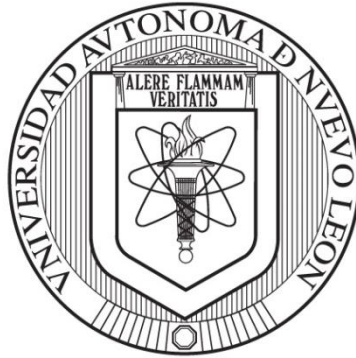


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LAS MORTALIDADES ATÍPICAS EN CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EN SONORA, CICLOS 2013 - 2014 Y EVALUACIÓN DE NUTRACÉUTICOS A BASE DE EXTRACTOS FITOGÉNICOS EN ALIMENTOS PARA REFORZAR LA INMUNIDAD DEL CAMARÓN

POR

M. C. ARIEL ROBLES VALDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS PARA ORGANISMOS ACUÁTICOS

MAYO, 2018

**CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LAS MORTALIDADES
ATÍPICAS EN CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EN
SONORA, CICLOS 2013 - 2014 Y EVALUACIÓN DE NUTRACÉUTICOS A
BASE DE EXTRACTOS FITOGÉNICOS EN ALIMENTOS PARA REFORZAR
LA INMUNIDAD DEL CAMARÓN**

Dr. Lucio Galaviz Silva
Director

Dra. Lucia Elizabeth Cruz Suarez
Secretario

Dr. Denis Ricque Marie
Vocal

Dra. Zinnia Judith Molina Garza
Vocal

Dr. David Alonso Villarreal Cavazos
Vocal

Dr. José Cuauhtémoc Ibarra Gámez
Director externo

**CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LAS MORTALIDADES
ATÍPICAS EN CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EN
SONORA, CICLOS 2013 - 2014 Y EVALUACIÓN DE NUTRACÉUTICOS A
BASE DE EXTRACTOS FITOGÉNICOS EN ALIMENTOS PARA REFORZAR
LA INMUNIDAD DEL CAMARÓN**

Dr. Lucio Galaviz Silva
Director

Dr. José Cuauhtémoc Ibarra Gámez
Director externo

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
DEDICATORIA	x
AGRADECIMIENTOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Cultivo de camarón	3
2.1.1 En el mundo	3
2.1.2 En México	3
2.1.3 En Sonora	4
2.2 Nombre común de la enfermedad	5
2.3 Epizootiología y distribución geográfica	5
2.4 Especies afectadas	6
2.5 Agente etiológico	6
2.6 Órgano blanco	6
2.7 Signos clínicos	6
2.8 Mortalidad	7
2.9 Prevención y tratamientos	7
2.10 Métodos de diagnóstico	8
2.11 Inmunoestimulantes	8
2.12 Nutracéuticos.....	9

2.12.1 Nutracéuticos a base de fucoidan.....	10
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	12
4. JUSTIFICACIÓN.....	13
5. HIPÓTESIS.....	14
6. OBJETIVO.....	15
6.1 Objetivo general.....	15
6.2 Objetivos particulares.....	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
7.1 Sitios de muestreos.....	16
7.1.1 Muestreo de agua.....	17
7.1.2 Muestreo de camarón silvestre y de cultivo.....	17
7.2 Análisis bacteriológico.....	18
7.2.1 Análisis bacteriológico de agua.....	18
7.2.2 Análisis bacteriológico de camarón.....	18
7.3 Aislamiento y purificación de cepas bacteriológicas.....	19
7.4 Preservación de las cepas bacterianas.....	19
7.5 Identificación de las cepas aisladas por MicroScan®.....	19
7.6 Caracterización molecular.....	20
7.6.1 Extracción de DNA.....	20
7.6.2. Identificación por PCR.....	20
7.6.3 Estudios genómicos 16S rADN.....	21
7.6.4 Variabilidad bacteriana por PCR – (GTG) ₅	21
7.7 Sensibilidad antimicrobiana.....	22
7.8 Bioensayos con nutracéuticos.....	23
7.8.1 Diseño experimental.....	23

7.8.2 Dietas experimentales	23
7.8.3 Elaboración de las dietas	24
7.8.4 Parámetros de respuesta inmune en hemolinfa	25
7.9 Análisis estadístico.....	27
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
8.1 Análisis bacteriano	28
8.2 Caracterización de cepas	29
8.2.1 Identificación por PCR.....	29
8.2.2 Identificación por pruebas bioquímicas MicroScan®.....	31
8.2.3 Secuenciación 16S rDNA	31
8.2.4 Variabilidad de cepas por PCR – (GTG) ₅	33
8.3 Sensibilidad antimicrobiana	35
8.4 Bioensayo con nutracéuticos.....	38
8.4.1 Parámetros fisicoquímicos	38
8.4.2 Conteo diferencial y total de hemocitos.....	38
8.4.3 Fenoloxidasa Libre y Fenoloxidasa Total	41
9. CONCLUSIÓN.....	45
10. PERSPECTIVAS	46
11. BIBLIOGRAFÍA.....	47
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estados con mayor producción de camarón en peso vivo en México (SAGARPA-CONAPESCA, 2013).	4
Figura 2. Juntas locales de los muestreos de agua y camarón. Ciclo de producción 2013 de Cruz de Piedra, Mélagos y Atanasia.	16
Figura 3. Esteros del sur de Sonora, Mélagos (Izquierda), Atanasia (centro) y El Riito (derecha).	17
Figura 4. Material para identificación bioquímica por MicroScan®.	20
Figura 5. Antibióticos en sensidiscos para antibiogramas AVIMEX® (Izquierda), grados de sensibilidad al antibiótico..	22
Figura 6. Cepas AHPND+ con primer AP3, cepas positivas en color verde, amplicones de 336 pb.	31
Figura 7. Relación evolutiva de las taxas: La historia evolutiva fue inferida con el método NJ (Neighbor-Joining).	32
Figura 8. Perfil de amplicones para las cepas de Vph AHPND+, la lectura del gel fue con el software GelAnalyzer 2010.	34
Figura 9. Distribución de las cepas positivas a AHPND en el estado de Sonora.	34
Figura 10. Distintos halos de inhibición, cepa B25. Antibióticos (EBD-MGX-OXD-TX).	35
Figura 11. Halos de inhibición de los antibióticos contra las cepas AHPND+..	37
Figura 12. Conteo de hemocitos hialinos (H)..	38
Figura 13. Conteo de hemocitos semigranulosos (SG) de las dietas evaluadas por muestreo.	39

Figura 14. Conteo de hemocitos granulados (G)	40
Figura 15. Conteo total de hemocitos por tratamiento.....	40
Figura 16. Fenoloxidasa libre.....	41
Figura 17. Conteo total de hemocitos por tratamiento.....	42
Figura 18. Estallido respiratorio (ER).....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medidas que incrementan o disminuyen el riesgo a EMS/AHPND.	7
Tabla 2. Nutraceuticos utilizados contra patógenos comunes del cultivo de camarón.	9
Tabla 3. Nutraceuticos utilizados con fucoidan para camarones de cultivo.	11
Tabla 4. Dietas experimentales, control y dietas con harina y fucoidan de E. arborea...	23
Tabla 5. Aislados bacterianos en agua, sedimento y camarón antes del ciclo de cultivo 2014 en tres juntas locales de sanidad acuícola en el sur de Sonora.....	28
Tabla 6. Aislados bacterianos en agua, sedimento y camarón durante el ciclo de cultivo 2014 en 11 juntas locales de sanidad acuícola en el estado de Sonora.	28
Tabla 7. Cepas positivas para Vph y AHPND, localidad y tipo de muestra.....	29
Tabla 8. Cepas registradas en el GenBank con el número de acceso.....	33
Tabla 9. Antibiogramas de las cepas AHPND+ de Sonora.....	36

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres, **Joel Robles Valenzuela** y **Mirna Valdez Luque** los cuales me han brindado de educación, ejemplos de vida, y me han motivado a seguir adelante, palabras me faltan para agradecer todo lo que han hecho conmigo.

A mis hermanos, **Israel, Daniel** y **Arely** que son gran parte de mi vida y que siempre somos muy unidos, los quiero mucho.

A toda mi familia de las dos partes **Robles–Amavizca** y **Valdez-Luque** (gorgojos), no creo que haya más como nosotros pura unidad, cariño, diversión, respeto, etc., nos representa.

Y a mis dos canhijos **Sandy & Blacky** que siempre me ladran para darme ánimos, me quitan el estrés y juegan conmigo!!

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** primeramente, porque ha sido Él, quien me otorgado salud, inteligencia y bendiciones durante mi vida, nunca dejes de cuidarme y mantente siempre conmigo.

Al **Dr. José Cuauhtémoc Ibarra Gámez**, por toda la ayuda, el apoyo, la confianza, la amistad que me has brindado. También gracias por todo el trabajo, las desveladas, las anécdotas, consejos, me han hecho ser mejor como persona y profesionista. Infinitamente agradecido!!

Al **Dr. Lucio Galaviz Silva**, por todos los consejos, ayudas, experiencias, paciencia, apoyo y todo lo que me ha transmitido de conocimientos hasta lograr este trabajo.

A la **Dra. Lucia Elizabeth Cruz Suarez, Dr. Denis Ricque Marie, Dra. Zinnia Judith Molina Garza, Dr. David Alonso Villarreal Cavazos**, por su valiosa participación en la revisión y participación de este trabajo.

Un agradecimiento especial para la **Dra. Martha G. Nieto López y Dra. Mireya Tapia Salazar** que me ayudaron y fueron parte del bioensayo inmunológico que aquí se presenta, muchas gracias.

A mis compañeros y amigos del laboratorio LASA de ITSON y laboratorios LPM y E y maricultura de UANL todos ustedes han tenido algo que ver en la realización de este trabajo de ustedes he aprendido mucho, también hacen que el trabajo se vuelva diversión, con los agradables cafecitos, y por todos los momentos de risa ocasionados por cada uno de uds.

A **CONACYT** por la beca otorgada y por el proyecto 3157: Problemas Nacionales, “Evaluación de la actividad antagónica de bacterias aisladas de ecosistemas marinos contra *Vibrio parahaemolyticus*, agente causal de la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) en cultivos de camarón”

A **COSAES** por el apoyo en los muestreos y a todas aquellas personas que estuvieron involucradas en la realización de este trabajo y/o en mi desarrollo como profesionista y persona, **MUCHAS GRACIAS!!**

RESUMEN

Las enfermedades en el cultivo de camarón, generan pérdidas debido a las mortalidades causadas por diversos patógenos ya sea bacteriano o de tipo viral. En el noroeste del México las perdidas hasta el 2012 fueron ocasionadas mayormente por el virus del síndrome de mancha blanca (WSSV=White spot syndrome virus). A partir del 2013 se han presentado nuevas epizootias asociadas al síndrome de la mortalidad temprana (EMS=Early mortality syndrome) o enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND=Acute hepatopancreatic necrosis disease) causada por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* infectadas por fagos. Esta nueva cepa surgió en Asia desde el 2009 y ha ocasionado pérdidas de más de 1 billón de dólares. Los objetivos del presente estudio fueron (1) caracterizar los aislados bacterianos colectados de distintas granjas de cultivo de camarón del estado de Sonora en 2013 y 2014 para identificar si el agente causal fue el del EMS/AHPND;(2) comparar la región ribosomal 16S rDNA para determinar el tipo de cepas involucradas donde se presentaron mortalidades atípicas por lo que se realizaron métodos moleculares y desafíos en camarones de granja;(3) también se evaluó un nutraceutico para estimular las defensas del camarón. Se muestrearon 11 Juntas Locales de Sanidad Acuicola (JLSA) de Sonora y se realizaron análisis bacteriológicos de camarón, agua y sedimento. Se aislaron las colonias color verde que crecieron en el medio de cultivo TCBS y las colonias color malva que crecieron en CHROMagar® *Vibrio*; se les extrajo el DNA y se realizaron PCR para identificar AHPND. Fueron positivas 18 cepas para AHPND. Los productos de PCR del gen 16S rDNA fueron secuenciados y comparados con los genomas que están en el Gen Bank. Con los resultados de secuenciación y de pruebas bioquímicas se identificó y se confirmó que las mortalidades masivas en Sonora en los ciclos 2013 – 2014 fueron causado por *Vibrio parahaemolyticus* AHPND+. Se evaluaron los nutraceuticos a base de fucoïdan de alga café *Ecklonia arborea* con características inmunoestimulantes y prebióticas, se agregó en el alimento harina del alga al 2% y fucoïdan (2 g/Kg) extracto del alga. El fucoïdan promovió el aumento de los hemocitos hialinos y granulosos a los días 6 y 15 de alimentación. Al día 15 de alimentación presenta mayor conteo total de hemocitos para las dietas que contienen *Ecklonia arborea* (harina y fucoïdan), y se incrementa la fenoloxidasa total y estallido respiratorio.

ABSTRACT

Diseases in cultured shrimp are cause of economic detriment due to mortalities, caused by various pathogens either bacterial or viral type. White spot syndrome virus (WSSV) caused losses until 2012 at northwest of Mexico. Since 2013, new outbreaks associated with the syndrome of early mortality (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) occasioned by strains of *Vibrio parahaemolyticus* associated with phages has been reported. This new strain emerged in Asia since 2009 and has generated damages higher than 1 billion dollars. The objective of this study were (1) to characterize the bacterial isolates collected from different shrimp farms in the state of Sonora in 2013 and 2014 to identify the causal agent of EMS/AHPND; (2) to compare the 16S rDNA ribosomal region to determine the type of strains were involved, so molecular methods and challenges in farmed shrimp were performed; (3) also, a nutraceutical was also evaluated to stimulate shrimp defenses. Eleven "Local Meetings of Aquaculture Health" of Sonora were sampled and bacteriological analyses of shrimp, water and sediments were performed. The green colonies that grew in the TCBS culture medium were isolated, and also bacterial colonies with mallow color that grew in CHROMagar® Vibrio; from those colonies DNA were extracted and PCR were performed to identify AHPND. PCR products of gen 16SrDNA were sequenced and compared with those genomes reported at GenBank. Sequencing and biochemical results allow us to identify and to confirm that massive mortalities in Sonora between 2013 - 2014 culture cycles were caused by *Vibrio parahaemolyticus* AHPND+. The nutraceuticals based on fucoidan of brown alga *Ecklonia arborea* with immunostimulants and prebiotic characteristics were evaluated, was added to pelleted food at 2% of seaweed meal and fucoidan (2 g/Kg)- seaweed extract. Fucoidan induced an increase of hyaline and granulose haemocytes at 6 and 15 days of feeding. At 15 days of feeding, shrimps showed a higher total count of haemocytes for diets contained *E. arborea* (meal and fucoidan), and an increment of total fenoloxidase and respiratory burst.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es una industria productiva a nivel mundial y su crecimiento ha sido exponencial en la última década, genera grandes ganancias económicas y mayor empleo en las localidades del cultivo. El mayor problema al que se enfrenta la producción de camarón de cultivo son las enfermedades infecciosas. Estas afectan la salud del organismo, disminuyen la producción por mortalidades y también la calidad del producto, impactando directamente en la economía del productor y de igual manera afecta al mercado local, nacional o internacional. Dentro de los patógenos que mayor impacto han generado a la industria camaronícola se encuentran los virus del síndrome de mancha blanca (WSSV), de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), del síndrome de Taura (TSV), de la cabeza amarilla (YHV) entre otros (Lightner y Redman, 1998; Flegel *et al.*, 2008; Lightner, 2011).

Los patógenos bacterianos que también causan problemas en los cultivos de camarón son los del género *Vibrio* los cuales se encuentran normalmente en los ambientes donde esta actividad se realiza. Las enfermedades causadas por *Vibrio* eran asociadas al estrés causado por factores ambientales o climáticos entre otros (Song *et al.*, 1993; Chou *et al.*, 1995; Hung-Hung *et al.*, 1999). Las mortalidades causadas por vibriosis generalmente no son tan elevadas como las producidas por un agente viral, pero es una enfermedad recurrente en los ciclos de cultivo que disminuye la producción por las altas mortalidades (Soto-Rodríguez *et al.*, 2010). Sin embargo, en Asia, desde el 2009 se presentó una enfermedad emergente llamada síndrome de la muerte temprana (EMS) o llamada más técnicamente enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) (Flegel, 2012; Tran *et al.*, 2013a), el agente causal de esta enfermedad es *V. parahaemolyticus* (Global Aquaculture Alliance, 2013; FAO, 2013a; Tran *et al.*, 2013a); produce altas mortalidades en los primeros días del cultivo. La enfermedad EMS/AHPND se propagó en el 2010 en granjas ubicadas en el sur de China y la isla de Hainan y para principios de 2011 se había detectado en Vietnam y Malasia (Lightner *et al.*, 2012), lo que ocasionó pérdidas billonarias en producción.

