0	0	7	3	2	1	0
Sept.-27-2001	0	0	3	3	0	8	3	2	0	1
TOTAL	0	2	18	3	2	23	8	4	1	1

La prevalencia registrada de los patógenos encontrados fue para TSV 2.9%, *Vibrium sp.*, 25.7%, NHP 4.3%, *Leucothrix mucor* 2.9%, *Epistylis sp.*, 33%, *Zoothamnium sp.*, 11.4%, *Acineta sp.*, 5.38%, gametocistos y trofozoitos de gregarinas 1.4% cada uno.

4.3.3 Granja Demostrativa CIDEA-UCA.

Al igual que en las granjas anteriores, el levantamiento de muestras en esta granja se realizó 15 días después de realizada la siembra de larvas de laboratorio procedentes de Jiquilillo. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Estanque A-6: Los análisis realizados para determinar la presencia de virus en este estanque, resultaron positivos solamente para el virus de la mancha blanca (WSSV) durante el primer día de muestreo, es decir en post-larva; el órgano donde se observó afectación en G-1 fue en la glándula antenal. El virus de Taura no fue observado en este estanque. Las especies de bacterias encontradas correspondieron a *Vibrio sp.*, encontrándose mayor afectación en el hepatopáncreas, donde los grados de infección fueron variables, desde G-1, G-2 y G-3. Otra especie de bacterias encontrada fue NHP, observándose que su aparición se dio a finales del cultivo, y que afectó a mayor número de individuos en relación con *Vibrio sp.*, los grados de infección observados en el hepatopáncreas fueron G-1, G-2 y G-3. No se encontró presencia de bacterias filamentosas *Leucothrix mucor* en este estanque.

Los epicomensales de las branquias correspondieron a las especies de *Epistylis sp.*, cuya aparición se observó a partir del segundo muestreo, el número de individuos afectados por estos protozoos fue variable, al igual que el número de individuos parasitados y los grados de infección los que alcanzaron desde el grado más bajo hasta el más alto (G-1, G-2, G-3 y G-4). *Zoothamnium sp.*, también fue encontrado en las muestras analizadas igualmente a partir del segundo día de muestreo y en cantidades variable, tal como se observa en la tabla 23. A diferencia de *Epistylis sp.*, los grados de infestación por *Zoothamnium sp.*, fueron G-1 y G-4. *Acineta sp.*, no fue encontrada en ninguna de las muestras. Los Gametocistos y trofozoitos de gregarinas se encontraron en cantidades considerables a partir del segundo muestreo. Los gametocistos se encontraron en mayor número en el intestino posterior y en el ciego hepático posterior en grados 1, 2 y 3, mientras que los trofozoitos se observaron a lo largo del intestino con divisiones de 1, 2 y 3, y con grados 1, 2, 3 y 4.

Tabla 23. Número de muestras infectadas por diferentes patógenos en el estanque A-6 del CIDEA-UCA

Fechas de muestr.	Virus		Bacterias			Protozoos epibiontes			Gregarinas	
	WSSV	TSV	<i>Vibrio sp.</i>	NHP	<i>Leucotrix mucor</i>	<i>Epistylis sp.</i>	<i>Zoothamnium sp.</i>	<i>Acineta sp.</i>	Gameto cistos	Trofo zoitos
Agost-15-01	2	0	5	0	0	0	0	0	0	0
Sept-01-01	0	0	5	0	0	10	2	0	6	8
Sept-25-01	0	0	0	9	0	7	3	0	5	7
Oct.-25-01	0	0	2	6	0	8	2	0	6	2
TOTAL	2	0	12	15	0	25	7	0	17	17

De acuerdo con los datos observados en la tabla anterior, se puede decir que WSSV tuvo una prevalencia del 2.9%, mientras que las bacterias del tipo *Vibrio sp.*, su prevalencia alcanzada fue de 17.1% y NHP 21.4%. Los protozoos mostraron prevalencia variables, *Epistylis sp.*, 35.7% muy por encima de *Zoothamnium sp.*, con el 10%. Los estadios de gametocistos y trofozoitos de gregarinas prevalecieron de igual manera con 24.3%.

