



En este número:

Evaluación de la presencia del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en cultivos de camarones peneidos de Sonora y Sinaloa, México.
Marco Linné U. B.
Morales Chapa C.
Ricardo Mejía Ruiz
Claudio H. Ascencio V.
CIBNOR S.C.
PÁG. 1

Monitoreo Sanitario en Granjas Acuícolas de la República Mexicana
Lucío Galavíz Silva
UANL
PÁG. 1

Consideraciones para el Muestreo y Envío de Muestras de camarones peneidos a Laboratorios de Diagnóstico.
Marco Linné U. B.
CIBNOR S.C.
PÁG. 2

Como Enviar Muestras de Peces al Laboratorio.
César Ortega Santana
CIESA. FMVZ
UAEM
PÁG. 3

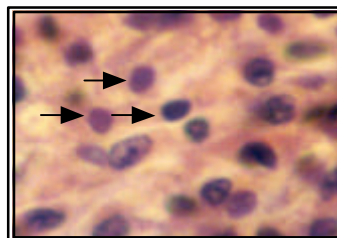
IV Foro de Truticultores.
Martha Rodríguez Gutiérrez.
UAM-X
PÁG. 8

Evaluación de la presencia del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en cultivos de camarones peneidos de Sonora y Sinaloa, México

Marco Linné U. B., Morales, C.C., Mejía, R. Ascencio, C. CIBNOR.

Los estudios sobre las enfermedades de los camarones de granja son recientes, por lo que en muchas de ellas se desconoce el agente causal. Según Lightner y col., (1985), existen 30 virus caracterizados, 4 de ellos (BP, IHNV, HPV y TSV) se les reconoce por tener impacto significativo en los laboratorios y granjas de camarón en América (Lightner, 1996a, 1996b). No obstante, existen otros dos virus (YHV y WSSV) cuyo impacto se está evaluando en América. El WSSV (White Spot Syndrome Virus) o "Mancha

Blanca" se describió primeramente en el noreste de Asia a principios de 1993, y rápidamente se observó su dis-



persión a otros países. En Enero de 1999, la presencia de WSSV fue detectado en muestras de tejidos de camarón de granja en tres paí-

ses centroamericanos: Nicaragua, Guatemala y Honduras. El primer reporte se realizó en Honduras, donde los organismos de cultivo mostraron signos de estrés, los cuales se consideran no comunes para el periodo de cultivo. La primera sintomatología observada fue similar a la asociada con el síndrome de Taura (TS) (Jory, 1999). No obstante, los síntomas reconocidos para WSSV son: letargia, anorexia, presencia de organismos moribundos nadando cerca de la superficie de los estanques. Los organismos presentaron posteriormente, coloración rosada a café rojizo por la expansión de los cromatóforos cuticulares además de la ra ampliar

(Continúa en la página 3)

Monitoreo Sanitario en Granjas Acuícolas de la República Mexicana

Lucío Galavíz Silva.

Centro Nacional de Sanidad Acuícola Universidad Autónoma de Nuevo León

Con el objeto de mejorar los servicios que brinda el Programa Nacional de Sanidad Acuícola (PNSA) a las granjas acuícolas del país, se ha planteado la necesidad de efectuar monitoreos periódicos (mensuales) y/o de ciclos productivos en las granjas seleccionadas de cada estado (Norte, Centro y Sur) por cada Institución participante del PNSA (UAM-X UAEM, UAT, CCS, CIBNOR, UNISON y UANL). La periodicidad de los muestreos permitirá el análisis completo de datos sanitarios que influyen en la salud de los organismos en condiciones

de cultivo, como es la calidad del agua (entrada, estanquería y drenes), sustrato de la estanquería, calidad de la semilla utilizada en la temporada, historial clínico, enfermedades presentes en los ciclos de cultivo actuales, patógenos potenciales (virus, bacterias, hongos, parásitos) y calidad del alimento (deficiencias nutricionales). Este procedimiento involucra la participación activa de los operadores de las granjas seleccionadas, quienes proporcionarán datos complementarios a los análisis como son

esquemas de las instalaciones, instalaciones vecinas que pueden influir en la calidad del medio acuático, procedencia de la semilla, etc. Estos datos se vertirán en formatos que serán aplicados al inicio del programa de monitoreo y en su caso, como son la calidad del agua como temperatura diaria y pH, dureza y oxígeno, de forma mensual. Así, se permitirá una estimación confiable y cuantitativa de la problemática sanitaria, coadyuvando a la previsión de posibles problemas y su control. *(Cont. en la pág 2)*