En el 2013 se presentaron grandes mortalidades en el cultivo de camarón en el noroeste de México. Nayarit, Sinaloa y Sonora, las cuales generaron grandes pérdidas de producción en el inicio del cultivo, debido a una fuerte vibriosis, epizootiología similar a la presentada en Asia (Tran *et al.*, 2013a). Por consiguiente, el comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora A. C. (COSAES) reportó pérdidas millonarias durante el primer ciclo de cultivo, pues afectó más de 7500 empleos directos por lo que se recomendó que las granjas afectadas, no cultivaran en el siguiente ciclo 2014.

Debido a la importancia que tiene este patógeno, en este proyecto se identifica y se caracterizan los aislados bacterianos, de la(s) cepa(s) de *Vibrio parahaemolyticus* causantes del EMS/AHPND, colectadas durante los ciclos de cultivo 2013 y 2014, teniéndose como antecedente las investigaciones reportadas por Lightner en 2013 y por el grupo de investigadores del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Mazatlán en el 2014 (Lightner *et al.*, 2013; Gómez-Gil *et al.*, 2014). Además de determinar el agente causal de estas mortalidades en el noroeste de México, también se evaluó un nutraceutico a base de fucoïdan extraído de algas café (*Ecklonia arborea*), el cual es un producto que ayuda como inmunoestimulante y previene la enfermedad y minimiza el impacto que tiene EMS/AHPND en el cultivo de camarón. Por lo que la información obtenida en este estudio ampliará el conocimiento sobre esta enfermedad emergente (EMS/AHPND) y proporcionará una posible alternativa para disminuir su impacto en la industria camaronícola.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de camarón

La camaronicultura es una industria que ha ido en crecimiento, con el paso del tiempo se destinan más tierras para el cultivo de camarón y más recursos para infraestructura, personal capacitado, alimento, etc. Para tener un buen cultivo de camarón se han manejado distintos tipos de legislación según el país o región productiva, con el objetivo común de tener camarones sanos e inocuos para su consumo (Martínez *et al.*, 2009).

2.1.1 En el mundo

El cultivo del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) a nivel mundial, es la quinta especie que presenta un mayor crecimiento en la acuicultura con una producción de 2 millones 877 mil 542 t de camarones en todo el mundo con un valor comercial de 12, 168,812,000 dólares, aun cuando esta especie no es la única con alto valor comercial, la especie de camarón tigre *Penaeus monodon* se encuentra en el décimo sexto lugar en producción de mundial en la acuicultura de peces, crustáceos, moluscos, etc., con 662 mil 453 toneladas de camarón y un valor comercial de 3,468,674,000 dólares (FAO, 2011).

2.1.2 En México

El camarón por su volumen se encuentra posicionado en el lugar cuarto de la explotación pesquera en México; por su valor, lo encontramos en el primer lugar. El cultivo de camarón es una actividad que ha ido incrementándose, se ha tenido una mayor producción por cultivo que por captura de camarón en alta mar, en el 2012 se reportó para el país una producción de 161 mil 852.36 toneladas de camarón, de las cuales 100mil 320.66 toneladas que representan el 62 % se produjeron a través de la acuicultura, correspondiendo el resto a captura tanto en alta mar como en ribera (SAGARPA-CONAPESCA, 2012).

México cuenta varias especies de camarón, pero la especie que se cultiva y tiene mayor demanda en el país y en el extranjero es la especie *Litopenaeus vannamei* o camarón blanco del Pacífico, esta es la que predomina en las granjas nacionales, sin embargo, en

la pesca en mar abierto la especie predominante es *Litopenaeus stylirostris* o camarón azul del Pacífico (García-Juárez *et al.*, 2009). Los estados con mayor producción de camarón de cultivo se encuentran en el noroeste de México conformado con los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit (Figura 1).

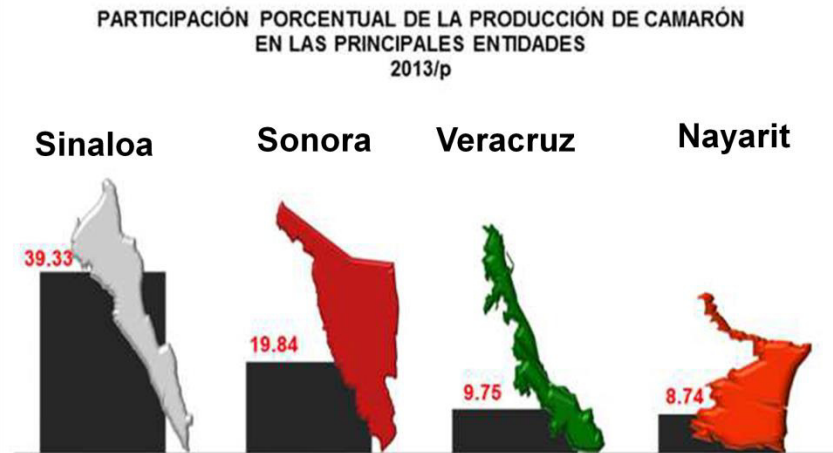


Figura 1. Estados con mayor producción de camarón en peso vivo en México (SAGARPA-CONAPESCA, 2013).

2.1.3 En Sonora

La acuicultura del estado de Sonora en el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, fue una industria que creció en superficie, y en producción fue una de las mayores a nivel nacional (SAGARPA-CONAPESCA, 2010). La producción del estado en el 2012 fue 36,162t de camarón de peso vivo con un valor de \$ 1,747,378,635.00 pesos (SAGARPA-CONAPESCA, 2012).

Sonora tiene una superficie instalada para cultivar de 25,585.55 hectáreas (Ha) y la superficie sembrada para el año 2012 fue de 24,780.46 Ha en dos ciclos, con una producción de 35,305.54 t y un rendimiento de 1.5 (Kg/Ha) (COAES, 2012). Sonora fue el mejor productor de camarón en las granjas, pero en 2011 pasó al segundo lugar ya que las producciones bajaron hasta un 50% por WSSV (COAES, 2011).

2.2 Nombre común de la enfermedad

La enfermedad primeramente fue llamada enfermedad de la mortalidad temprana (EMS) ya que las mortalidades se presentaban en los primeros días de cultivo, pero de igual manera se le llama mortalidad temprana a aquellas que ocurren durante los primeros días de cultivo, son causadas por vibriosis o patógenos virales (WSSV, YHV) lo cual causaba confusión y dificultaba su diagnóstico; aunque las lesiones causadas por EMS diferían a las causadas por virus, ya que causa una necrosis muy marcada, de ahí su nuevo nombre a síndrome de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPNS). Se le llamó síndrome al desconocerse el agente etiológico al momento de nombrar la enfermedad. Investigadores de la Universidad de Arizona encontraron el agente causal a la enfermedad de EMS/AHPNS y se propuso cambiar nuevamente al de enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) (NACA, 2012).

2.3 Epizootiología y distribución geográfica

Las primeras mortalidades asociadas con EMS/AHPND fueron en el continente asiático, zona con la mayor producción de camarón de cultivo en el mundo, EMS/AHPND afectó los cultivos de China durante el año 2009 (Lightner *et al.*, 2012). En el año 2012, la enfermedad se propagó por más países asiáticos llegando a las granjas localizadas en el este del Golfo de Tailandia (Flegel, 2012). En el 2013, los mismos países asiáticos continuaron con las epizootias, pero ya se contaba con algunas medidas de bioseguridad y experiencia con el manejo de la enfermedad. En México, se presentaron mortalidades masivas provocadas por vibriosis, las cuales se propagaron desde el estado de Nayarit, al estado vecino de Sinaloa hasta llegar al estado de Sonora al norte. Aunque se sigue sin especificar oficialmente el agente causal de la enfermedad la similaridad de signos apunta a EMS/AHPND (Lightner *et al.*, 2013). El grupo de trabajo del CIAD, detectaron por métodos de diagnósticos por histopatología y PCR la presencia de la EMS/AHPND de granjas afectadas de los estados de Sinaloa y Nayarit, lo cual causaron las altas mortalidades del ciclo productivo 2013 en ambos estados (Pérez-Muñoz, 2013; SENASICA, 2013; Gómez-Gil, 2014).

2.4 Especies afectadas

AHPND afecta principalmente a las especies de camarón *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus monodon*, especies de mayor explotación en cultivo de camarón, con un 75% y 15 % de producción global respectivamente, también se reporta que afecta a *Penaeus chinensis* entre otras especies (NACA, 2012; Nikolik, 2013).

2.5 Agente etiológico

El agente causal de EMS/AHPND es una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* descrita por Tran *et al.* (2013a), la cual fue aislada de camarones moribundos, la identificación fue por pruebas bioquímicas con ayuda de los estuches de API Rapid NE y se confirmó con la secuenciación de 16S y con los postulados de Koch dando como resultado el agente etiológico a EMS/AHPND. La cepa de *V. parahaemolyticus* de EMS/AHPND no es patógeno al humano, carece de los genes *trh* y *tdh* que le confieren la toxicidad y que causan gastroenteritis en el hombre al comer mariscos sin cocinar (Tran *et al.*, 2013b). Se encuentra disponible en línea, la secuencia del genoma completo de una cepa aislada de camarones moribundos de la mortalidad del ciclo de cultivo 2013 en el estado de Sinaloa, la cual causan daños similares por EMS/AHPND (Gómez-Gil *et al.*, 2014).

2.6 Órgano blanco

La patología de EMS/AHPND se limita solamente al hepatopáncreas (HP) como órgano donde causa una patología muy degenerativa en la cual ocurre disfunción en las células epiteliales, se reducen las vesículas de lípidos en el HP provocando que se degeneren, lo cual provoca que se desprendan de la membrana basal de los túbulos del HP. Se presenta una elevada infiltración hemocítica y se encapsulan los túbulos afectados, seguida de una melanización o necrosis en la etapa terminal junto con una colonización bacteriana secundaria (Lightner *et al.*, 2012; Hoang-Oanh *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2013b).

2.7 Signos clínicos

Los signos clínicos en los camarones son: la palidez (color blanquecino o amarillento) y reducción de tamaño del HP, el cuerpo del camarón presenta flacidez y pigmentación elevada por los cromatóforos expandidos, el HP no es fácil de aplastar entre los dedos, presenta turgencia al tacto. Los camarones con EMS/AHPND presentan cambios de

comportamiento, dejan de alimentarse lo cual produce una reducción de peso. En el análisis microscópico del HP se observa con los túbulos hepatopancreáticos atrofiados y con presencia de melanización y el intestino con mínima cantidad de alimento (Lightner *et al.*, 2012; Hoang-Oanh *et al.*, 2013).

2.8 Mortalidad

Las mortalidades por EMS/AHPND son masivas durante los primeros 10 a 45 días de cultivo cuando los camarones se encuentran en los estanques de engorda, en algunos casos las mortalidades pueden llegar a ser de hasta el 100% (Lightner *et al.*, 2012; NACA, 2012; Hoang-Oanh *et al.*, 2013).

2.9 Prevención y tratamientos

Los métodos de prevención o recomendaciones para EMS/AHPND que se sugieren después de la aparición de la enfermedad en Asia son adquirir postlarva de calidad y buenas prácticas de manejo en los cultivos de camarón. Algunas medidas de prevención se muestran en la Tabla 1 (Limsuwan y Briggs, 2012; Corsin y Briggs, 2012; FAO, 2013b; Limsuwan *et al.*, 2014).

Tabla 1. Medidas que incrementan o disminuyen el riesgo a EMS/AHPND.

	Factores que incrementan el riesgo de EMS/AHPND	Factores que disminuyen el riesgo a EMS/AHPND
Locación de las granjas	<ul style="list-style-type: none"> • Granjas instaladas en la costa. • Localización de granjas vecinas que comparten el mismo suministro de agua. 	Granjas alejadas de la costa
Especie cultivada	<i>P. monodon</i>	<i>L. vannamei</i>
Preparación de los estanques	<ul style="list-style-type: none"> • Granjas sin reservorio de agua. • Mal mantenimiento de estanquería. • Inadecuada aireación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilización de liner en los estanques. • Buen mantenimiento de estanquería. • Buena aireación. • Medidas de bioseguridad.
Recurso de la postlarva	<ul style="list-style-type: none"> • Estrés de PL durante el transporte. • PL de lugares donde se presentó EMS/AHPND. 	<ul style="list-style-type: none"> • Origen de PL de lugares reconocidos. • Utilización de PL libres de patógenos.
Calidad de agua	<ul style="list-style-type: none"> • Fluctuaciones de temperaturas. 	Baja salinidad (<20 gr/l)

	<ul style="list-style-type: none"> • Alta salinidad 	
Temporada de siembra y cosecha	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor área de siembra o mayor número de estanques sembrados. • Mayor densidad de siembra. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sembrar <i>P. monodon</i> a finales de año. • Sembrar una larva con mayor edad.
Alimentación, suplementación y medicación.	<ul style="list-style-type: none"> • Sobrealimentación. • Utilización de antibióticos en alimento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Buena calidad de alimento. • Utilización de probióticos aprobados. • Buen control de alimentación. • Utilización de inmunoestimulantes de calidad.

2.10 Métodos de diagnóstico

La enfermedad primeramente fue detectada por el método de histopatología, al observar los daños en los tejidos y órganos internos de tracto digestivo del camarón como lo describen Lightner *et al.* (2012) y Tran *et al.* (2013a). En el 2013 se desarrollaron dos kits de diagnóstico molecular por PCR, el primero fue desarrollado por Lightner *et al.* (2013) la cual es un kit de diagnóstico comercial, posteriormente Sirikharin *et al.* (2014) desarrollaron un kit de PCR el cual se encuentran disponible en internet.

2.11 Inmunoestimulantes

El sistema inmune del camarón como otros invertebrados, es incapaz de producir anticuerpos para combatir diversos patógenos que se le presentan en todo su ciclo de vida, ya que no presenta memoria inmunológica de largo plazo (Vargas, 2009). El camarón tiene un sistema sanguíneo abierto, en el cual se encuentran nutrientes, hormonas, células inmunológicas como los hemocitos que son transportados por la hemolinfa a todo el organismo (Bachére *et al.*, 2004). Los hemocitos tienen proteínas capaces de detectar el tipo de estructura de los agentes extraños como β -glucanos, peptidoglicanos y lipopolisacáridos que desencadenan las reacciones de protección (Loker *et al.*, 2004; Steiner *et al.*, 2004; Rendon y Blacázar, 2003). Tales reacciones pueden ser activadas por inducción, al aplicar diversos productos que promuevan de manera directa o indirecta un aumento en la resistencia contra patógenos y una disminución en el estrés (Doñate *et al.*, 2010). Hay muchas maneras de aplicar los inmunoestimulantes ya sea por inmersión, aspersión, inyección o la manera más práctica

de utilizarlos es la adición directa en el alimento del camarón (Rorstad *et al.*, 1993; Azad *et al.*, 2005;).

2.12 Nutraceuticos

Los nutraceuticos son alimentos o compuestos derivados de ellos que sirven como medidas de prevención o tratamientos en contra de alguna enfermedad, además brindan beneficios en salud al ser consumidos (Kalra, 2003; Moroney *et al.*, 2012). Los nutraceuticos pueden ser de diferente procedencia; las plantas, animales y recursos marinos pueden brindar numerosas moléculas benéficas, y con la ayuda de herramientas biotecnológicas es posible obtener los compuestos activos y obtener nuevos aditivos para fortalecer la salud del organismo (Hugenholtz y Smid, 2002; Freitas *et al.*, 2012). Para reforzar la salud del camarón se han utilizado numerosos aditivos o extractos vegetales como una buena estrategia de manejo del cultivo, los cuales proporcionan mejores incrementos de biomasa y mayor resistencia a enfermedades (Tabla 2).

Tabla 2. Nutraceuticos utilizados contra patógenos comunes del cultivo de camarón.