Estanque B-1: Al igual que en el estanque A-6, los resultados referente a la presencia de virus de camarones solamente fueron positivos para WSSV durante el primer día de muestreo, donde se encontró en la glándula antenal, epitelio del hepatopáncreas, branquias y tejido conectivo de un solo individuo en el menor grado de afectación (G-1). El síndrome del virus de Taura no fue observado en ninguna de las muestras analizadas. Las bacterias correspondientes a *Vibrio sp.*, se encontraron en grados 2 y 3 también infectando el hepatopáncreas a lo largo del cultivo pero con tendencia a disminuir de acuerdo a los resultados que se muestran en la tabla 24, pero las bacterias más numerosas observadas fueron las correspondientes a NHP, que al igual que en el estanque anterior, aparecieron a partir del segundo muestreo, con grados de infección 1, 2 y 3.

Respecto a los parásitos de las branquias, *Epistylis sp.*, fue la especie predominante, mostrándose en altas cantidades y con tendencia a aumentar durante el cultivo, según los datos de la tabla 24. Los grados de infección que se observaron en los organismos afectados van desde el G-1 hasta el G-4. *Zoothamnium sp.*, también fue encontrado en los individuos analizados durante todo el cultivo, pero en menor cantidad que la especie antes mencionada. Los grados de infección fueron 1, 2 y 3.

En el intestino de los organismos objeto de estudio, a partir del tercer muestreo comenzaron a observarse los estadios de gametocistos de gregarinas principal en el intestino posterior en grados 1 y 2, en cambio, el estadio de trofozoitos fue registrado durante todo el ciclo de cultivo, donde se observó que predominaron los individuos con 1 y 2 divisiones, los que alcanzaron todos los grados de infección, desde G-1 hasta G-4.

**Tabla 24. Número de muestras infectadas por diferentes patógenos
en el estanque B-1 del CIDEA-UCA**

Fechas de muestr.	Virus		Bacterias			Protozoos epibiontes			Gregarinas	
	WSSV	TSV	<i>Vibrio sp.</i>	NHP	<i>Leucotrix mucor</i>	<i>Epistylis sp.</i>	<i>Zoothamnium sp.</i>	<i>Acineta sp.</i>	Gameto cistos	Trofo zoitos
Agost-15-01	1	0	2	0	0	5	5	0	0	2
Sept-01-01	0	0	4	0	0	5	4	0	0	4
Sept-25-01	0	0	1	7	0	10	5	2	3	6
Oct.-25-01	0	0	1	7	0	10	2	5	4	4
TOTAL	1	0	8	14	0	30	16	7	7	16

El virus de la mancha blanca (WSSV) mostró prevalencia de 1.4% en este estanque, mientras que en el caso de las bacterias *Vibrio sp.*, alcanzó el 11.4% en cambio NHP el 20%. En el grupo de los protozoos epibiontes *Epistylis sp.*, fue la especie que más predominancia mostró respecto a las demás especies, pues su porcentaje de prevalencia fue del 43%, muy por encima de *Zoothamnium sp.*, con 23% y *Acineta sp.*, 10%. Los parásitos gregarínidos en su fase de gametocistos prevalecieron en un 10%, mientras que en la etapa de trofozoitos prevalecieron en un 23%.

V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Algunos de los resultados que se obtuvieron utilizando las tres técnicas de diagnósticos de microbiología, PCR e histología, mostraron resultados variables, para una mejor comprensión de estos resultados se hará a continuación un análisis por tipos de patógenos encontrados en los estanques de las tres granjas objeto de estudio utilizando las tres técnicas de diagnóstico.

5.1 Virus

Se determinó la presencia de los virus de la mancha blanca (WSSV), Síndrome de Taura (TSV) y el virus de la cabeza amarilla (YHV), utilizando las técnicas de diagnóstico de histología y PCR. Los resultados fueron positivos en el caso de los dos primeros tipos de virus. A través de PCR se determinó la presencia de individuos positivos para **WSSV** en los estanques S-32 y T-49 de la empresa CAMPA al inicio del cultivo, desapareciendo a los 30 días de cultivo en el caso del estanque S-32 y a los 15 y 30 días en el caso del estanque T-49. Posteriormente se volvieron a registrar individuos positivos a los 60 y 90 días de cultivo en ambos estanques. En el estanque 4 de la cooperativa Camilo Ortega también se obtuvieron resultados positivos únicamente en el primer día de muestreo, posteriormente los resultados obtenidos fueron negativos durante el cultivo. Los resultados de la granja de CIDEA-UCA fueron negativos. Con las técnicas histopatológicas se obtuvieron resultados positivos para este mismo virus en los dos estanques de CAMPA S-32 y T-49, así como en los estanques del CIDEA-UCA, A-6 y B-1. La prevalencia que se registró fue relativamente baja, con promedio del 1.4%. Camilo Ortega presentó resultados negativos.