Monitoreo... (viene de la pág. 1)

De acuerdo a este marco de acción, y en vista de la mayor utilidad que ofrecerá este nuevo tipo de servicio, se evitará el recibir solamente muestras fijadas en soluciones químicas o hielo como anteriormente se hacía, debido a la limitada utilidad de los resultados que ofrecen para el acuicultor, pues se tiene la convicción que de la revisión de cortes histológicos y su apariencia "per se", no es posible determinar la fuente del problema así como su posible efecto o impacto en la producción. En cambio, los seguimientos periódicos ofrecen mayores alternativas de utilidad práctica no solo para el PNSA, sino también para el usuario del servicio.

Por estos motivos, se propone que el número de granjas sea seleccionado de acuerdo a la disponibilidad de participación de cada una de ellas, considerando también el de financiamiento y personal de parte del PNSA.

En cada uno de los casos se realizarán análisis de costos para programar el gasto del PNSA por granja y ciclo de cultivo, compro-

debido a que los recursos que recibe no son suficientes para cubrir las necesidades de todos los potenciales usuarios del servicio. Por la misma razón se plantea la participación económica de las granjas seleccionadas (de las interesadas) para asegurar el cumplimiento del monitoreo hasta la terminación del ciclo de cultivo. De esta manera se prevé la necesidad de efectuar las siguientes modificaciones en el PNSA:

I. Frecuencia del Monitoreo:

- a) La frecuencia de los monitoreos variará dependiendo de la duración del ciclo, tipo de cultivo y especie a cultivar.
- b) Basándose en un cultivo estándar de camarón, de 120 días, se programarán cinco visitas del personal del PNSA (siembra, primero al tercer mes y cosecha) para cubrir el ciclo total del cultivo desde la recepción de la semilla hasta la cosecha.
- c) Los resultados de los análisis serán confidenciales (excepto los que se encuentran enlistados como causantes de enfermedades certificables, de acuerdo al "International Aquatic Animal Health Code, OIE, 1999) y entregados perso-

ponsable de la granja en 5-6 días, transmitiéndose inmediatamente aquellos que sean de urgencia dado el carácter infeccioso de algunos microorganismos o virus detectados para iniciar las medidas de prevención y control respectivos.

- b) Al inscribirse al programa en caso de ser seleccionada la granja en cuestión, serán aplicados cuatro formatos de (1) datos generales, (2) historial clínico, (3) instalaciones actuales y en proyecto y (4) calidad del agua, situación de organismos por estanque e historia de cada estanque. Todos los datos recibidos por el PNSA serán confidenciales y de uso particular para el personal del PNSA para análisis de pronóstico de posibles situaciones de riesgo.

II. Análisis que serán cubiertos:

- a) Los estanques serán seleccionados al azar en caso de presentar buenas condiciones sanitarias ó bien, se realizará un análisis dirigido o intencional en el caso específico de estanques con organismos que presenten problemas de salud.

(Continúa el página 5)

Consideraciones para el Muestreo y Envío de Muestras de Camarones Peneidos a Laboratorios de Diagnóstico

c. Dr. Marco Linné Unzueta Bustamante
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

INTRODUCCIÓN

La patobiología acuática, representada por sus disciplinas de virología, bacteriología, micología, parasitología, histopatología y otras, está efectuando una fuerte y fructífera contribución para lograr un mayor conocimiento no sólo de la patología *sensu stricto* sino también de algo de igual importancia, a saber el diseño e implementación de programas de inspección y certificación carcinisantiaria de las especies de camarones producidas en forma comercial y rentable.

Para controlar la diseminación de enfermedades y epizootias en la acuicultura, es vital que se considere de máxima prioridad la puesta en marcha de métodos y técnicas que permitan un diagnóstico rápido de dichas enfermedades y cuando sea factible, el reconocimiento temprano de los posibles agentes etiológicos en la población y/o en el ambiente a utilizar para las operaciones de cultivo (Conroy y Conroy, 1990).

TIPOS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Los camarones peneidos se ven afectados por un gran número de agentes infecciosos, tales como virus, tipo

Rickettsias y posiblemente tipo chlamydias, bacterias Gram negativo, bacterias Gram positivo, hongos y protozoarios.

PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO DISPONIBLES

Con base en el tipo de diagnóstico a realizar y en la infraestructura y equipamiento que se cuenta se pueden describir los siguientes procedimientos de diagnóstico:

III. 1. Métodos clásicos

- > Historial: Lo que nos permite conocer el ambiente en el cual se

(continúa en la pág 5)

Evaluación ... (Viene de la Pág. 1)

presencia de inclusiones blancas embebidas en la cutícula de *Litopenaeus vannamei*, aunque en *L. stylirostris* no se observan en fresco. Finalmente, se presenta una rápida y elevada mortalidad, alcanzando tasas del 100% en 3 a 10 días después de los primeros signos clínicos (Jory, 1999). Por otro lado, aunque se han identificado en otras partes del mundo variantes no virulentas de WSSV, en México los estudios aún no son conclusivos. Afortunadamente, es posible la detección rápida y definitiva del WSSV antes de los primeros síntomas, mediante técnicas histológicas y de diagnóstico molecular como: PCR, Dot blot, e Hibridación *in situ* (Lo, *et. al.*, 1999; Jory, D.E., 1999).

Muestreo

En este estudio el análisis se realizó utilizando un "Muestreo no aleatorio", el cual dicta que en situaciones de enfermedad, donde los signos agudos no permiten la evaluación de la prevalencia, se deben seleccionar 10 organismos vivos que exhiban las señales clínicas típicas de la enfermedad en cuestión (Lightner, 1996a). En las granjas donde no se encontraron organismos con signos agudos, se colectaron 50 organismos y se sometieron a estrés de temperatura, alta densidad de población y oxígeno disuelto, seleccionándose 10 de los organismos que presentaron aletargamiento al tratamiento. Dicho muestreo se realizó, entre el 14 y 17 de julio de 1999, en tres granjas de cultivo de camarón en Sonora y en 6 granjas de Sinaloa.

Análisis histológico

En los organismos capturados se realizaron cortes, *in vivo*, a nivel de la parte media del primer somite abdominal, el cual se conservo en solución Davidson AFA en una proporción 1:10. Al cabo de 72 horas de fijación, se colocaron en solución de etanol 50% para su almacenamiento hasta ser procesadas. Siguiendo el procedimiento reportado por Bell y Lightner (1988), las muestras para microscopía de luz se procesaron mediante la infiltración de tejidos en parafina y teñidos con Hematoxilina y Eosina de Mayer, considerando:

1) disección y selección de tejidos, 2) deshidratación y embebido en parafina, 3) corte (3-5µm) con microtomo rotatorio y 4) tinción y montaje. El criterio para considerar una muestra positiva a la presencia de WSSV, fue si se presentaban cuerpos prominentes de inclusión eosinofílicos a basofílicos pálidos con tinción de hematoxilina y eosina. Adicionalmente, se consideraron Fulgen positivos los cuerpos de inclusión intranucleares en núcleos hipertrofiados de las células epiteliales cuticulares y en las células de tejido conectivo y menos frecuentemente en el epitelio de la glándula antenal, órgano linfoide, tejido hematopoyético y en fagocitos fijados en el corazón.

Análisis por Dot Blot (hibridación por inmoviliación)

La fijación de las muestras para Dot Blot, se realizó congelando con "hielo seco" parte del abdomen de cada uno de los organismos hasta su procesamiento. Una vez en el laboratorio se realizó el trabajo de hibridación por inmovilización (Dot Blot, ShrimProbe Test Kit, DiagXotics), para cada uno de las muestras, lo que nos permitió, con base en las reacciones coloridas, definir la presencia o ausencia de partículas virales en cada uno de los organismos analizados.

Análisis por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó el corte de 2 pares de pleópodos del abdomen de los organismos, y se fijaron en etanol al 75%, almacenándose a 4°C, hasta su procesamiento. El DNA se extrajo por el método reportado por Sambrook y col. (1989), modificado según Lo y col., (1999).

A partir de 50 mg de DNA obtenidos de cada uno de los diez organismos muestreados por granja, se analizaron primeramente utilizando los "primers" diseñados para amplificar regiones internas del DNA genómico del propio camarón, con el fin de establecer la calidad de este para ser amplificado por PCR. Posteriormente, se realizaron "pooles" de los DNAs de cada granja que presentaban buena calidad, y se analizaron contra 4 diferentes juegos de primers diseñados específicamente en nuestro laboratorio pa-

ra amplificar DNA de WSSV. Dos de estos primers (146F/R1 y 146F/R2) fueron sintetizados según el reporte de Lo y col., (1999), mientras que los otros dos (WSF/R1 y WSF/R2) se diseñaron estratégicamente a partir de las secuencias de DNA de WSSV reportadas en el banco de datos GenBank (Access number: Q92007). El criterio para definir un resultado positivo, se estableció obteniendo al menos una amplificación de cada juego de los 4 primers. DNA de WSSV extraído de camarones con infección severa, fue utilizado como control positivo, los cuales produjeron amplificaciones de 1447, 941, 436, y 413 pb con los primers 146F/R1, 146F/R2, WSF/R1 y WSF/R2, respectivamente. En cada corrimiento de las muestras se ensayó un tubo de reacción con solo agua bidestilada y estéril como control negativo.