Autor	Nutraceutico (compuesto)	Especie	Patógeno	Resultados
Yeh <i>et al.</i> 2005	Extracto de alga café <i>Sargassum duplicatum</i>	<i>L. vannamei</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Mejora el sistema inmune y hay mayor protección contra <i>V. alginolyticus</i>
Huang <i>et al.</i> 2006	Extracto de polisacárido de <i>Sargassum fusiforme</i>	<i>F. chinensis</i>	<i>V. harveyi</i>	Incrementa el sistema inmune y presenta resistencia a vibriosis
Tayan <i>et al.</i> 2010	Extractos de micro-alga <i>Spirulina plantesis</i>	<i>L. vannamei</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Mayor sobrevivencia y mejora la respuesta inmune
Flores-Miranda <i>et al.</i> 2011	Inmunoestimulantes microbianos + atractantes	<i>L. vannamei</i>	<i>Vibrio</i> sp.	Mayor sobrevivencia
Selvin <i>et al.</i> 2011	Metabolitos secundarios de alga <i>Ulva fasciata</i>	<i>P. monodon</i>	<i>V. fischeri</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>Aeromonas</i> sp.	Mayor sobrevivencia a patógenos bacterianos
Truong-Giang <i>et al.</i> 2011	Extractos de alga <i>Sargassum hemiphyllum</i> var. <i>chinense</i>	<i>L. vannamei</i>	<i>V. alginolyticus</i> / WSSV	Mayor protección y mejor sobrevivencia

Manilal <i>et al.</i> 2012	Extracto del alga roja <i>Asparagopsis</i> sp.	<i>P. monodon</i>	<i>Vibrio</i> sp.	Mayor sobrevivencia y resistencia a vibriosis. d
Hsieha <i>et al.</i> 2013	Extracto de planta <i>Gynura bicolor</i>	<i>L. vannamei</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Incrementa la inmunidad

2.12.1 Nutracéuticos a base de fucoidan

La utilización de compuestos derivados de extractos de plantas o algas pueden tener características deseables para el organismo que lo consume, mejora la calidad de salud y fortalece el sistema inmunitario, incorpora antioxidantes necesarios en el organismo, pueden ser anti inflamatorios entre otros beneficios (Moroney *et al.*, 2012). El fucoidan es un complejo de polisacáridos sulfatados que son extraídos principalmente de algas café (Bilan *et al.*, 2002; Bilan *et al.*, 2006; Hahn *et al.*, 2012; Yu y Sun, 2014). Se han estudiado las aplicaciones del fucoidan para distintas aplicaciones tanto para la salud humana como para salud animal (Hayashi *et al.*, 2008; Senthilkumar *et al.*, 2013). Kim *et al.* (2014) utilizó fucoidan de algas café *Ascophyllum nodosum* y *Fucus vesiculosus* las cuales presentaron inhibiciones de la alfa-amilasa y alfa-glucosidasa, por lo que se recomendó utilizarlos como nutracéutico para personas con diabetes tipo 2. En la tabla 3, se muestran las aplicaciones que se han realizado en la acuicultura al utilizar fucoidan para fortalecer el sistema inmune y generar resistencia a patógenos que afectan los cultivos de camarón.

Tabla 3. Nutracéuticos utilizados con fucoidan para camarones de cultivo.

Autor	Nutracéutico (compuesto)	Especie	Patógeno	Resultados
Takahashi <i>et al.</i> 1998	Fucoidan del alga café <i>Cladosiphono</i> <i>kamuranus</i>	<i>Penaeus japonicus</i>	WSSV	Mejora la resistencia y previene a la infección por WSSV
Campa-Córdoba <i>et al.</i> 2002	Polisacaridos sulfatados, β -glucanos	<i>L. vannamei</i>		Incremento de hemocitos
Chotigeat <i>et al.</i> 2004	Fucoidan de <i>Sargassum polycystum</i>	<i>P. monodon</i>	WSSV <i>V. harveyi</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Mayor resistencia a WSSV y presenta inhibición bacteriana.
Campa-Córdoba <i>et al.</i> 2005	Fucoidan, β -glucanos, lipopolisacáridos	<i>L. vannamei</i>	<i>V. penaeicida</i>	Incremento de la respuesta inmune
Deachamag <i>et al.</i> 2006	<i>V. harveyi</i> inactivado, WSSV inactivado en formalina, Fucoidan	<i>P. monodon</i>	WSSV	Incrementan la expresión de genes de la proteína activadora de fagocitosis.
Immanuel <i>et al.</i> 2012	Fucoidan de <i>Sargassum wightii</i>	<i>P. monodon</i>	WSSV	Incrementa la inmunidad innata y la resistencia a WSSV
Suwaree <i>et al.</i> 2013	Fucoidan	<i>L. vannamei</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Mejora la respuesta inmune y mayor resistencia

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El impacto económico que se tuvo el año pasado y que sigue presente en este año en la camaronicultura de México y en especial en Sonora por la enfermedad emergente EMS/AHPND ha causado pérdidas por más de 1 billón de dólares en producción. Se estima que disminuirá la producción de camarón ante la presencia de este patógeno en los estanques de cultivo, lo cual impacta en la generación de empleo y a la economía de las zonas productivas de camarón en México.

Hay numerosos estudios sobre tipos de aditivos en alimento de camarón, probióticos para reforzar el sistema inmunitario del camarón y así tener una protección contra agentes bacterianos del género *Vibrio* sp., pero en la actualidad se encuentran pocos trabajos sobre la utilización de productos benéficos en la dieta del camarón ante este nuevo patógeno emergente.

Conforme a lo antes planteado, en este estudio surge el siguiente cuestionamiento: **¿Serán las mismas cepas de *Vibrio parahaemolyticus* infectadas por fagos las causantes de EMS/AHPND y de las mortalidades atípicas que se presentaron en Sonora desde el 2013 y 2014? y ¿cuál será el efecto de un nutraceutico a base de fucoidan de extractos de algas café en la inmunidad del camarón ante el patógeno en estudio?**

4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, existe la controversia, si la mortalidad en granjas de Sonora en los ciclos 2013 y 2014, fue por la presencia de *V. parahaemolyticus*, con el agente etiológico de la EMS, debido a la falta oportuna de un diagnóstico molecular como es el PCR. Con este estudio se pretende confirmar y caracterizar al agente etiológico que produjo dichas mortalidades en Sonora México. Después de caracterizar la presencia del EMS, nos servirá para evaluar aditivos nutracéuticos con capacidad inmunoestimulantes que brinden protección contra el patógeno en estudio. Los resultados obtenidos tendrán un impacto directo ante la problemática actual que presenta la industria camaronícola.

5. HIPÓTESIS

Las mortalidades de camarón de cultivo en el 2013 y 2014 en Sonora, fueron causadas por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* causante de EMS/AHPND. La utilización de nutraceuticos con fucoidan del alga *Ecklonia arborea* en dietas de camarón generará un aumento en los parámetros inmunológicos y producirá una mayor protección ante patógenos.

6. OBJETIVO

6.1 Objetivo general

Comprobar que el agente causal de las mortalidades atípicas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en las granjas del estado de Sonora es la misma o diferentes cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que causa la EMS/AHPND, mediante caracterización bioquímica y genotípica, Adicionalmente evaluar los efectos que tiene la inclusión de fucoidan proveniente del alga *Ecklonia arborea* en dietas experimentales para camarón *L. vannamei* en términos de parámetros inmunológicos.

6.2 Objetivos particulares

(I) Aislar cepas de *Vibrio* spp. de diferentes localidades en Sonora del ciclo de cultivo 2013 - 2014, mediante pruebas bioquímicas y moleculares para su posterior caracterización.

(II) Caracterización de las cepas mediante pruebas bioquímicas y moleculares para su identificación.

(III) Comparar las cepas identificadas mediante estudios genómicos entre las cepas y su relación con el lugar de procedencia.

(IV) Evaluar la sensibilidad del agente causal EMS *in vitro*, mediante pruebas de inhibición bacteriana con antibióticos.

(V) Evaluar parámetros inmunológicos en camarón al ser alimentados con dietas elaboradas con fucoidan de *Ecklonia arborea* a distintas concentraciones.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Sitios de muestreos

Se trabajaron con muestras de agua y camarón provenientes de diferentes sectores del estado de Sonora durante el ciclo de cultivo 2013. Los sitios de muestreos fueron nueve, en la figura 2 se observan los puntos de muestreo los cuales se distribuyen de la siguiente manera: seis localidades en la Junta local de Cruz de Piedra (centro de Sonora), una localidad en el Tóbari y dos en Atanasia (sur de Sonora), en los cuales los puntos de muestreo fueron de granjas afectadas por la mortalidad atípica.



Figura 2. Juntas locales de los muestreos de agua y camarón. Ciclo de producción 2013 de Cruz de Piedra, Mélagos y Atanasia.

Para las muestras del ciclo 2014 se monitorearon cuerpos de agua (esteros y drenes) circundantes a las granjas que presentaron mortalidad en el ciclo 2013, las localidades son en los esteros de Melagos ($27^{\circ} 09' 46.90''$ N, $110^{\circ} 15' 58.49''$ O), Atanasia ($27^{\circ} 08' 08.85''$ N, $110^{\circ} 11' 27.67''$ O) y El Riito ($26^{\circ} 47' 2.59''$ N, $109^{\circ} 48' 48.20''$ O). Los muestreos de camarón silvestre, agua y sedimento fueron en los canales de llamada de las granjas acuícolas que están cerca a la escollera para tratar de aislar cepas patógenas de *Vibrio* sp. que puedan causar enfermedad dentro de las granjas camaroneras de donde obtienen el agua marina (figura 3).

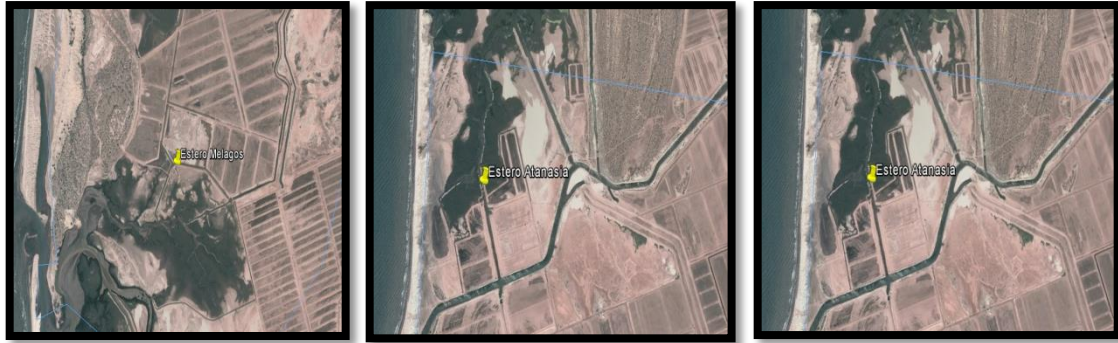


Figura 3. Esteros del sur de Sonora, Mélagos (Izquierda), Atanasia (centro) y El Riito (derecha).

De igual manera se recolectó camarón silvestre y sedimento para analizarlos antes y durante el ciclo de producción 2014. Se realizaron muestreos dirigidos a granjas productoras de camarón que iniciaron con signos anormales de estado de salud y mortalidad temprana en sus cultivos.

7.1.1 Muestreo de agua

Se colectaron muestras de agua asépticamente en los recipientes de bolsas estériles Whirl-pack® introduciéndolas en las columnas de agua que llenan las granjas en los dos ciclos de muestreo 2013 y 2014. Ya selladas las bolsas, se almacenaron en hieleras para transportarlas y analizarlas en el Laboratorio de Análisis de Sanidad Acuícola (LASA) del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). Todo el procedimiento se realizó como lo recomienda la Norma oficial Mexicana (NOM-230SSA1-2002).

7.1.2 Muestreo de camarón silvestre y de cultivo

Para la captura de los camarones silvestres o de cultivo, se utilizó una atarraya convencional, mediante el método dirigido, en el cual se colectan organismos con características o signos anormales que presumiblemente estén asociados con alguna enfermedad, esto es para ambos ciclos de cultivo 2013 y 2014 (Organización Mundial de Salud Animal, 2013). Para la transportación de los organismos vivos al laboratorio se utilizaron acuarios de plástico limpios con capacidad de 20 L, se llenaron con la misma agua de las granjas, suministrándoles aireación con un aereador para evitar el estrés por falta de oxígeno, si el lugar de muestreo estaba lejos del laboratorio, a los acuarios se

agregaron bolsas con hielo para bajar la temperatura y disminuir el metabolismo de los camarones, y evitar muertes durante el transporte (Ali *et al.*, 2012; Joshi *et al.*, 2014).

7.2 Análisis bacteriológico

En los análisis bacteriológicos de agua y camarón en ambos ciclos, se interpretaron los resultados mediante la metodología descrita de Gómez-Gil *et al.* (1998) y Soto-Rodríguez *et al.* (2010).

7.2.1 Análisis bacteriológico de agua

Para la realización de la bacteriología de todas las muestras, se esterilizó el área de trabajo y se procesaron asépticamente cada una de los organismos. Las muestras de agua se sembraron directamente con 100 µL de la muestra en placa en el medio de cultivo TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose; DIFCO, BD, México), sembrándose con una asa acodada de vidrio en la placa, posteriormente se incubaron por 18 a 24 h a 28 - 30 °C (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Soto-Rodríguez *et al.*, 2010).

7.2.2 Análisis bacteriológico de camarón

7.2.2.1 Bacteriología de postlarva

Para el análisis bacteriológico de postlarva (PL) se pesó un gramo de muestra y maceró en 10 mL de solución salina al 2% estéril, del macerado se sembraron 100 µL en el medio de cultivo TCBS, las placas se incubaron de 18 a 24 h a una temperatura de 28 a 30 °C (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Soto-Rodríguez *et al.*, 2010).

7.2.2.2 Bacteriología de hepatopáncreas (HP)

Para el análisis bacteriológico de HP, se utilizó una pinza de disección estéril y bajo condiciones asépticas se extrajeron los HP y se pesó 1 g de cada uno. Luego se maceraron en 10 mL de solución salina al 2% estéril en mortero y se usaron 100 µL para cultivarse en TCBS, las placas se incubaron de 18 a 24h a una temperatura de 28 a 30 °C (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Soto-Rodríguez *et al.*, 2010).

7.3 Aislamiento y purificación de cepas bacteriológicas

Para la selección de colonias de *Vibrio*, se tomaron únicamente las colonias verdes del agar TCBS con o sin presencia de bioluminiscencia. Ya seleccionada la colonia, se tomó una y se resembró en un medio que contenía agar tripticaseína de soya (TSA; DIFCO, BD) al 2% de NaCl, además del medio CHROMagar® Vibrio, el método que se utilizó fue por estría cruzada, a una temperatura de 35°C por 24 h. El procedimiento se repitió hasta obtener un solo tipo de colonia en la placa (Costa *et al.*, 2010; Di Pinto *et al.*, 2011).

7.4 Preservación de las cepas bacterianas

Los aislados bacterianos se resguardaron por criopreservación a -80 °C, según el manual de ATCC (2013); se ajustó el medio de cultivo en las mismas concentraciones de NaCl. Se utilizaron dos tubos de 2 mL para la criopreservación con 1 mL de caldo tripticaseína de soya (TSB, DIFCO, México) al 2% de NaCl y glicerol al 30%. Se seleccionó una colonia de un cultivo joven (18 – 24 h de incubación) de la cepa purificada. Posteriormente para reactivar la cepa conservada, se sembró en agar TSA al 2% de NaCl o se agregó 100 µL en TCBS del tubo con la cepa preservada.

7.5 Identificación de las cepas aisladas por MicroScan®

Se realizó un perfil bioquímico a las cepas aisladas mediante el protocolo para *Vibrios* halofílicos descritos en el manual de MicroScan® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.), a continuación se describe el protocolo recomendado (figura 4):

- Utilizar paneles para Gram negativas MicroScan®.
- Suspender las colonias purificadas en 3mL de solución salina 1 al 2 % estéril. La turbidez debe equivaler al estándar 0.5 de McFarland.
- Rehidratar el panel con agua de inóculo con Pluronic® no inoculada, utilizando el sistema RENOK® y una charola de inoculación.

- Usar una pipeta estéril para adicionar 1 gota (45-50 μL) de la solución salina con *Vibrio* en suspensión en cada uno de los 27 pozos de las bioquímicas, incluyendo los pozos G (crecimiento), Cl_4 y Cf_8 .
- Incubar los paneles por 16-24 horas, y adicionar los reactivos reveladores correspondientes.

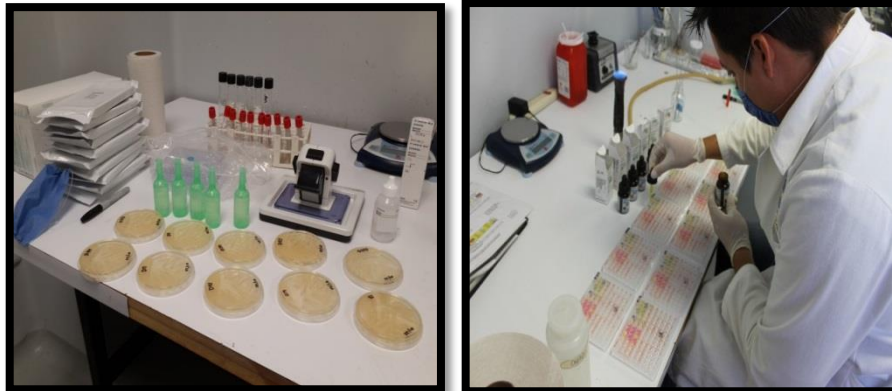


Figura 4. Material para identificación bioquímica por MicroScan®.