El virus de Taura fue encontrado en los 5 estanques de las tres granjas muestreadas, según los resultados de PCR, donde los porcentajes de prevalencia fueron mayores en el CIDEA (60% y 30%). Con las técnicas histopatológicas se pudieron observar individuos positivos en las granjas CAMPA, estanque S-32 y Camilo Ortega estanque 4, los porcentajes de prevalencia registrados fueron 1.4% y 2.9% respectivamente.

Las variaciones con las dos técnicas en cuanto a resultados positivos y negativos en las tres granjas, pudieron ser debido a que no se utilizaron las mismas muestras para realizar tanto las pruebas de PCR como histológicas, dado que por problemas técnicos las muestras utilizadas para histología fueron fijadas en el campo y ya no eran adecuadas para realizar PCR.

Las técnicas histopatológicas también se utilizaron para determinar la presencia de los virus de la Necrosis Infecciosa Hipodermal y Hematopoyética (IHHNV) y Baculovirus Penei (BP), pero los resultados fueron negativos en los 5 estanques de las 3 granjas muestreadas.

5.2- Protozoos epibiontes y parásitos

Los protozoos parásitos de los camarones han sido agrupados dentro de los grupos conocidos como gregarinas, haplosporidios y microsporidios. Los mismos son considerados como parásitos estrictos y se encuentran internamente. En cambio, los protozoos epibiontes o ectocomensales se presentan sobre o cerca de la superficie externa de los camarones, pudiendo estar presentes en número masivo o no, dependiendo del manejo proporcionado a los crustáceos.

Estos tipos de parásitos fueron determinados utilizando únicamente las técnicas histopatológicas, mediante las cuales se logró identificar 3 especies de protozoos epibiontes y un tipo de parásitos intestinales.

5.2.1 Protozoos epibiontes

Se logró determinar en las branquias de los individuos examinados la presencia de *Epistylis sp.*, *Zoothamnium sp.*, y *Acineta sp.*, aunque estas tres especies no se observaron en todos los estanques muestreados. *Epistylis sp.*, y *Zoothamnium sp.*, se observaron en los 2 estanques de CAMPA, Camilo Ortega y CIDEA-UCA. Los valores más altos de prevalencia que se registraron en cuanto a *Epistylis sp.*, fue en el CIDEA-UCA, cuyos valores fueron 35.7% en el estanque A-6 y 43% en el estanque B-1. Camilo Ortega presentó valores 33% en el estanque 4, mientras que en CAMPA se obtuvieron valores de 11.4% en el estanque S-32 y 18.6% en el estanque T-49. La especie *Acineta sp.*, fue observada únicamente en Camilo Ortega y en el CIDEA-UCA en el estanque B-1 cuyos valores de prevalencia fueron 5.38% y 10% respectivamente, registrándose valores más altos en CIDEA-UCA.