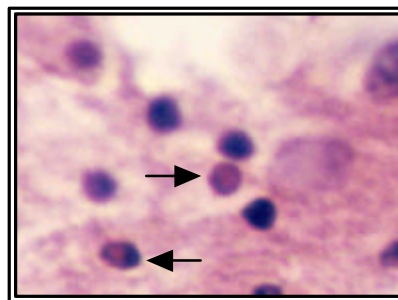
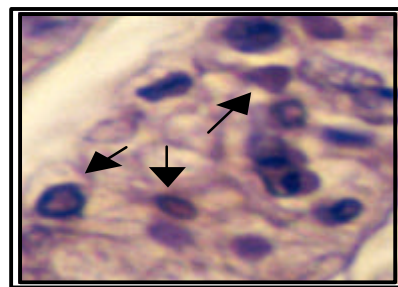


Fig.1 Sección de corte histológico de branquias donde se puede apreciar la presencia de prominentes cuerpos de inclusión eosinofílicos, de las muestras analizadas de los organismos colectados en granjas de cultivo de camarón en las costas de Sonora y Sinaloa en Junio de 1999.

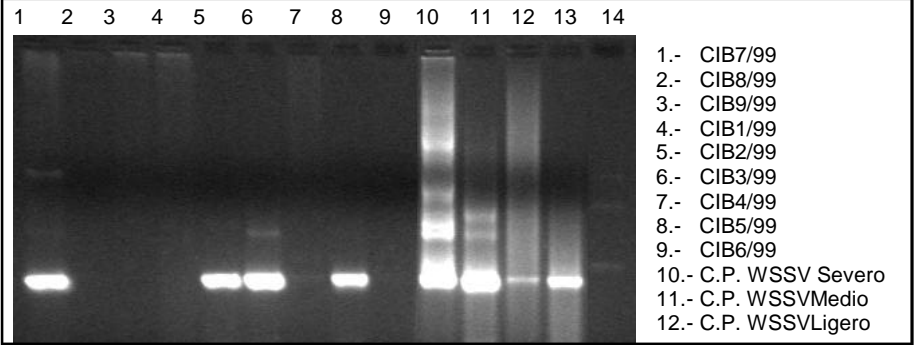
Los resultados antes descritos, evidencian la presencia del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en camarones peneidos de 4 de las 9 granjas muestreadas en el noroeste del país. A nivel histológico la presencia de cuerpos prominentes de inclusión eosinofílicos a basofílicos pálidos con tinción H&E a nivel de branquias y órgano linfoide (ver FIGURA 1). Los resultados obtenidos por Dot Blot (con el ShrimProbe Test Kit, DiagXotics, Inc.), estuvieron basados en el análisis individual de los organismos, a los cuales se les realizó la necropsia del tercer y cuarto par de pleópodos de donde se extrajo el DNA para ser hibridado contra la sonda del recomendada en el kit.

Los "Dot Blot" sugieren fuertemente la presencia de DNA de WSSV en todos las muestras con excepción de CIB6/99 (datos no presentados), la cual fue la única muestra con resultados negativos congruente a los observados por PCR. La sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR, junto con los criterios manejados para determinar si un resultado es positivo o negativo, nos permitió observar que solo las muestras CIB2/99, CIB3/99, CIB5/99 Y CIB7/99 (4 de 9) fueron positivas, las restantes 5 granjas no evidencian la presencia de DNA de WSSV bajo ninguno de los juegos de primers. Estos resultados fueron ampliamente confirmados utilizando el kit comercial para detectar WSSV mediante PCR (IQ2000).