7.6 Caracterización molecular

7.6.1 Extracción de DNA

En el laboratorio de LASA en la unidad Obregón del ITSON se caracterizaron 45 cepas bacterianas de las muestras de colectadas en Sonora, las cuales fueron 15 para cada ciclo 2013 y 2014. Las cepas bacterianas obtenidas se purificaron en agares generales y selectivos. Se utilizó DNA de estómago, hepatopáncreas o aislados bacterianos, se utilizaron de 10 a 100 ng de DNA de la muestra antes mencionadas. La extracción para el DNA, se realizó con el kit comercial de DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA), se realizó según las instrucciones del proveedor. El DNA se resuspendió en 50 μL de agua estéril y se guardó a -20°C hasta su uso.

7.6.2. Identificación por PCR

Protocolo de detección AHPND/EMS en PCR tiempo final:

El coctel de reacción se preparó con una mezcla de buffer 5X, 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP, 0.2 μM de cada primer (AP3F) - 5'-ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC-3' y (AP3R) - 5'-

GTGGTAATAGATTGTACAGAA-3', 3 μ L de DNA de la muestra y 1 U de Taq polimerasa (GoTaq, Promega), para tener el volumen final se le agregó la cantidad necesaria de agua bidestilada (dH₂O). El volumen total de la reacción fue de 25 μ L. Se utilizó un termociclador iCycler (Bio-Rad), con un programa de precalentamiento de 94° por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización de 94° por 30 s, anillamiento de 53°C por 30 s, extensión de 72°C por 40 s y una extensión final de 72 por 5 min. Terminada la reacción se obtuvieron la amplificación de productos de 336 bp, registrandose las fotografías en una cámara de electroforesis UV (Bio-Rad) en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (Sirikharin *et al.*, 2014).

7.6.3 Estudios genómicos 16S rADN

Identificación molecular por gen 16S rADN. El ADN obtenido de las bacterias marinas se sometió a la amplificación dirigida al del gen 16S rADN. Los primers utilizados fueron: U1F (5'-CTYAAAKRAATTGRCGRRSSC - 3') y U1R (5'-CGGGCGGTGTGTRCAARRSSC-3') (Rivas et al., 2004). Se preparó una mezcla de 25 μ L con 5X buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0.2 μ M de cada primer, DNA de las muestras (100 ng/ μ L), 1 U de Taq polimerasa (GoTaq, Promega) y dH₂O. Se utilizó el termociclador iCycler (Bio-Rad) con un programa de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, alineamiento de 55°C por 2 min y extensión a 72°C durante 1 min, una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1%, en un transiluminador UV (Bio-Rad). Posteriormente los productos de DNA fueron purificados con el kit QIAquick PCR (Qiagen), se enviaron a secuenciar en Servicios Genómicos de CINVESTAV-LANGEBIO, Irapuato, Guanajuato.

7.6.4 Variabilidad bacteriana por PCR – (GTG)₅

Análisis por PCR (GTG)₅; Para discriminar entre cepas seleccionadas se utilizó la técnica de PCR (GTG)₅, la cual se basa en la amplificación de secuencias repetidas intercaladas en el DNA. Se preparó una mezcla de 25 μ L para PCR con 5X Taq Green buffer (Promega), 25 mM MgCl₂, 25 mM desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), 25 μ M (GTG)₅ primer (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'), dH₂O, ADN (100 ng/ μ L) y ADN polimerasa (GoTaq, Promega). La amplificación comenzó con una pre-

desnaturalización a 95°C (7 min), seguido por 4 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión a 95°C (2 min), 36°C (2 min) y 72°C (2 min), respectivamente, más 30 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión a 95°C (1 min), 50°C (1 min) y 72°C (1 min), respectivamente. La elongación final fue a 72°C por 5 min. Las muestras se analizaron visualmente en geles de agarosa al 1.5%, corridos en cámara de electroforesis con 1X buffer TBE (Tris Borato EDTA), a 100 V por 1 h y 30 min. Se seleccionaron las cepas con perfiles o patrones de bandas diferentes (Versalovic *et al.*, 1994; Matsheka *et al.*, 2005).

7.7 Sensibilidad antimicrobiana

Los antibióticos comerciales de la marca AVIMEX utilizados para los antibiogramas fueron: Oxi-blend® (Oxitetraciclina: OXD), Flor-blend® (Florfenicol: FLD), Enro-blend® (Enrofloxacin: EBD), Magna-mix® (magnacina: MGX), Tri-mex® (Sulfacloropiridacina y Trimetoprim: TX) y Aviflox® (Enrofloxacin: AFX) según los protocolos propuestos por CLSI (2005a; 2005b) (Yano *et al.*, 2014). Se ajustó la turbidez de la suspensión bacteriana a 0.5 McFarland, en el medio de cultivo Mueller Hinton (DIFCO, DB) se le agregó el 2% de NaCl al ser bacterias marinas. Se realizó por triplicado para cada antibiótico y bacteria evaluada (figura 5).



Figura 5. Antibióticos en sensidiscos para antibiogramas AVIMEX® (Izquierda), grados de sensibilidad al antibiótico. Fuente: AVIMEX 2008.

7.8 Bioensayos con nutracéuticos

7.8.1 Diseño experimental

Los bioensayos con nutracéuticos se realizaron en el Laboratorio de Maricultura de la FCB, Unidad B de la UANL. Se trabajaron con 4 replicados por tratamiento (Control, Harina, Fucoïdan) para evaluar cada dieta con 25 camarones *L. vannamei* por acuario con un peso promedio de 5-6 g. Los acuarios utilizados tenían una capacidad de 120 L, se utilizaron 12 acuarios en total. Los camarones se distribuyeron en los acuarios y se dejaron por tres días con alimento control para que se aclimataran a las condiciones del sistema, al tercer día se comenzó con la alimentación con las dietas a evaluar. La alimentación se realizó con el 6% de la biomasa del acuario por día, se alimentaron 3 veces al día a las 7:00, 13:00 y 19:00 h. Al tercer día se realizó la primera toma de muestra de hemolinfa. Se tuvo la precaución de eliminar los restos de alimento y heces antes de cada alimentación. Se registraron los parámetros fisicoquímicos diariamente de temperatura (C°), Salinidad (g/L) y pH, el suministro de oxígeno fue constante por el sistema interno de recirculación (air lift) que recibe un flujo continuo de agua de entre 330-360 mL/min.

7.8.2 Dietas experimentales

Se formuló una dieta control, la cual no contiene harina de krill, harina de alga o de levadura que son ingredientes con posible actividad inmunoestimulante. A partir de ésta, se formularon 2 alimentos, los cuales se le añadieron el 2% de harina de alga de *Ecklonia arborea* y 2 g/kg de fucoïdan. El nivel de inclusión de la harina de trigo fue cambiado de acuerdo al nivel de inclusión de los ingredientes experimentales (Tabla 4).

Tabla 4. Dietas experimentales, control y dietas con harina y fucoïdan de *E. arborea*.

Tratamiento	Control	<i>Ecklonia arborea</i>	
		Harina (2%)	Fucoïdan (2 g/Kg)
Harina de trigo	342.7	319.3	337.1
Harina de pescado	213.7	216.4	216.4
Fucoïdan de <i>E. arborea</i>	---	---	2.0
Harina de <i>E. arborea</i>	---	20.0	---
Pasta de soya	210.0	210.0	210.0

Gluten de trigo	40.0	40.0	40.0
CMC 50000	40.0	40.0	40.0
Gluten de maíz	31.5	31.5	31.5
Harina de calamar	26.0	26.0	26.0
Soluble de pescado	22.3	22.3	22.3
Lecitina de soya	27.5	27.5	27.5
Aceite de pescado	27.6	27.6	27.6
Carbonato de calcio	10.0	10.0	10.0
Ortofosfato	3.9	3.9	3.9
Mezcla vitamínica	2.0	2.0	2.0
Premix de minerales	1.5	1.5	1.5
Cloruro de colina	1.0	1.0	1.0
Amonex aquadry	1.0	1.0	1.0
Vitamina C	0.2	0.2	0.2

7.8.3 Elaboración de las dietas

Para la elaboración de las dietas, cada uno de los ingredientes fue molido al mismo tamaño de partícula, para lograr una mayor homogeneidad y uniformidad del alimento. Posteriormente se pesaron por separado y mezclaron en una batidora (Kitchen Air) con capacidad de 4 L. Primero se mezclaron los macronutrientes durante 5 min. Después se añadieron a la mezcla los micronutrientes y se homogenizaron por 5 min, una vez transcurrido el tiempo, se añadieron poco a poco los aceites (aceite de pescado, lecitina de soya y soluble de pescado) e igual se mezclaron por 5 min. Finalmente, se añadió agua destilada caliente (350 mL), esto se hizo lentamente para evitar la formación de grumos y se mezclaron durante 10 min. Una vez mezclados todos los ingredientes, la pasta obtenida fue peletizada en un molino de carne (TORREY, México) con un dado con perforaciones de 1.6 mm de diámetro, se midió la temperatura inicial y final cada vez que sea procesó una dieta. Al obtener los pellets, éstos se secaron en una estufa a 100 °C durante 12 min, posteriormente se dejaron a temperatura ambiente durante 24 h y finalmente se almacenaron a 4 °C en bolsas de plástico correctamente rotuladas.

7.8.4 Parámetros de respuesta inmune en hemolinfa

7.8.4.1 Extracción de hemolinfa

Los muestreos de hemocitos fueron a los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 después de haber iniciado la alimentación, se tomaron 3 organismos provenientes de cada acuario de cada tratamiento (12 en total por tratamiento). Se preparó una solución con EDTA (SIC-EDTA) como anticoagulante (Vargas – Albores *et al.*, 1993) y fue enfriada previamente a 4° C, con esta solución se prepararon jeringas de 1 mL que contenían 200 µL de la solución anticoagulante.

Se extrajo cuidadosamente la muestra de la región ventral del camarón entre el último par de pereiópodos y el primer par de pléopodos (seno ventral), un volumen de hemolinfa (~100µl) en relación con la cantidad de anticoagulante usado, la cual se colocó en tubos eppendorf siliconizados de 1.7 mL, deslizando la muestra por la pared del tubo para no producir la lisis de los hemocitos y prevenir la activación y ruptura celular. Cada tubo se rotuló con el número de muestreo, acuario muestreado y número de camarón, se registró la cantidad vertida al tubo, así como el factor de dilución para realizar los cálculos correspondientes de los parámetros hemáticos.

7.8.4.2 Conteo total de hemocitos (CTH)

Para la cuantificación del número de hemocitos, se siguió la metodología citada en Hernández-López (1996), de manera general, se adicionaron 100 µL de hemolinfa colectada y diluida en SIC-EDTA 2:1. La hemolinfa fue preservada en formaldehído al 4%, se añadió 50 µL de hemolinfa en 200 µL de formaldehído (Campa-Córdova *et al.*, 2002). Se mezclaron cuidadosamente y se colocaron 10 µL en la cámara de Neubauer (hematocitómetro). Se dejó en reposar por 15 segundos y se contabilizaron en un microscopio compuesto a 40x, la cantidad total de hemocitos presentes en los 4 cuadrantes exteriores. La concentración de las células totales fue calculada empleando la siguiente fórmula:

Células de hemocitos totales/mL= $(((C1+C2+C3+C4/4)*10,000))*factor$ de dilución1 *factor de dilución 2].

Además, se diferenciaron y se cuantificaron los diferentes tipos celulares en cada muestra: hemocitos hialinos (H), semi-granulosos (SG) y granulosos (G).

7.8.4.3 Actividad fenoloxidasa libre (FOL) y fenoloxidasa total (FOT)

Para determinar la actividad de la fenoloxidasa total se utilizó un método de microplacas, se depositaron 10 μ L de una solución de tripsina (1mg/mL) a cada pozo y se añadieron 10 μ L de la muestra, se dejó reposar por 10min., posteriormente se añadieron 250 μ L L-DOPA (1mg/mL) y se determinó la lectura de la absorbancia exactamente después de los 20 min a 490 nm en un Multiskan EX ELISA.(Hernández-López *et al.*, 1996). Para determinar la fenoloxidasa libre se añadieron 250 μ L de L-hydroxifenilalanina (L-DOPA, 1mg/mL, Sigma, México) directamente a 10 μ L de muestra de hemolinfa y se determinó la absorbancia exactamente después de 20 min. Se procedió de igual forma para la fenoloxidasa total. Todos los análisis se realizaron por duplicado (Gollas-Galván, 2003).

7.8.4.4 Estallido respiratorio(ER)

La metodología del estallido respiratorio es según Liu y Chen (2004)

Preparación de la microplaca:

- Se depositó una suspensión de 5×10^5 hemocitos por triplicado (para cada muestra) en una microplaca en 100 mL de medio MHBSS(Sigma).
- Se incubó en condiciones de humedad, durante 30 min a temperatura ambiente (para la adherencia de los hemocitos)
- El sobrenadante se elimina y se reemplaza con 50 μ L de medio MHBSS

Medición de reducción de NBT (nitro azul de tetrazolio)

- Se agregaron 50 μ L de medio que contenía:
 - a) Blanco= Sin ningún inductor
 - b) Control Positivo= Laminarina L 9634; Sigma (inductor de estallido respiratorio).
 - c) Control Negativo= Iodoacetamina (inhibidor de estallido respiratorio)
 - d) Muestra a analizar (PL's).
- Se distribuyó inmediatamente a cada pozo 50 μ L de la solución de NBT al 0.3% en medio MHBSS.
- 2 h de incubación, a temperatura ambiente en condiciones de humedad y en la oscuridad.

- Se retiran los sobrenadantes y los hemocitos se fijan mediante la adición de 200
- mL de metanol absoluto.
- Se lava dos veces con metanol al 70%, y se seca al aire por 30 min.
- Los depósitos de formazán se disuelven en 120 mL de KOH 2M y 140 mL de DMSO (dimetil sulfoxido, Sigma, México).

Después de homogenizar el contenido en los pocillos, se determina la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro

7.9 Análisis estadístico

Para el análisis de datos de CTH, FOT, FOL, ER y antibiogramas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple para comparar entre las variables analizadas, con pruebas de rangos múltiples y la prueba de (LSD) Fisher con el Paquete estadístico STATISTICA Versión 5.0.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Análisis bacteriano

De los muestreos en los esteros y en granja de camarón se aislaron 444 colonias verdes característica en el crecimiento de *V. parahaemolyticus* (Vph) en el agar TCBS (colonias verdes), se ignoraron las colonias amarillas. Las colonias aisladas fueron preservadas a -80°C para resguardo y posteriores análisis, en los muestreos en los esteros del sur de Sonora se obtuvieron 82 aislados bacterianos, en la tabla 5 se pueden observar la cantidad de aislados de los distintos tipos de muestras de cada uno de los sitios de muestreo. En la tabla 6 están las cepas obtenidas de los muestreos de las granjas de cultivo de camarón en 11 juntas locales de sanidad acuícola, con un total de 362 cepas aisladas.

Tabla 5. Aislados bacterianos en agua, sedimento y camarón antes del ciclo de cultivo 2014 en tres juntas locales de sanidad acuícola en el sur de Sonora.

Localidad (JLSA)	Agua	Sedimento	Larva	Hepatopáncreas	Total de aislados
Atanasia	6	5	3	3	17
Mélagos	5	4	7	3	19
El Riito	1	2	27	16	46
Total	12	11	37	22	82

Tabla 6. Aislados bacterianos en agua, sedimento y camarón durante el ciclo de cultivo 2014 en 11 juntas locales de sanidad acuícola en el estado de Sonora.