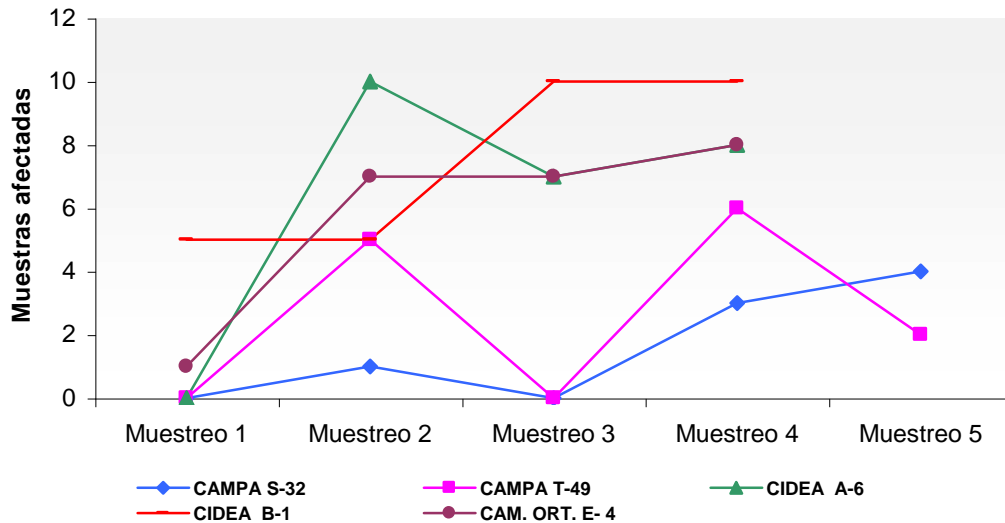


Gráfico 1. Comportamiento de *Epistylis sp.*, en las granjas muestreadas

El gráfico 1 muestra el comportamiento de *Epistylis sp.*, la especie predominante en cada estanque de las granjas objeto de estudio, de acuerdo a los muestreos realizados. La tendencia ascendente en los estanques del CIDEA-UCA puede ser a causa de su ubicación en la parte más baja del Estero Real donde la calidad del agua es menor respecto a CAMPA y Camilo Ortega. CAMPA está ubicada en la parte más alta del Estero Real, por lo que es de suponer que la calidad del agua es mejor, y la presencia de patógenos relacionados con la calidad de la misma es menor según lo demuestra este gráfico.

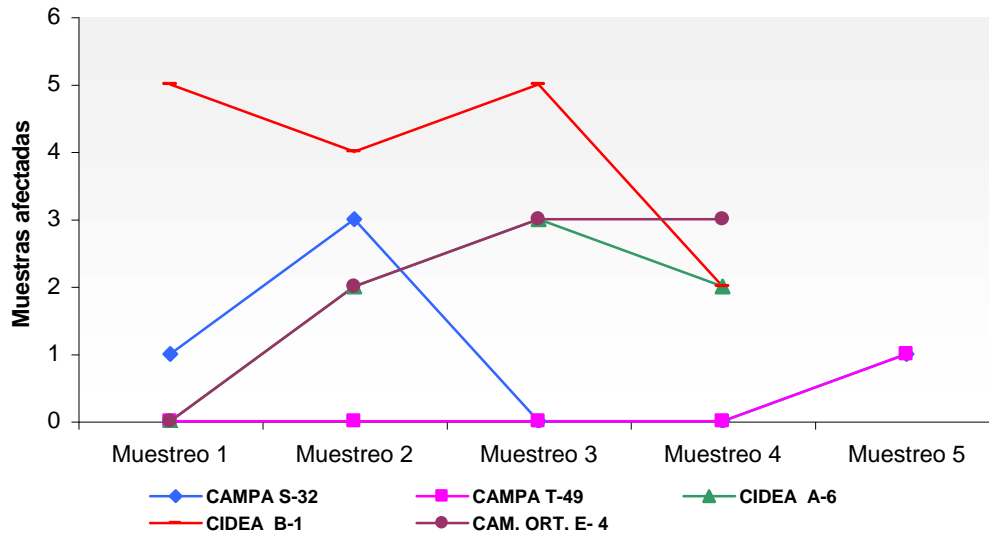


Gráfico 2. Comportamiento de *Zoothamnium sp.*, en las granjas muestreadas

La segunda especie encontrada en los 5 estanques la que también registró valores altos fue *Zoothamnium sp.* El gráfico 2 muestra que también los estanques del CIDEA-UCA mostraron los índices más altos de presencia de estos patógenos aunque los valores mostraron tendencia a disminuir hacia el final del cultivo. En este mismo gráfico se puede observar que los valores más bajos los obtuvo CAMPA, al igual que *Epistylis sp.*, la presencia de *Zoothamnium sp.*, está relacionada con la calidad del agua.

5.2.2 Gregarinas

Son parásitos celozoicos en las cavidades, principalmente de invertebrados tales como anélidos y artrópodos. Obtienen su alimento por ósmosis de la cavidad del órgano del hospedero.

Los parásitos intestinales que se observaron en la cavidad intestinal de las muestras examinadas, correspondieron al grupo de las gregarinas, aunque no se pudo determinar el tipo de especie presente, si se pudo determinar que los mayores índices corresponden a los estanques del CIDEA-UCA, de acuerdo con el gráfico 3. Lo esperado era que CAMPA mostrara los valores más bajos por su ubicación cercana a la boca del estero Real, sin embargo, en este caso fue en Camilo Ortega donde se observó menor presencia de estos parásitos. Las fases de desarrollo observadas corresponden a gametocistos y trofozoitos.