El conjunto de resultados obtenidos mediante las tres técnicas es observado en la

BIBLIOGRAFIA

Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1988. IHNN virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*. *Aquaculture*, 38: 185-194.
 Jory, D.E. 1999. Shrimp whitespot virus in the western hemisphere. *Aquaculture Magazine*. Vol. 25 No. 3. Pp. 83-91.
 Lightner, D.V. 1985. A Review of the diseases of cultured penaeid shrimp and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. pp 79-103. En: Taki, Y; J.H. Primavera, J.A. Llobrera (eds.)
 Lightner, D.V. 1996a. The penaeid shrimp viruses IHNNv and TSV: apizootiology, production impacts and



Imágenes de geles de agarosa 1% que muestra las amplificaciones por PCR, obtenidas mediante el kit comercial IQ2000. Los carriles 1, 5, 6 y 8 señalan las muestras positivas al WSSV de acuerdo al carril 13 que corre el control positivo para

tribution in the Americas. *Revue Scientifique et Technique Office*

International des Epizooties, 15 (2):579-601.
 Lightner, D.V. 1996b. A handbook of shrimp pathology and diagnostics procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Section 3: Viruses. *World Aquaculture Soc.* Baton Rouge, LA.
 Lightner, D.V. and R.M. Redman. 1991. Hosts, geographic, range and Diagnostic procedures for the penaeid viruses of concern to shrimp culturists in the Americas. In: Fast, A.W. and L.J. Lesters (eds). pp 573-592.
 Lightner, D. V. 1999. Specific genomic DNA fragment analysis

of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis. Aqua. Org.* 35: 175-185.
 Sambrook, A. Maniatis, F. Fritsh, A. 1989. *Molecular Cloning Protocols*. Cold Spring Harbor syndrome virus. *Dis. Aqua. Org.* 35: 175-185.
 Lo, C.F. Hsu, H.C. Tsai, M.F. Ho, C.H. Peng, S.E. Kou, G.H. Lightner, D. V. 1999. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis. Aqua. Org.* 35: 175-185.
 Sambrook, A. Maniatis, F. Fritsh, A. 1989. *Molecular Cloning Protocols*. Cold Spring Harbor.

CLAVE GRANJA	No. ORGS/ MUESTRA	No. ORGS HISTOLOGICOS (+)	No. ORGS. DOT BLOT (+)	PCR (+)
CIB1/99	10	7	5	-
CIB2/99	10	2	9	+
CIB3/99	10	5	10	+
CIB4/99	4	1	4	-
CIB5/99	10	6	9	+
CIB6/99	10	8	1	-
CIB7/99	10	6	7	+
CIB8/99	10	5	7	-
CIB9/99	10	5	6	-

Tabla 1. Resumen de resultados positivos al WSSV de las muestras analizadas de los organismos colectados en granjas de cultivo de camarón en las costas de Sonora y Sinaloa en Junio de 1999.

Monitoreo...*(viene de la pág.2)*

- b) En cada colecta se realizarán estudios patológicos en fresco e histológicos, *tomándose in situ* las muestras para análisis microbiológico (hemolinfa, hepatopáncreas, tejidos con lesiones, en caso de camarones) y virológico (detección en membranas de soporte sólido).

- c) Además se tomarán muestras para análisis físico químico de agua y suelo de la estanquería

- d) Del resto de la muestra de organismos serán fijados por inyección de solución AFA- Davidson o el más adecuado para su transporte al laboratorio.

- e) En casos especiales se realizarán análisis de metales pesados y genéticos para la detección oportuna de patógenos de acuerdo a las características patológicas de la muestra, siendo cubiertos los costos adicionales por la granja participante.

III. Financiamiento

- a) El financiamiento del monitoreo sanitario será aportado por ambos participantes, PNSA y granja acuicola seleccionada.
- b) El PNSA aportará el 50 % del costo total estimado que corresponderá a mantenimiento y/o adquisición de equipo especializado, insumos químicos y material del laboratorio
- c) La granja aportará el 50 % restante del costo total estimado, correspondiente a reactivos químicos y microbiológicos, sondas génicas y viáticos.

- d) El PNSA y la granja participante cubrirán el 25 % correspondiente de cada uno al inicio del monitoreo.

- e) Ambos participantes cubrirán el 8.33 % en los tres meses restantes para así completar el 50 % del gasto estimado correspondiente de cada parte. ♦

Consideraciones... *(viene de la pág 2)*

están desarrollando los camarones peneidos y los factores que se están saliendo de control durante el periodo de cultivo.