Localidad (JLSA)	Agua	Sedimento	Larva	Hepatopáncreas	Total de aislados
Aquiropo	-	-	-	5	5
Atanasia	16	3	4	28	51
Bahía de Kino	2	-	1	6	9
Bahía de Lobos	30	15	-	22	67
Cruz de Piedra	7	5	1	5	18
Mélagos	39	10	11	61	121
El Riito	3	2	-	6	11
Santa Bárbara	-	-	1	1	2

Siari	2	-	-	-	2
Tastiota	2	-	-	9	11
Tobari	13	5	4	21	43
*Sin definir	8	-	-	14	22
Total	122	40	22	178	362

Las colonias características para Vph son las colonias verdes, las cuales en el total de las muestras procesadas por bacteriología se sembraron en el medio de cultivo CHROMagar Vibrio® el cual tiene la capacidad de diferenciar cepas de *Vibrios* por crecimiento en el medio, Vph crece de color malva (rosa – morado) según el fabricante y trabajos realizados por Sanchez-Díaz *et al.* en 2016. Del total de las cepas verdes obtenidas, 186 presentaron características para Vph en su coloración malva, de los cuales se escogieron 83/444 cepas que presentaron una coloración más oscura del malva (morado, apreciación subjetiva), que representa el 18.6% de las cepas totales obtenidas durante todo el muestreo.

8.2 Caracterización de cepas

De las 83 cepas obtenidas por los análisis bacteriológicos se descartaron aquellas que se repetían el lugar de procedencia, tipo de muestra (agua, sedimento o agua), para la identificación por PCR para AHPND y para detectar Vph con el gen *tl* según Bej *et al.* (1999).

8.2.1 Identificación por PCR

Las cepas positivas para AHPND por PCR fueron 18, en la tabla 7 se observa la procedencia de las muestras y la localidad donde fueron obtenidas.

Tabla 7. Cepas positivas para Vph y AHPND, localidad y tipo de muestra.

FECHA	CLAVE	LOCALIDAD	TIPO DE MUESTRA	PCR <i>AP3</i>	PCR <i>tl</i>
03-may	B23	Tóbari	Estómago	+	+
03-may	B25	Tóbari	Agua	+	+
13-may	D2	Lobos	Sedimento	+	+
13-may	D11	Tóbari	Larva	+	+
13-may	D12	Atanasia	Larva	+	+

15-may	D19	Mélagos	Sedimento	+	+
19-may	D50	Lobos	Hepatopáncreas	+	+
21-may	D74	Mélagos	Larva	+	+
22-may	D92	Cruz de Piedra	Hepatopáncreas	+	+
29-may	D125	Lobos	Agua	+	+
03-jun	D139	Cruz de Piedra	Hepatopáncreas	+	+
04-jun	D141	Mélagos	Hepatopáncreas	+	+
17-jun	D190	Mélagos	Hepatopáncreas	+	+
18-jun	D196	Atanasia	Agua	+	+
09-jul	D236	Tastiota	Hepatopáncreas	+	+
18-jul	D254	Mélagos	Agua	+	+
18-jul	D263	Mélagos	Agua	+	+
24-jul	D266	Mélagos	Agua	+	+

Se encontraron 6 cepas obtenidas de hepatopáncreas de camarones de granjas que presentaban mortalidades durante el cultivo, a su vez se realizó bacteriológico de estómago de los mismos camarones en el cual se encontró una cepa positiva de AHPND, éstos órganos son los afectados por la bacteria Vph AHPND+ según Lightner *et al.* (2012) y Tran *et al.* (2013a). En las muestras de agua se encontraron 6 cepas positivas y dos cepas para el sedimento, se encontraron en los estanques de cultivos con amplicones de 336 pb (figura 6) que al estar presente en el medio ambiente puede ser fácilmente propagada la enfermedad por descargas de agua al dar recambio de agua y afectar a granjas que aún no presentan la enfermedad. Roque *et al.* (1998) evaluaron la infección de *Vibrio parahaemolyticus* causada por en camarones que pueden infectarse al tener heridas o estar expuestos con el patógeno dentro de un mismo sistema de cultivo.

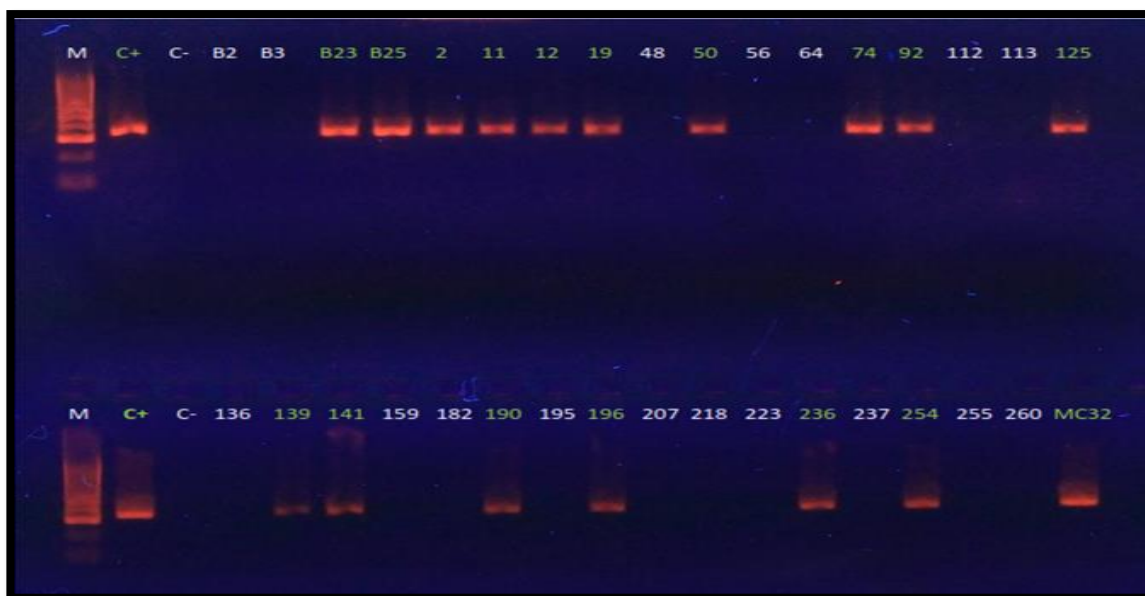


Figura 6. Cepas AHPND+ con primer AP3, cepas positivas en color verde, amplicones de 336 pb.

8.2.2 Identificación por pruebas bioquímicas MicroScan®

El perfil bioquímico de las cepas positivas para AHPND por el método de MicroScan® presentan tres grupos diferentes según las pruebas positivas, en la tabla 8 se muestran aquellos grupos con el mismo perfil bioquímico, el primer grupo presenta el mismo perfil que la una cepa de referencia de ATCC 17802 de Vph (AHPND -) y una cepa positiva para AHPND (cepa MC32, nomenclatura interna) por Soto-Rodríguez *et al.* en 2015. Otro grupo de dos cepas AHPND+ presenta una diferencia al dar positivo al fermentar la Rhamnosa, y una cepa presenta una prueba positiva para Ornitina. El banco de datos del software de MicroScan® todas las cepas presentan una identidad mayor del 98% para *Vibrio parahaemolyticus*.

8.2.3 Secuenciación 16S rDNA

Con las secuencias obtenidas de las cepas de estudio, se realizó un dendrograma para observar si están emparentadas con las cepas reportadas en GenBank-NCBI (figura 7).

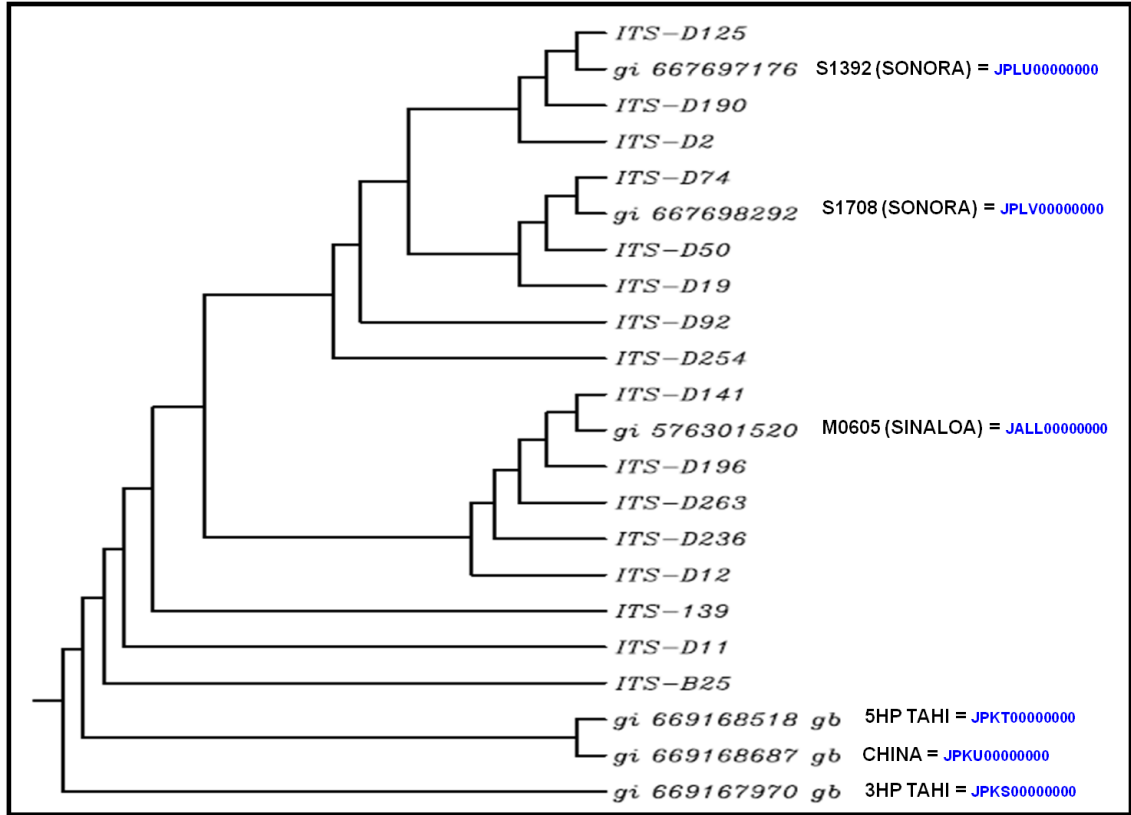


Figura 7. Relación evolutiva de las taxas: La historia evolutiva fue inferida con el método NJ (Neighbor-Joining).

El dendrograma fue obtenido con 500 replicas para representar la evolución de las cepas de bacterias de *Vibrio parahaemolyticus* AHPND+ analizadas mediante la secuenciación de la región 16S rADN. Las ramas corresponden a particiones en al menos el 50% de las replicas por bootstrap. La distancia evolutiva se computó con el método "p-distance" y son el número de diferencia en las bases por sitio, involucrándose a 17 secuencias de nucleótidos. El análisis se realizó con Mega 7 (Saitou y Nei. 1987).

Las cepas de Vph de Thailandia (3HP y 5HP) y China que surgieron en el 2009, son el origen evolutivo de las cepas de Sonora y Sinaloa (2013-2014), las cuales se caracterizan por tener 17 secuencias diferentes de nucleótidos en las regiones analizadas de 16S rADN (Gómez-Gil *et al.*, 2014; Gomez-Jimenez *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014)

Las 17 cepas se registraron en el GenBank con los números de acceso que se describen en la tabla 8.

Tabla 8. Cepas registradas en el GenBank con el número de acceso.

Nombre de la cepa	Números de acceso (GenBank/NCBI)
Vp-B25	MH091005.1,
D236pF	MH091018.1
D141	MH091015.1
D196F	MH091017.1
D266	MH091021.1
D254	MH091019.1
D190	MH091016.1
D139	MH091014.1
D125	MH091013.1
D92	MH091012.1
D74F	MH091011.1
D50	MH091010.1
D19F	MH091009.1
D12F	MH091008.1
D11F	MH091007.1
Vp-D2	MH091006.1
Vp-25	MH091005.1

8.2.4 Variabilidad de cepas por PCR – (GTG)₅

Los resultados del PCR-(GTG)₅ muestran que hay variabilidad entre las cepas de estudio, se muestran dos grupos, uno de ellos los pesos moleculares amplificados son aproximadamente iguales entre ellos, en la figura 8 se observan los grupos en color verde y azul presentan el mismo perfil de amplicones. Las cepas en color blanco el perfil es distinto para todas las cepas evaluadas. En la imagen 9 se observa la distribución de las cepas, el lugar de procedencia y la cantidad de cepas por JLSA.

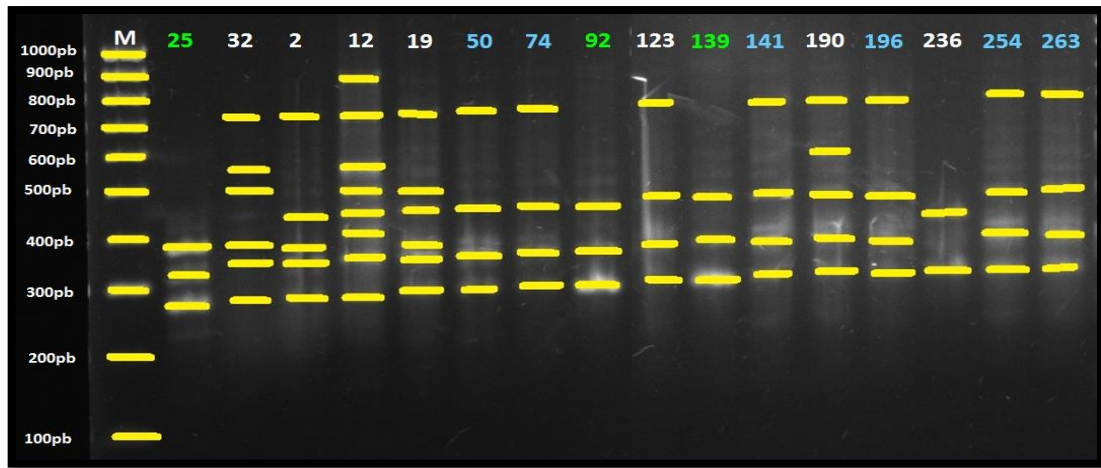


Figura 8. Perfil de amplicones para las cepas de Vph AHPND+, la lectura del gel fue con el software GelAnalyzer 2010.



Figura 9. Distribución de las cepas positivas a AHPND en el estado de Sonora.

La mayoría de las cepas identificadas en el presente estudio se obtuvieron en el sur de Sonora, se muestra una mayor variedad de los biotipos de Vhp, esto se debe a que se encuentran la mayor concentración de granjas de cultivo de camarón en el estado, de las 11 JLSA que se muestrearon, solo en 6 JLSA se obtuvieron las cepas de Vph AHPND+. En cuatro JLSA al sur de estado se identificaron 15 cepas positivas, dos cepas para el centro y una para el norte de Sonora. Versalovic *et al.* (1994) y Kathleen *et al.* (2014) utilizan el PCR-(GTG)₅ para ver la variabilidad y diversidad de cepas bacterianas, que permiten agrupar o separar cepas bacterianas del mismo tipo al presentar un perfil de

amplicones diferentes de regiones conservadas en el genoma bacteriano, sirve como una herramienta para la caracterización molecular, complementándose con otros métodos de identificación como la secuenciación del 16S RNAr y pruebas bioquímicas. Soto-Rodríguez *et al.* en 2015 utilizan el PCR-(GTG)₅ para complementar la caracterización genómica de cepas aisladas en el estado de Sinaloa, en la cual encuentran diferencias entre las cepas obtenidas de camarones con características a AHPND y también presentan diferencias en la virulencia entre las cepas evaluadas observadas en desafíos en camarón. Nuestros resultados muestran que hay variabilidad entre las cepas obtenidas en Sonora, porque se agruparon en perfiles similares y otros variados en PCR-(GTG)₅, complementando los resultados de la caracterización bacteriana y molecular con desafíos de las cepas en camarón, se reporta que dichos grupos presentan mayor o menor grado de virulencia y diferencia en el impactos de mortalidad en las granjas en donde fueron colectadas.

8.3 Sensibilidad antimicrobiana

Los resultados de los antibiogramas con los antibióticos comerciales de AVIMEX® presentaron distintos halos de inhibición, algunas cepas presentan un mayor grado de sensibilidad al antibiótico (figura 10).

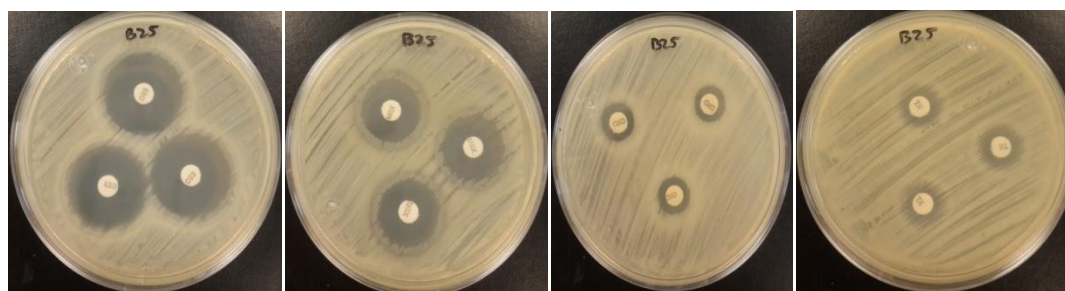


Figura 10. Distintos halos de inhibición, cepa B25. Antibióticos (EBD-MGX-OXD-TX).