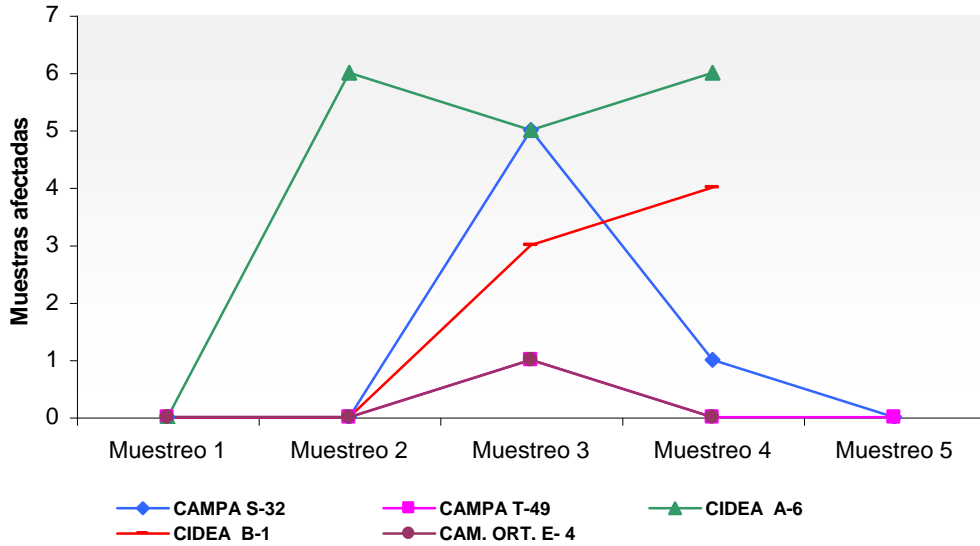


Gráfico 3. Comportamiento de los gametocistos de gregarinas en las granjas muestreadas

El gráfico número 4 muestra el comportamiento de las gregarinas en la fase de trofozoitos. Este gráfico muestra los altos valores alcanzados en los estanques del CIDEA-UCA y en CAMPA, así como su tendencia a disminuir hacia finales del cultivo.

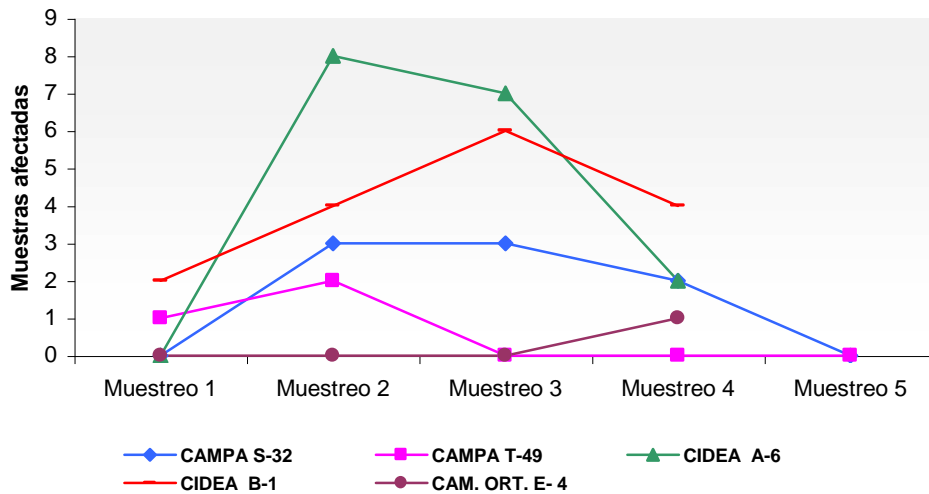


Gráfico 4. Comportamiento de los trofozoitos de gregarinas en las granjas muestreadas

5.3- Bacterias

5.2.3 *Vibrio sp.*

El término “síndrome de la septicemia bacteriana” da a entender que son varios los posibles agentes etiológicos causantes del mismo, si bien casi todas las bacterias aisladas corresponden a bastones Gram negativos, de especial importancia son las especies del género **Vibrio**, y en este sentido se han aislado varias cepas las cuales han sido identificadas como *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. parvulus* etc.