En la tabla 9 se registran los diámetros de inhibición para todas las cepas evaluadas, incluso también con la cepa de referencia ATCC y MC32. Todas las cepas presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las cepas y los antibióticos evaluados, donde el FLD mostró los mejores resultados.

Tabla 9. Antibiógramas de las cepas AHPND+ de Sonora, Letra distinta representa diferencia significativa (p<0.05).

CEPAS	ANTIBIOGRAMAS					
	OXD	EBD	FLD	MGX	TX	AFX
ATCC	24	22	30	26	22	22
B23	12	26	31	20	0	28
B25	12	26	31	20	0	28
D2	12	24	29	19	0	26
D11	7	22	30	22	26	26
D12	8	22	30	22	26	23
D19	10	24	29	19	0	25
D50	10	26	30	20	0	27
D74	12	25	31	21	0	25
D92	24	21	28	19	21	22
D125	12	27	31	24	0	26
D139	23	22	29	19	21	22
D141	11	25	31	22	0	26
D190	12	25	32	21	0	26
D196	24	24	30	23	19	24
D236	25	25	30	19	21	24
D254	10	25	30	20	0	26
D263	24	24	29	22	22	25
D266	12	23	29	18	0	24
MC32	9	22	29	22	0	23
Media	15 ^A	24 ^B	30 ^C	21 ^D	9 ^E	25 ^B

En el antibiótico OXD se observa que tiene variación en los halos de inhibición, presenta un 33% de cepas que son sensibles a OXD, seguido con 73% de sensibilidad intermedia y solo una cepa no sensible al antibiótico, estas variaciones de inhibición pueden ser debido a que este antibiótico es el más utilizado en el cultivo de camarón y se han observado mayor resistencia de bacterias de *Vibrio* sp.con OXD. En la tabla anterior hay diferencias significativas entre las cepas en la inhibición con EBD, FLD, MGX y AFX aun cuando hay diferencias entre las cepas y los antibióticos, el 100% de las cepas fueron sensibles al antibiótico.

El antibiótico de TX (Sulfacloripiridacina y Trimetoprim) se observa un 44% de las cepas sensibles al antibiótico, pero el 56% de las cepas no presentan inhibición, lo cual no es recomendable el uso de este antibiótico ante AHPND.

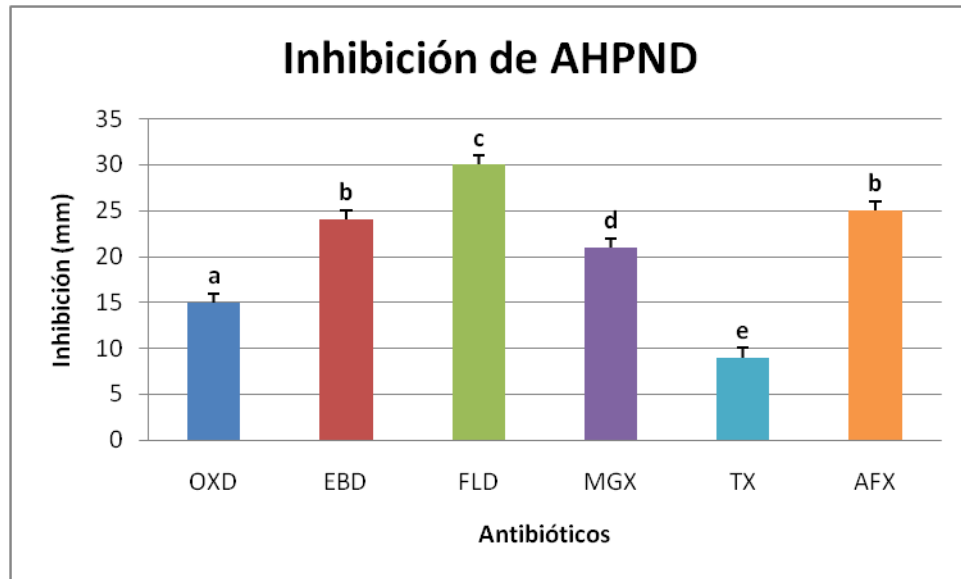


Figura 11. Halos de inhibición de los antibióticos contra las cepas AHPND+. Letras distintas hay diferencias significativas ($P < 0.05$).

El antibiótico FLD (florfenicol) fue el que presentó mayores halos de inhibición ante todos los antibióticos evaluados (figura 11), puede usarse como método preventivo ante una vibriosis en el cultivo de camarón, pero es necesario realizar un protocolo de muestreo bacteriológico de agua y camarón para ver la carga bacteriana del estanque y aplicar el antibiótico para reducir las bacterias que están proliferando, y se puede utilizar de manera correctiva cuando el problema ya está presente en el estanque (vibriosis). El antibiótico OXD (oxitetraciclina) es muy utilizado en los cultivos de camarón, se utiliza para el tratamiento de NHP-B (Frelier *et al.*, 1992). Las cepas de Vph AHPND+ de este estudio el 73% presenta sensibilidad intermedia, el uso indiscriminado de oxitetraciclina o tetraciclinas en los cultivos de camarón para prevenir NHP-B y otras cepas de *Vibrio* ha causado que presenten resistencia ante el antibiótico (Bermúdez-Almada *et al.*, 2014)

8.4 Bioensayo con nutracéuticos

Los resultados del bioensayo de los parámetros inmunológicos para la dieta control, y las dietas con el alga *Ecklonia arborea* (harina del alga al 2% y fucoidan al 2g/Kg) se describen a continuación.

8.4.1 Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos de temperatura (32 ± 2 °C), pH (8.0 ± 0.2) y salinidad (35 ± 2 g/L) se mantuvieron dentro de los intervalos óptimos propuestos por Brock y Main (1994). El oxígeno disuelto se mantuvo constante por el sistema air lift que cuenta la sala de bioensayos.

8.4.2 Conteo diferencial y total de hemocitos

8.4.2.1 Conteo diferencial de hemocitos

Se realizó un conteo diferencial de hemocitos, y se calcularon por separado los hialinos, semigranulares y granulares. Después de analizarlos por separado se realizó el conteo total de hemocitos, siendo la sumatoria de los tres tipos.

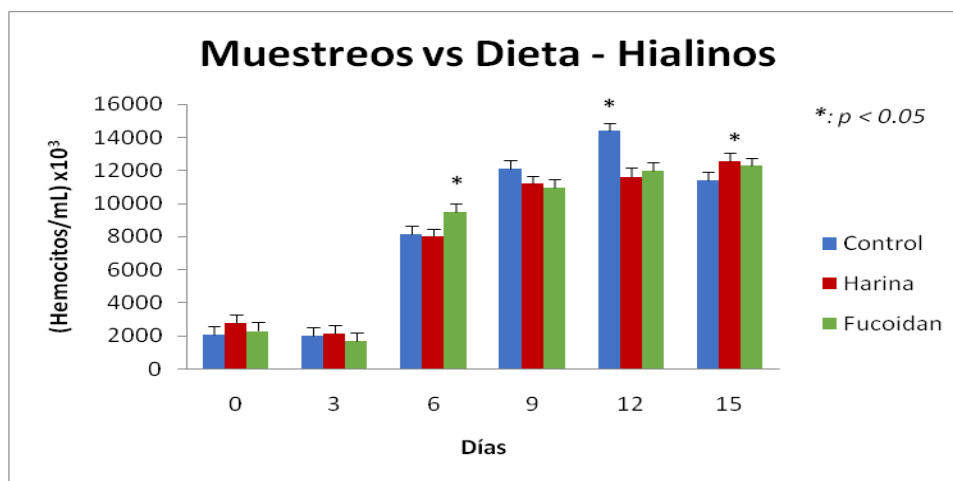


Figura 12. Conteo de hemocitos hialinos (H). * representa diferencia significativa.

Los dos primeros muestreos (día 0 y 3) no se tienen diferencias entre las cantidades de hemocitos hialinos por dieta, en el día 6 la dieta con fucoidan (9.5×10^6 hemocitos mL⁻¹)

presenta un aumento significativo de hialinos con respecto al control y a la dieta con harina. Al día 12 el tratamiento control tiene mayor concentración significativamente de hemocitos H (14.4×10^6 hemocitos mL^{-1}) que la dieta con harina (11.2×10^6 hemocitos mL^{-1}) y fucoidan (12×10^6 hemocitos mL^{-1}). Finalmente, en el día 15 se observa un aumento significativo de los hemocitos hialinos en la dieta con harina de *Ecklonia arborea* con una concentración de 12.6×10^6 hemocitos mL^{-1} (figura 12).

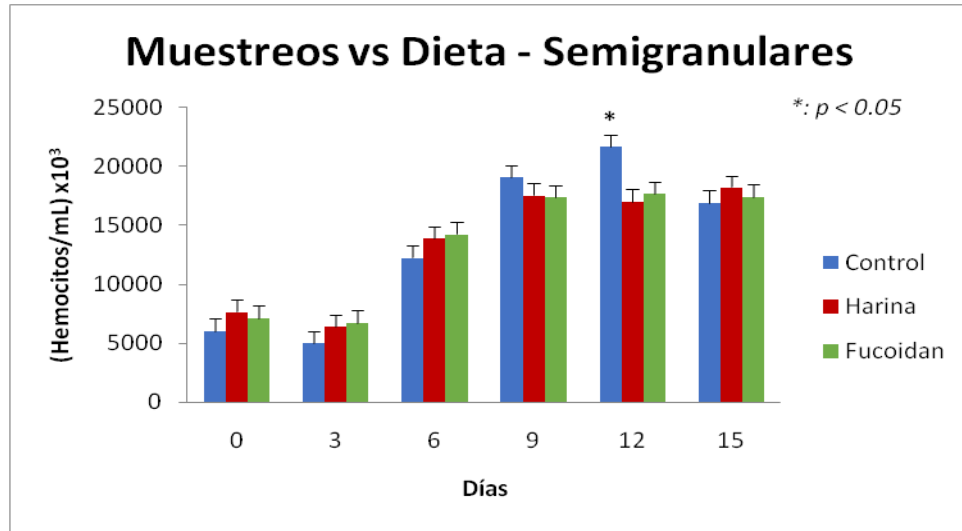


Figura 13. Conteo de hemocitos semigranulosos (SG) de las dietas evaluadas por muestreo. * representa diferencia significativa.

El conteo de hemocitos semigranulares en los días 0, 3 y 6 se observa una mayor concentración de células en los tratamientos con *Ecklonia arborea* (Harina y fucoidan), en los días 9 y 12 el tratamiento control es mayor que los tratamientos de *E. arborea*, teniendo diferencia significativa en la concentración de células SG (14.4×10^6 hemocitos mL^{-1}) en el día 12 para la dieta control. El último día de muestreo (día 15) las dietas con el alga presentan una mayor concentración de SG, pero sin tener significancia entre las dietas (figura 13).

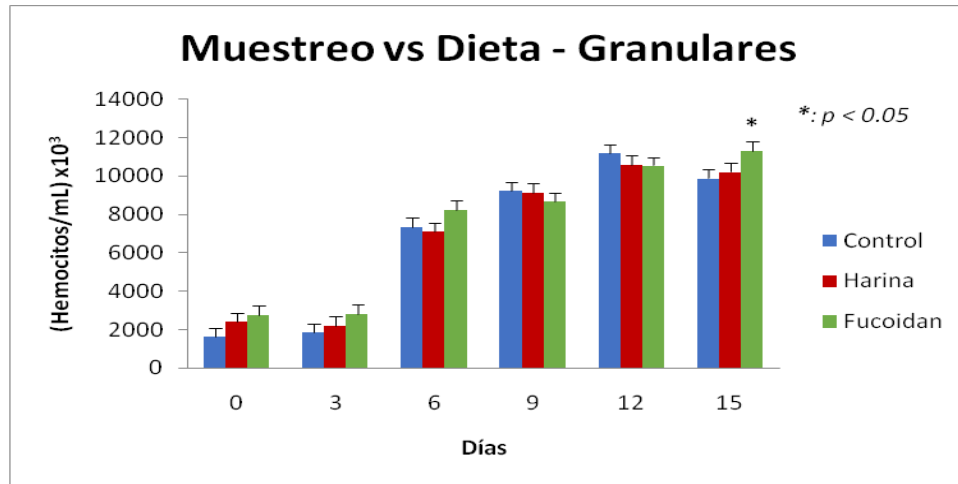


Figura 14. Conteo de hemocitos granulados (G)* representa diferencia significativa.

En los primeros 6 días se observa que la dieta con fucoïdan tiene mayor concentración de hemocitos granulados, siguiendo la dieta con harina del alga y después la dieta control, en los días 9 y 12 la dieta control supera por poco a las dietas de harina y fucoïdan. Al día 15 de la prueba, las dietas con el alga presentan más concentración de hemocitos G, siendo la dieta con fucoïdan la más alta significativamente (figura 14).

8.4.2.2 Conteo Total de Hemocitos

El conteo total de hemocitos de los camarones alimentados durante 15 días con las dietas a evaluar se muestra en la figura 15. Se analizaron el CTH por cada día de muestreo entre los tratamientos.

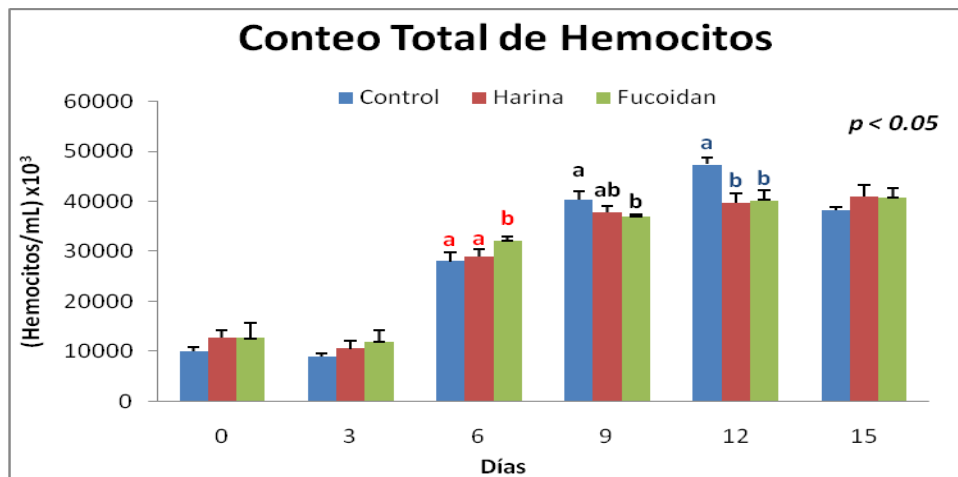


Figura 15. Conteo total de hemocitos por tratamiento. Letra distinta presenta diferencia significativa.

En la figura 15 se muestra los conteos totales por dieta en cada día de muestreo, al inicio los tratamientos que tienen harina y fucoïdan están más alto que la dieta control; sin embargo, no representa nada ya que en ese tiempo inicial no se les había alimentado a los camarones ningún tratamiento. El día tres ya contaban con 72 horas de alimentación los camarones, los tratamientos con harina y fucoïdan de *E. arborea* presentan un leve aumento (no significativo) en el CTH con respecto al control. Al día 6 se observa que el tratamiento con fucoïdan tiene mayor concentración (32×10^6 hemocitos mL^{-1}) que el tratamiento control y el tratamiento con harina del alga. A partir del día 9 al 12 el tratamiento control tiene diferencias significativas con respecto a las dietas de harina y fucoïdan. El último día de muestreo y se observa que el alimento control está por debajo de los conteos de hemocitos de las dietas con el alga (harina y fucoïdan)

8.4.3 Fenoloxidasa Libre y Fenoloxidasa Total

Los resultados de FOL y FOT se muestran en las figuras 16 y 17 respectivamente.

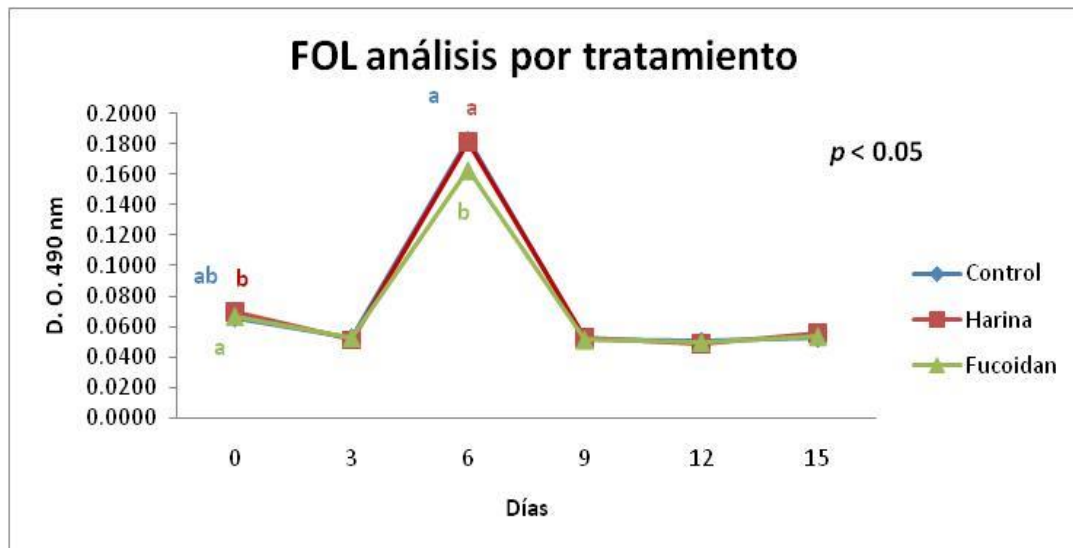


Figura 16. Fenoloxidasa libre. Letra distinta presenta diferencia significativa.

La fenoloxidasa libre al inicio día cero, se tiene diferencia una mínima diferencia sin embargo lo suficiente para ser significativa, al da seis se observa que la dieta con fucoïdan es menor a las dietas control y harina. Todos los días posteriores presentan valores casi iguales entre los distintos tratamientos.

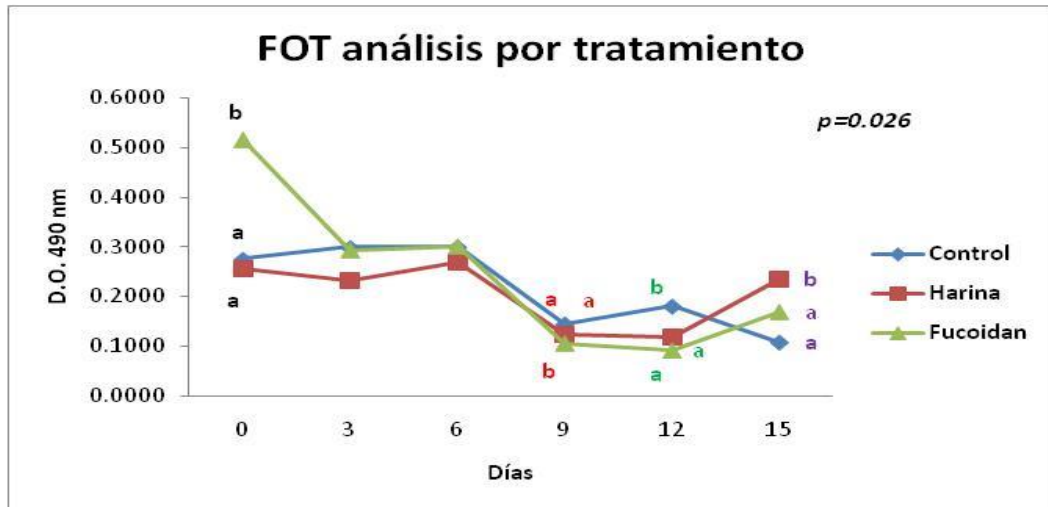


Figura 17. Conteo total de hemocitos por tratamiento. Letra distinta presenta diferencia significativa.

Los resultados de FOT en el día cero se observa como el tratamiento con fucoïdan presenta diferencias significativas con respecto a la dieta de harina y al control, estos valores solo se toman como base ya que aún no se alimentaban con las dietas a evaluar. Al día tres de alimentación se observa que la dieta con harina de alga está por debajo de la dieta control y la de fucoïdan, para el día 6 se mantiene la dieta control y el fucoïdan similares, incrementando un poco la dieta con harina. Hay una disminución en los valores de FOT para las dietas, el alimento con fucoïdan presenta valores por debajo de la dieta con harina y la dieta control. Al día 12 la dieta control tenía valores significativos con respecto a los alimentos con aditivos, al día 15 la dieta control disminuyó por debajo de las dietas con fucoïdan y la de harina del alga, siendo este último el que presento diferencias significativas para ese día de muestreo.

8.4.4 Estallido respiratorio (ER)

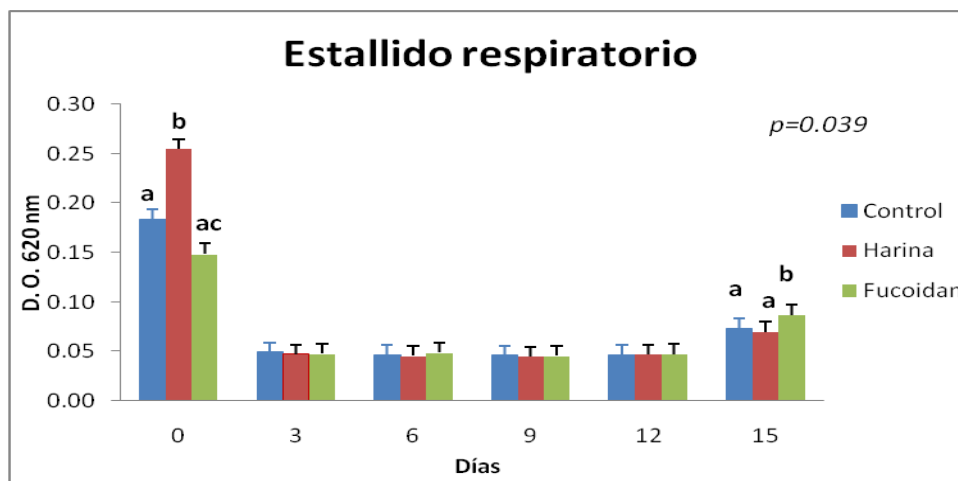


Figura 18. Estallido respiratorio (ER). Letra distinta presenta diferencia significativa

En el muestreo inicial se presentan los mayores valores de ER, es significativamente diferente la dieta con harina de alga con respecto a el control y al fucoïdan, durante los siguientes 12 días ninguna dieta presentó diferencias entre ellas, se mantuvieron similares hasta el día 15, en el cual incrementan un poco DO a 620 nm, siendo la dieta con fucoïdan el más elevado entre el control y la dieta con harina de alga (figura 18).

Los parámetros inmunológicos como conteo de hemocitos de hialinos, semigranulares y granulares, conteo total de hemocitos, fenoloxidasa total y fenoloxidasa libre se ven en aumento al día seis de muestreo para la dieta con fucoïdan, seguido por la dieta con harina del alga y después el control. A partir del día nueve se observa que hay una etapa de estancamiento para las dietas con harina del alga o el fucoïdan. Los hemocitos hialinos se encargan de liberar la transglutaminasa, que se liberan al plasma por daño tisular ante la presencia de lipopolisacáridos y β -1-3-glucanos (Yeh *et al.*, 1998)

El aumento de las células granulares en los hemocitos, eleva la actividad de la fenoloxidasa total, esto se debe a que en los gránulos de los hemocitos se encuentran las enzimas que se encargan de provocar la activación del sistema de profenoloxidasa (proPO) (Chen *et al.*, 2005). Kitikiew *et al.* (2013) alimentaron camarones durante 7 días observándose que se incrementaron los conteos de hemocitos, pero a mayor concentración de fucoïdan disminuye la eficiencia de la respuesta inmune innata.

Concluyen que la dosis de fucoidan que mejor da rendimientos en los parámetros inmunológicos es de 1.0 g/Kg de fucoidan en la dieta.

En el caso de la dieta con la harina de alga *E. arboreal* los valores de CTH, FOT fueron muy similares a los obtenidos por el fucoidan, no presentó diferencias significativas en CTH, pero si tiene diferencias en al día 15 para la fenoloxidasa. Felix *et al.* (2004) evaluaron la macroalga *Sargassum wightii* en polvo en alimento para camarón la cual funcionó como inmunoestimulante incrementando la fenoloxidasa, la concentración evaluada fue de 10 g/Kg.

Algunas metodologías reportadas para evaluar inmunoestimulantes con resultados más rápidos y notables, son al agregar el producto directo al agua o por inmersión a los camarones de estudio. Campa-Córdova *et al.* (2010), evaluaron distintos inmunoestimulantes β -1-3-glucanos y polisacárido sulfatado, después de una hora de exponer camarones con los aditivos, se generó su máxima respuesta de estallido respiratorio.

La cantidad de hemocitos circulantes puede ser afectada por factores externos como la temperatura, pH, salinidad, oxígeno disuelto y amonio (Liu y Chen, 2004). Le Moullac y Haffner (2000) expusieron camarones *L. stylirostris* en un ambiente de amonio 1.5 y 3.0 mg/L, con lo cual se incrementaba la actividad fenoloxidasa y disminuía el conteo total de hemocitos.

9. CONCLUSIÓN

Se aislaron e identificaron 18 cepas positivas de *Vibrio parahaemolyticus* causante de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda causante de las mortalidades de camarón en Sonora en los ciclos de producción 2013 y 2014.

Se encontraron 8 biotipos de Vph AHPND+ por el método de GTG₅. Los antibióticos FLD, EBD, AFX, MGX presentan buena inhibición ante EMS/AHPND. La OXD presenta valores intermedios de inhibición, y no se recomienda el uso de TX.

La región de 16S rDNA de las 17 cepas aisladas AHPND+ están emparentadas con las cepas asiáticas (3) y las de Sonora (2) y Sinaloa (1) reportadas en el GenBank/NCBI.

Se confirma el agente causal de las mortalidades de camarón, mediante la caracterización bioquímica y genómica.

Las secuencias del 16S rDNA se encuentran disponibles en línea en el Gen Bank

El Fucoïdan de *Ecklonia arborea* en el alimento (2 g/Kg), promueve el aumento de los hemocitos hialinos y granulados a los días 6 y 15 de alimentación. Al día 15 de alimentación presenta mayor CTH para las dietas que contienen *E. arborea* (Harina y fucoïdan), incrementa la fenoloxidasa total y estallido respiratorio.

10. PERSPECTIVAS

Realizar desafíos con las cepas positivas para AHPND y realizar análisis histológicos de los camarones infectados para ver la mortalidad y el daño ocasionado en el hepatopáncreas.

Se incrementaron los parámetros inmunológicos en los tratamientos con *E. arborea* al día 15 de alimentación. Se recomienda evaluar más concentraciones del extracto en la dieta (0.5, 1.0 y 2.5 g/Kg) y realizar desafíos con patógenos para medir la sobrevivencia en camarones previamente inmunoestimulados.

Seguir con trabajos con nutraceuticos para reforzar el sistema inmune del camarón para protegerlo de los patógenos comunes que se presentan en los cultivos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ali. M. Y., Hossain. M. B., Shamsuddin. M. 2012. Microbiological Status in a Fully Export-Oriented Shrimp Processing Plant. *World Applied Sciences Journal*. 16 (7): 903-906.
- ATCC (American Type Culture Collection). 2013. ATCC® Bacterial Culture Guide. Tips and Techniques for Culturing bacteria and bacteriophages. Manassas. Virginia. USA. Pp. 18 – 20.
- Azad. I.S., Panigrahi.A., Gopal. C., Paulpandi. S., Mahima. C., Ravichandran. P. 2005. Routes of immunostimulation vis-a-vis survival and growth of *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquaculture*, 248: 227–234.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., De Lorgeril, J., Garnier, J. Romestand, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassos treagigas*. *Immunological Reviews*, 198: 149–168.
- Bej, A. K., Patterson, D. P., Brasher, C. W., Vickery, M. C. L. Jones, D. D., Kaysner, C. A. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 36, 3: 215-225.
- Bermúdez-Almada, M. C., Espinosa-Plascencia, A., Santiago-Hernández, M. L., Barajas-Borgo, C. J., Acedo-Félix, E. 2014. Comportamiento de oxitetraciclina en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y la sensibilidad a tres antibióticos de bacterias de *Vibrio* aisladas de los organismos. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. : Biotecnia / XVI (3): 29-37.
- Bilan. M. I., Grachev. A. A., Ustuzhanina. N. E., Shashkov. A. S., Nifantiev N. E., Usov. A. I. 2002. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohydrate Research*. 337: 719 – 730.

- Bilan. M. I., Grachev. A. A., Shashkov. A. S., Nifantiev N. E., Usov. A. I. 2006. Structure of a fucoidan from the Brown seaweed *Fucus serratus* L. Carbohydrate Research.341: 238 – 245.
- Brock. J., Main. K.L. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 242 pp.
- Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., De Philippis.R., Ascencio, F. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. Fish and Shellfish Immunology 12: 353 – 366.
- Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., Aguirre-Guzmán, G., Ascencio, F. 2005. Immunomodulatory response of superoxide dismutase in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to immunostimulants. Ciencias Marinas 31 (4): 661–669.
- Campa-Córdova, A.*et al.* 2010. Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 567-587.
- Cheng W, Liu CH, Kuo CM, Chen JC. 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology;18:1e12.
- Chotigeat.W., Tongsupa.S., Supamataya. K., Phongdara. A. 2004. Effect of Fucoidan on Disease Resistance of Black Tiger Shrimp.Aquaculture.233: 23 – 30.

Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang, H.C., Lo, C.F., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 23: 165–173.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2005a Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Proposed Guideline. CLSI document M42-P [ISBN 1-56238-576-3]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2005b Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Proposed Guideline. CLSI document M49-P [ISBN 1-56238-577-1]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA

Corsin, F., y Briggs, M. 2012. Epidemiology and risk factor. In: NACA, 2012. Report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: early mortality syndrome (EMS)/ acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS), 9-10 Aug 2012. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand. August 2012, pp. 17 – 18.

COSAES (Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora, A.C.) 2011. Informe final sanidad camarón 2011: programa de trabajo de sanidad acuícola del programa de soporte para camarón. [En línea] Disponible en: <http://www.cosaes.com>

COSAES (Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora, A.C.) 2012. Informe final sanidad camarón 2012: programa de trabajo de sanidad acuícola del programa de soporte para camarón. [En línea] Disponible en: <http://www.cosaes.com>.

Costa, R. A., Giselle C., Silva, G.C., Peixoto, J.R.O., Vieira, G.H.F., Vieira, R.H.S.F. 2010. Quantification And Distribution Of Vibrio Species In Water From An Estuary In Ceará-Brazil Impacted By Shrimp Farming. *Brazilian Journal of Oceanography.* 58(3):183-188.

- Deachamag. P., Intaraphad. U., Phongdara. A., Chotigeat. W. 2006. Expression of a Phagocytosis Activating Protein (PAP) gene in immunized black tiger shrimp. *Aquaculture* 255: 165 – 172.
- Di Pinto. A., Terio. V., Novello. L., Tantillo. G. 2011. Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar Vibrio for isolating *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*. 22 (1): 124-127.
- Doñate. C., Balasch. J.C., Callol. A., Bobe. J., Tort. L., MacKenzie. S. 2010. The effects of immunostimulation through dietary manipulation in the rainbow trout; evaluation of mucosal immunity. *Mar.Biotechnol.*, 12: 88–99.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2011).Aquaculture topics and activities.Acuicultura. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Producción mundial de acuicultura de peces, crustáceos, moluscos, etc., por productores principales en 2011.[En línea].Disponible en: ftp://ftp.fao.org/FI/CDrom/CD_yearbook_2011/root/aquaculture/a6.pdf
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2013a: Culprit behind massive shrimp die-offs in Asia unmasked. [En línea]Disponible en: www.fao.org/news/story/en/item/175416/icode/
- FAO(Food and Agriculture Organization of the United Nations).2013b. Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304).Hanoi, Viet Nam, on 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053. Rome. 54 pp.
- Felix S., Robins, P. H., Rajeev, A. 2004. Immune enhancement assessment of dietary incorporated marine alga *Sargassum wightii* (Phaeophyceae/Punctariales) in tiger shrimp *Penaeus monodon* (Crustacia/Penaeidae) through prophenoloxidase (proPO) systems. *Indian Journal of Marine Sciences*. Vol. 33(4), 361-364.