De acuerdo a los resultados microbiológicos obtenidos en las granjas muestreadas, se pudo observar que en CAMPA se presentó el caso de septicemia más severa en los estanques S-32 y T-49, las que fueron ocasionadas por las cepas de *Vibrio harveyii*, *V. alginolyticus*, y *V. anguillarum*. Se observó que las septicemias empezaron a aparecer a partir del día 60 de cultivo en esta granja. Este problema puede haber sido causado por los residuos de los alimentos aplicados a los organismos en cultivo; la parte del alimento que no fue consumido por los camarones al almacenarse en el fondo de los estanques pudo haber propiciado la proliferación de las bacterias, siendo mayor beneficiadas las del género *Vibrio*. Aunque también la presencia de los virus de mancha blanca (WSSV) y del síndrome de Taura (TSV), pueden haber provocado que las defensas de los camarones bajaran y que las bacterias oportunistas colonizaran los órganos de los camarones.

En la granja Camilo Ortega se pudo observar que la septicemia apareció en el día 90 de cultivo. Las especies que provocaron esta septicemia fueron *Vibrio harveyii*, y *V. hollisae*, mientras que en la granja del CIDEA-UCA, la septicemia empezó ya en el día 30 de cultivo en ambos estanques de esta granja las especies relacionadas con esta septicemia fueron *Vibrio harveyii* y *V. alginolyticus*.

A través de histopatología se observó la presencia de vibriosis presuntiva en todos los estanques muestreados, coincidiendo con los resultados obtenidos por medio de microbiología, aunque el mayor índice de individuos afectados se observó en Camilo Ortega cuya prevalencia registrada fue de 25.7%, y en segundo lugar CAMPA y posteriormente el CIDEA-UCA, tal como lo muestra el gráfico 5, también se observó disminución de estas bacterias hacia finales del cultivo en todos los estanques. De igual manera se supone que la presencia alta de bacterias se relaciona con la calidad del agua y con la presencia de otros patógenos, tales como los virus y los protozoos encontrados.

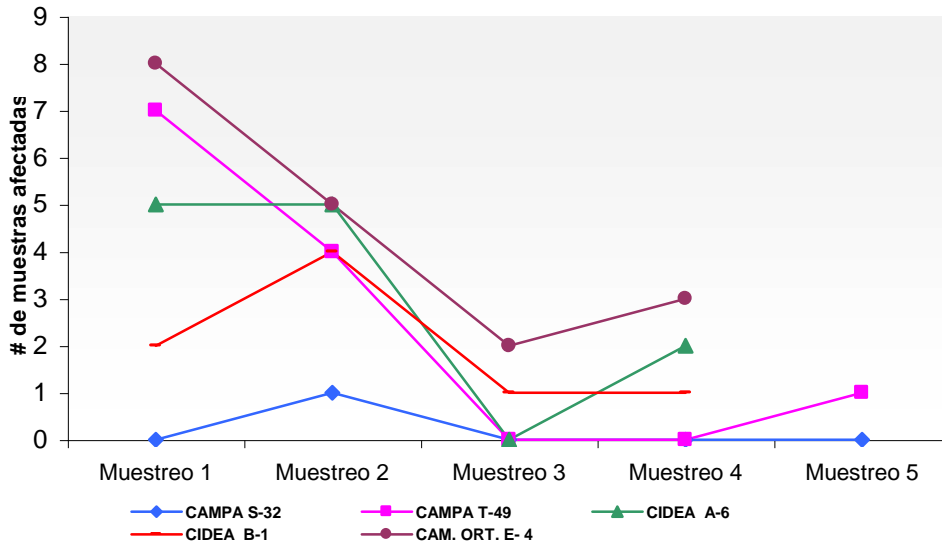


Gráfico 5. Comportamiento *Vibrio sp.* presuntivo en las granjas muestreadas

5.3.2 Bacterias filamentosas *Leucothrix mucor*

Por medio del análisis en fresco se obtuvieron resultados positivos solamente en CAMPA en el estanque S-32 a los 90 días de cultivo y con grado de severidad 1 y 2. Resultados similares se obtuvieron en el estanque 4 de Camilo Ortega, donde se reportaron resultados positivos solo a los 90 días de cultivo. Los estanques del CIDEA-UCA mostraron resultados negativos durante todo el cultivo.

Los métodos histopatológicos coinciden con la determinación de la presencia de estas bacterias en el estanque S-32 pero con índices bajos (4.3%), aunque también fueron observadas en el estanque T-49 con el mismo índice de prevalencia. Camilo Ortega también fue positivo, pero la prevalencia fue más baja que en CAMPA ((2.9%). En el CIDEA-UCA los resultados obtenidos fueron negativos al igual que con el método de análisis en fresco durante todo el cultivo, según lo muestra el gráfico 6.