- Flegel, T.W., Lightner, D.V., Lo, C.F. and Owens, L. 2008. Shrimp disease control: past, present and future, pp. 355-378. In Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 505 pp.
- Flegel, T. W. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia, *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2): 166-173
- Flegel T., Loh C.F., Vatanakul U. 2013. Researchs release free information on AHPND Detecion. Shrimp News International. [En línea] Disponible en: <http://www.shrimpnews.com/FreeReportsFolder/NewsReportsFolder/ThailandTaiwanFreeEMStests.html>
- Flores-Miranda, M. C., Luna-González, A., Campa-Córdova, Á. I., González-Ocampo, H. A., Fierro-Coronado, J. A., Partida-Arangure, B. O. 2011. Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains, *Aquaculture*, 320(1–2): 51-55.
- Freitas.A.C., Rodrigues.D., Rocha-Santos. T.A.P., Gomes, A.M.P., Duarte.A.C. 2012. Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods *Biotechnology Advances*, 30 (6): 1506–1515.
- Frelie P. F., Loy, J. K., Bell, T. A. 1992. Treatment of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *Proc. Int. Coloq. Pathol. Mar Aquaculture*. 5:30
- García-Juárez, A. R., Rodríguez-Dominguez, G., Lluch-Cota, D. B. 2009. La cuota de captura de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) como instrumento de gestión en el Alto Golfo de California. *Ciencias Marinas*, 35(3): 297–306.
- Global Aquaculture Alliance (GAA). 2013: Cause of EMS shrimp disease identified. [En línea] Disponible en: www.gaalliance.org/newsroom/news.php?Cause-Of-EMS-Shrimp-Disease-Identified-107.
- Gollas-Galván, T., Sotelo-Mundo, R. R., Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Requena, C., & Vargas-Albores, F. 2003. Purification and characterization of alpha 2-macroglobulin

- from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP, 134(4), 431–438. [http://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00002-4](http://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00002-4)
- Gómez-Gil, B., Tron-Mayén, L., Roque, A., Turnbull, J. F., Inglis, V., Guerra-Flores, A. L. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*, Aquaculture. 163(1–2): 1-9.
- Gomez-Gil B., Soto-Rodríguez.S., Lozanor.R., Betancourt-Lozano. M. 2014. Draft Genome Sequence of *Vibrio parahaemolyticus* Strain M0605, Which Causes Severe Mortalities of Shrimps in Mexico. Genome Announc, March/April 6;2(2)
- Gomez-Jimenez S, Noriega-Orozco L, Sotelo-Mundo R. R, Cantu-Robles V. A, Cobian-Guemes A. G, Cota-Verdugo R. G, Gamez-Alejo L. A, del Pozo-Yauner L, Guevara-Hernandez E, Garcia-Orozco K. D, Lopez-Zavala A. A, Ochoa-Leyva A. 2014. High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. Genome Announc. 2(4):e00800-14. doi:10.1128/genomeA.00800-14.
- Hayashi. K., Nakano. T., Hashimoto.M., Kanekiyo. K., Hayashi. T. 2008. Defensive effects of a fucoidan from Brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection. International Immunopharmacology. 8: 109 – 116.
- Hernández-López. J., Gollas-Galván. T., Vargas-Albores. F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). Comp Biochem Physiol. 133(1): 61-66. [http://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00002-4](http://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00002-4)
- Hoang-Oanh, D. T., Quoc-Phu. T., Thanh-Phuong. N., Anh-Tuan. P. 2013. Ongoing Vietnam Studies Find *Vibrio* With Phage Transmits EMS/AHPNS. Global Aquaculture Advocate (July/August 2013).pp. 23 – 23.

- Hsieh, Shu-Ling., Wub.Chih-Chung., Liuc.Chun-Hung., Lian.Juang-Lin. 2013. Effects of the water extract of *Gynura bicolor* (Roxb. & Willd.) DC on physiological and immune responses to *Vibrio alginolyticus* infection in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*. 35(1): 18–25.
- Hugenholtz. J., Smid. E.J. 2002. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (5): 497–507.
- Huang, X., Zhou.H., Zhang. H. 2006. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*. 20: 750-757.
- Hung-Hung, Sung., Hai-Ching, Li., Fu-Ming, Tsai., Yun-Yuan, Ting., Wei-Liang Chao. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 236 (2): 261 – 271.
- Immanuel. G., Sivagnanavelmurugan. M., Marudhupandi.T., Radhakrishnan S., Palavesam A. 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish & Shellfish Immunology*. 32: 551 – 564.
- Joshi. J., Srisala. J., Truong. V. H., Chen. I.T., Nuangsaeng. B., Suthienkul. O., Lo. Ch. F., Flejel. T. W., Sritunyalucksana. K., Thitamadee. S. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*. 428-429: 297-302.
- Kalra. E.K. 2003. Nutraceutical-definition and introduction. *The AAPS Journal*. 5 (3): 27–28.

- Kathleen, M. M., Samuel, L., Felecia, C., Ng K. H., Lesley, M. B. and Kasing, A. 2014.(GTG)₅-PCR analysis and 16S rRNA sequencing of bacteria from Sarawak aquaculture environment. *International Food Research Journal* 21(3): 915-920.
- Kim. Kyung-Tae., Rioux.Laurie-Eve., Turgeon. S. L. 2014. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*. 98: 27 – 33.
- Kitikiew, S., Chen, J. C., Putra, D. F., Lin, Y. C., Yeh, S. T., Liou, C. H. 2013. Fucoidan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 34 (2013) 280e290.
- Le Moullac G, Haffner P. 2000. Environmental factors affecting immune response in Crustacea. *Aquaculture*;191:121–31.
- Lightner, D.V. 1996.A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp.World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Lightner. D. V., Redman. R. M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. 164: 201-220.
- Lightner, D. V. 2011.Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (The Americas).*Journal of Invertebrate Pathology*. 106 (1): 110 – 130.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Noble, B.L. Tran, L. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp In Asia. *Global Aquaculture Advocate* (January/February 2012) pp 40.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. L. Nunan.L. M., Tran, L. 2013.Documentation of an Emerging Disease (Early Mortality Syndrome) in SE Asia y Mexico. In: “Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (APHNS) of Cultured Shrimp” FAO and Vietnam’s Ministry of Agriculture and Rural Development from 25-27 June 2013, Prestige Hotel, Hanoi, Viet Nam.

- Lightner. D. V., Redman.R. M., Pantoja.C. R., Noble.B. L., Nunan L. M., Tran. L., Gomez. S. 2013. Development of a PCR Diagnostic Test for EMS.The Global Aquaculture Alliance (GAA)'s GOAL 2013.Paris. France. October 7 – 10. [En línea] Disponible en: <http://www.gaalliance.org/cmsAdmin/uploads/goal13-lightner2.pdf>
- Limsuwan. Ch., y Briggs. M. 2012. Epidemiology and risk factor. In: NACA, 2012. Report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: early mortality syndrome (EMS)/ acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS), 9-10 Aug 2012.Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand. August 2012.pp. 18 – 20.
- Limsuwan. Ch., Churchird, N., Munkong. N., Ching. C. A. 2014. Hepatopancreas Colors Related To Vibrios Predict Survival Of Shrimp To EMS. Global Aquaculture Advocate. (January/February 2014) pp. 15 – 16.
- Liu, C. H., & Chen, J. C. (2004). Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology, 16(3), 321–334. [http://doi.org/10.1016/S1050-4648\(03\)00113-X](http://doi.org/10.1016/S1050-4648(03)00113-X)
- Loker, E. S., Adema, C. M., Zhang, S. M. and Kepler, T. B. (2004). Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. Immunological Reviews.198: 10–24.
- Manilal. A., Selvin. J., George. S. 2012. In vivo therapeutic potentiality of red seaweed, *Asparagopsis (Bonnemaisoniales, Rhodophyta)* in the treatment of Vibriosis in *Penaeus monodon* Fabricius. Saudi Journal of Biological Sciences.19 (2): 165-175.
- Martínez, C. L., Martínez, P. M., Cortés, J. E. 2009. Camaronicultura mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante? Rev. Int. Contam. Ambient. 25 (3): 181-196.

- Matsheka, M. I., Lastovica, A. J., Zappe, H., Elisha, B. G. 2005. The use of (GTG)₅ oligonucleotide as an RAPD primer to type *Campylobacter concisus*. *Letters in Applied Microbiology* 42: 600-605.
- Moreno-Herrera. J. T. 2012. Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. Instituto Politécnico Nacional. Guasave, Sinaloa, México.
- Moroney. N. C., O'Grady. M. N., O'Doherty. J. V., Kerry. J. P. 2012. Addition of seaweed (*Laminariadigitata*) extracts containing laminarin and fucoidan to porcine diets: Influence on the quality and shelf-life of fresh pork. *Meat Science*. 92: 426 – 429.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-230-SSA1-2002.Saludambiental. Agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. [En línea] Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/230ssa102.html>
- NACA, 2012. Report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease:early mortality syndrome (EMS)/ acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS), 9-10 Aug 2012.Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand. August 2012.
- Nikolik Gorjan. 2013. EMS Impacts: Disease Shifts Shrimp Supplies, Prices, Future Production. *Global Aquaculture Advocate* (September/October 2013). pp. 24 – 26.
- Organización Mundial de Salud Animal. 2013. Capitulo 1.4 Vigilancia de la Sanidad de los Organismos Acuáticos. Código Sanitario para los Animales Acuáticos. [En línea]Disponible en: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-acuatico/acceso-en-linea/>

- Pérez-Muñoz. A. 2013. Avances en la Investigación en México Sobre la Mortalidad Atípica. Retos del Sector ante el síndrome de la muerte temprana. 3a. Mesa de Análisis sobre camaronicultura. Diciembre 2013, Ciudad Obregón, Sonora, México.
- Rendon, L., Blacázar, J. L. 2003. Inmunología de camarones: conceptos básicos y recientes avances. Revista AquaTIC. n° 19.pp. 27-33.
- Roque, A., Turnbull, J.F., Escalante, G., Gomez-Gil, B., Alday-Sanz, M.V. 1998. Development of a bath challenge for the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931, Aquaculture, Volume 169, Issues 3–4, Pages 283-290, ISSN 0044-8486.
- Rorstad. G., Aasjord. P.M., Robertsen. B. 1993. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmosalar L.*).Fish and Shellfish Immunology, 3(3): 179–190.
- SAGARPA/CONAPESCA, 2009.Historial de prensa 2009, Octubre, México, D.F. [En línea] Disponible en: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/05_de_octubre_de_2009_mexico_df
- SAGARPA-CONAPESCA, 2010.Historial de prensa 2010, Septiembre, Hermosillo.[En línea] Disponible en: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/10_de_septiembre_de_2010_hermosillo_son
- SAGARPA-CONAPESCA.2012. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. [En Línea] Disponible en:http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2012_zip
- SAGARPA-CONAPESCA.2013. Seguimiento Mensual de la Producción de Camarón Enero – Junio (2013/p). [En línea] Disponible en: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/seguimiento_mensual_de_la_produccion_de_camaron_20

- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425. EGA 7
- Sanchez-Díaz, R., Salguero-González, M. A., Muñoz-Báez, L. M., Martínez-Aragón, R. A., Rodríguez-Rivas, E. G., Quiroz-Macías, M. E., Ibarra-Gámez, J. C. 2016. Perfil de susceptibilidad a tres antibióticos en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND) aisladas de cultivos de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en Sonora, México, durante el ciclo 2016. In LACQUA - SARA 2016 - Meeting Abstract. Retrieved 02 January 2017 from <https://www.was.org/meetings/ShowAbstract.aspx?Id=44655>.
- Selvin, J., Manilal, A., Sujith, S., SeghalKiran, G., Premnath Lipton, A., Kiran, G. S., & Lipton, A. P. 2011. Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 39(2):197–204.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2013. Mortalidades atípicas en camarón de cultivo en la región Noroeste de México: Estatus, Acciones y Perspectivas. Retos del Sector ante el síndrome de la muerte temprana. 3a. Mesa de Análisis sobre camaronicultura. Diciembre 2013, Ciudad Obregón, Sonora, México.
- Senthilkumara. K., Manivasagana. P., Venkatesana. J., Kim. S.K. 2013. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*.60: 366 – 374.
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., *et al.* 2015. Characterization and PCR Detection Of Binary, Pir-Like Toxins from *Vibrio parahaemolyticus* Isolates that Cause Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Shrimp. *PLoS ONE* 10(5): e0126987. doi:10.1371/journal.pone.0126987

- Song, Y.L., Cheng, W., Wang, C.H., 1993. Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infections for cultured shrimp in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology*. 61(1): 24–31.
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano, R. 2010. Density of *Vibrios* in Hemolymph and Hepatopancreas of Diseased Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Northwestern Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society*. 41 (1): 76-83.
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., & Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and Experimental Evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Cultured Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1689–1699. <http://doi.org/10.1128/AEM.03610-14>
- Steiner, H. 2004. Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunological Reviews*. 198 (1): 83–96.
- Suwaree K, Jiann-Chu C, Dedi F. P., Yong-Chin L., Su-Tuen Y., Chyng-Hwa L. 2013. Fucoidan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection, *Fish & Shellfish Immunology*. 34(1): 280-290.
- Takahashi. Y., Uehara. K., Watanabe. R., Okumura. T., Yamashita. T., Omura. H., Yomo. T., Kawano. T., Kanemitsu. A., Narasaka. H., Suzuki. N., Itami. T. 1998. Efficacy of oral administration of fucoidan, a sulfated polysaccharide, in controlling white spot syndrome in kuruma shrimp in Japan. In Flegel TW (ed) *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Tayag, C. M., Yong-Chin L., Chang-Che L., Chyng-Hwa L., Jiann-Chu C. 2010. Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune

- response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 28(5–6): 764-773.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohney, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K., Lightner, D.V. 2013a. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*.105: 45-55.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Lightner, D. V., Fitzsimmons, K. 2013b. EMS/AHPNS: Infectious Disease Caused By Bacteria. *Global Aquaculture Advocate* (July/August 2013).pp.18 - 20.
- Truong-Giang, H., Su-Thuen, Y., Yong-Chin, L., Jeng-Feng, S., Li-Li, Ch., Jiann-Chu, Ch. 2011. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*. 31 (2): 286-293.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, M.A., Ochoa, J.L., 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of *Penaeid shrimp* (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry Physiology Part A*. 106 (2): 299–303.
- Vargas, A. F. 2009. Genómica funcional en el estudio del sistema inmune del camarón. Resumen VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco, Guerrero, México.
- Versalovic, J., Schneider, M., Bruijn, F. J., Lupski, J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacterial using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology* 5:25-40.
- Yang Y-T, Chen I-T, Lee C-T, Chen C-Y, Lin S-S, Hor L-I, Tseng T-C, Huang Y-T, Sritunyalucksana K, Thitamadee S, Wang H-C, Lo C-F. 2014. Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early

mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.* 2(5):e00816-14. doi:10.1128/genomeA.00816-14.

Yano.Y., Hamano. K., Satomi. M., Tsutsui. I., Ban. M., Aueumneoy. D. 2014. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. *Food Control.* 38: 30-36.

Yeh, M. S., Y. L. Chen & I. H. Tsia. 1998. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. *Comp.Biochem. Phys. B*, 121B: 169-176.

Yeh. Su-Tuen., Lee. Chiu-Sha. Lee., Chen. Jiann-Chu. 2005. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology.*20: 332 – 345.

Yu.P., y Sun. H. 2014. Purification of a fucoidan from kelp polysaccharide and its inhibitory kinetics for tyrosinase. *Carbohydrate Polymers.* 99: 278 – 283.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Ariel Robles Valdez

Candidato para el Grado de

**Doctor en Ciencias con Acentuación en Nutrición y Tecnología en
Alimentos para Organismos Acuáticos**

Tesis: CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LAS MORTALIDADES ATÍPICAS EN CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EN SONORA, CICLOS 2013 - 2014 Y EVALUACIÓN DE NUTRACÉUTICOS A BASE DE EXTRACTOS FITOGÉNICOS EN ALIMENTOS PARA REFORZAR LA INMUNIDAD DEL CAMARÓN

Campo de Estudio: Sanidad y Nutrición Acuícola

**Datos Personales: Nacido en Ciudad Obregón, Sonora el 3 de Diciembre de 1986,
hijo de Joel Robles Valenzuela y Mirna Valdez Luque.**

Educación: Egresado del Instituto Tecnológico de Sonora, grado obtenido Ingeniero Biotecnólogo en 2011. Egresado del Instituto Tecnológico de Sonora, grado obtenido Maestro en Ciencias en Recursos Naturales en 2013 con mención honorífica.