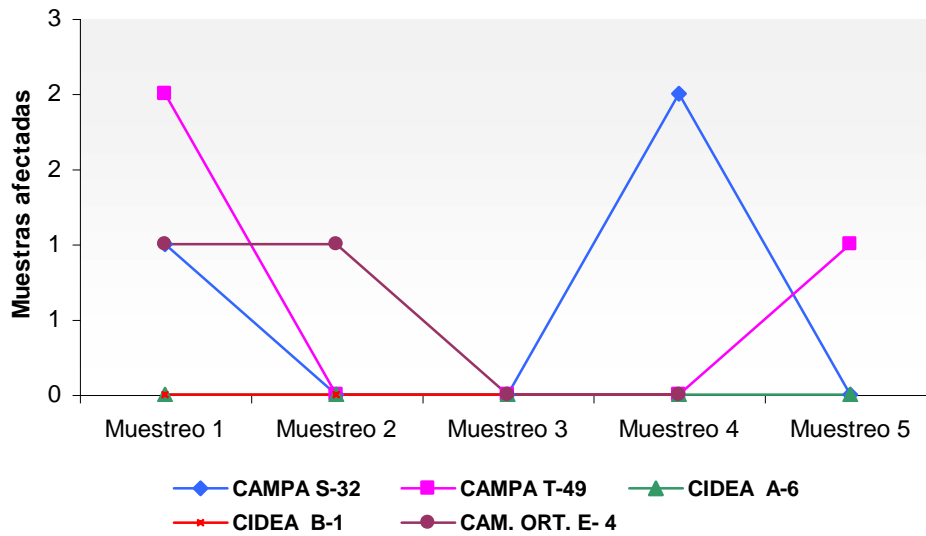


Gráfico 6. Comportamiento de las bacterias filamentosas *Leucothrix mucor* en las granjas muestreadas

5.3.3 Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP)

Este tipo de bacterias no se logró detectar con los métodos moleculares PCR en los 5 estanques. En cambio si se logró determinar con los métodos histológicos en el estanque S-32 de CAMPA (4.3 %), estanque 4 de Camilo Ortega con igual índice que en CAMPA, pero en niveles altos en los estanques del CIDEA-UCA, 21.4% en el estanque A-6 y 20 % en el estanque B-1, según se muestra en el gráfico número 7.

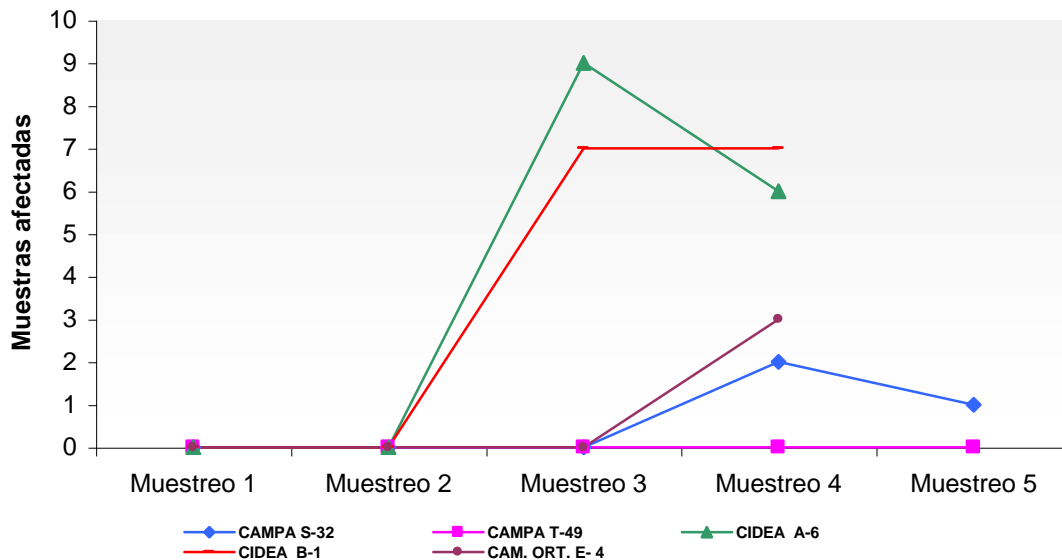


Gráfico 7. Comportamiento de las bacterias NHP en las granjas muestreadas

VI. CONCLUSIONES

- Se logró detectar la presencia y prevalencia de los virus de WSSV y TSV en las tres granjas muestreadas. El virus YHV no se detectó en ninguna de las granjas estudiadas, lo que demuestra que los virus circulantes en esta región son WSSV y TSV mientras se realizó este estudio.
- No se encontró presencia de los virus IHHNV ni BP con las técnicas histopatológicas.
- Las especies presentes de protozoarios epicomensales y de parásitos intestinales corresponden a las especies *Epistylis sp.*, *Zoothamnium sp.*, *Acineta sp.* y Gregarina sp., en estadíos de vida de gametocistos y trofozoitos. Todas estas especies están relacionadas con la calidad del agua de los estanques.
- Se logró detectar la presencia y prevalencia de *Vibrio sp.* en estas zonas, siendo las especies de *V. harveyii* y *V. alginolyticus* las más encontradas en estas granjas. La presencia de *Leucothrix mucor* se dio solamente en los últimos días de cultivo. La bacteria causante de la Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP) no se logró detectar por medio de PCR en estas granjas, pero sí a través de histopatología.
- La muestra de 10 camarones no es significativa cuando la tasa de infección es baja. En estas circunstancias se debe aumentar el tamaño de la muestra a 30 camarones como mínimo.

VII. LITERATURA CONSULTADA

BELL T. A. y LIGHTNER D. V. (1988) *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. University of Arizona. Environmental Research Laboratory. Tucson, Arizona. USA.

CONROY D. A. y CONROY G. (1990). *Manual de Patología de Camarones Peneidos*. Segunda edición. Maracay, Venezuela.

FLORES C. E. 2000. *Distribución del Virus de la Mancha Blanca en las Costas y Esteros de la República de Panamá*. Tesis de Maestría. Universidad Santa María La Antigua (USMA). Panamá. 130 pp.

LIGHTNER D. V (1996). *A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA.

MORALES C. M. S. y CHÁVEZ S. M. C. (1999). *Manual Para la Detección de Enfermedades de Camarones Peneidos Utilizando Análisis en Fresco*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Hermosillo, Sonora. México. 50 pp.

ANEXOS

Mapa 1. Ubicación en el Estero Real de las granjas muestreadas






CLAVE	
CAMPA	
Camilo Ortega S.	
CIDEA-UCA	

Tabla 25. Guía general para dar un valor numérico cualitativo de grado de severidad a la infección, infestación, enfermedad y síndrome (Tomada de Morales *et al*, 1999)

GRADO DE SEVERIDAD	SIGNOS CLÍNICOS
0	No presentan signos de infección por patógenos, parásitos o epicomensales. No presentan lesiones características de síndromes
1	Presencia muy baja de patógenos, parásitos o epicomensales. En aquellos donde se tiene un número estándar permitido, este se encuentra justamente arriba del límite normal. Se observa muy pocas lesiones características del síndrome.
2	Se observa la presencia baja y moderada de patógenos, parásitos o epicomensales. Se observan muchas lesiones características del síndrome. Incremento en la mortalidad si no se aplica tratamiento (cuando existe tratamiento)
3	Se observa la presencia moderada de patógenos, parásitos o epicomensales. Se observan muchas lesiones características del síndrome. Potencialmente letal si no se aplica tratamiento (cuando existe tratamiento)
4	Se observa gran cantidad de patógenos, parásitos o epicomensales. Se observan severas lesiones características del síndrome. Muy letal con altas mortalidades.

Tabla 26. Selección del tamaño muestral y cálculo del porcentaje de prevalencia en una población determinada de camarones (Tomada de Morales *et al*, 1999, Lightner, 1996 y modificada de Amos, 1985).

Tamaño de la población	Tamaño muestral requerido para una prevalencia estimada de:						
	2%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
50	50	35	20	10	7	5	2
100	75	45	23	11	9	7	6
250	110	50	25	10	9	8	7
500	130	55	26	10	9	8	7
1,000	140	55	27	10	9	9	8
1,500	140	55	27	10	9	9	8
2,000	145	60	27	10	9	9	8
4,000	145	60	27	10	9	9	8
10,000	145	60	27	10	9	9	8
>= 100,000	150	60	30	10	9	9	8