- > Señales gruesas y clínicas: Permite la descripción de los posibles problemas con los que nos estamos enfrentando, sin embargo se debe tener especial cuidado de no dar el diagnóstico, simplemente por la apariencia, ya que muchos de los problemas patológicos que se presentan dentro de los cultivo, tienen características muy semejantes.

- > Revisión en fresco (microscopía): Permite definir problemas de ecto y endo-parásitos, que puedan ser visibles con un microscopio óptico, es decir, podemos observar: hongos, protozoarios, nemátodos y en ciertos casos bacterias móviles.

- > Microbiología: En caso de contar con el equipo básico para realizar cultivo y aislamiento de bacterias podemos llegar a definir y cuantificar las bacterias que se encuentran dentro de nuestro cultivo o bien dentro de los organismos, y en su momento poner en práctica, métodos correctivos antes de que el problema no sea manejable.

- > Histología e histoquímica: Para poder poner en práctica estas técnicas se requiere de un laboratorio más sofisticado, además de personal capacitado que obtenga los cortes necesarios para un buen diagnóstico.

- > Microscopía electrónica: Como en el caso anterior el equipo y el personal debe ser altamente calificado, además de que los costos son demasiado elevados y el número de muestras que se pueden revisar es pequeño.

III. 2. Métodos Moleculares:

> Métodos serológicos con anticuerpos monoclonales:

- Anticuerpos fluorescentes.

- ELISA

> Pruebas genéticas (uso de marcadores radioactivos o no radiactivos): En este caso resulta más favorable para el diagnóstico ya que su sensibilidad a la detección de un patógeno (virus, microsporideo, rickettsias, entre otros) es elevada, ya que se basa en la detección de la carga genética del patógeno, para tal efecto se cuenta con dos tipos de técnicas:

- Hibridación por inmovilización (Dot blot).

- Hibridación *In situ* sobre secciones histológicas.

IV. MUESTREO Y TAMAÑO DE MUESTRA

IV.1. Muestreo aleatorio

Cuando una población de camarones peneidos son muestreado aleatoriamente para determinar su estado de salud/enfermedad y/o prevalencia de un patógeno específico, el número de organismos necesarios a ser muestreados está determinado por la prevalencia esperada del patógeno específico tomando en consideración los grados de confianza de una confidencia estadística. La tabla 1 muestra la guía para el tamaño de muestra.

IV.2. Muestreo no aleatorio

✂ En situaciones de enfermedad, donde las señales gruesas permiten la evaluación de la prevalencia, entonces se puede usar, para determinar el tamaño de muestra, la tabla modificada por Lightner (1996).

✂ En cualesquier otro evento, seleccionar 10 organismos vivos, que exhiban las señales clínicas típicas de la enfermedad en cuestión.

✂ Procesar los organismos lo más rápidamente posible mediante los procedimientos definidos para la determinación del problema.

(Continúa en la pág. 7)

Como Enviar Muestras de Peces al Laboratorio

M. en C. César Ortega Santana. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), FMVZ-UAEM.

Los productores o técnicos que trabajan en una unidad de producción acuícola pueden darse cuenta de la existencia de alguna enfermedad cuando observan peces con alteraciones corporales o pérdida del apetito; sin embargo, aunque en ocasiones se sospecha de una enfermedad en la granja no es posible determinar exactamente el problema.

En este caso está recomendado acudir a los servicios de un laboratorio de diagnóstico el cual puede **confirmar el diagnóstico clínico** que ya hemos hecho nosotros mismos, o bien identificar otra causa del problema y aconsejar cual sería la posible estrategia de control o tratamiento. Por otra parte, solicitar estudios de laboratorio permite identificar enfermedades o agentes causales de enfermedad que no se han manifestado ya que existen enfermedades que se presentan de forma subclínica

Algunos laboratorios tienen la disposición de acudir a la granja y tomar directamente las muestras necesarias para el diagnóstico; sin embargo, ante situaciones de emergencia no es necesario esperar, por lo que nosotros mismos debemos y podemos remitir las muestras al laboratorio. Para esto a continuación daremos algunos consejos acerca de cuales son las mejores muestras que se deben remitir y en que condiciones debe hacerse el envío.

Para tener un buen diagnóstico, los laboratorios siempre recomiendan enviar peces vivos, ya que cuando los peces mueren se descomponen muy rápidamente y por lo tanto los resultados ya no son confiables; además puede ocurrir que algunos agentes causales de enfermedad abandonen el cuerpo de los peces cuando estos mueren o que otros agentes

proliferen y en tales casos el resultado tampoco es real.

Cuando se presenta una mortalidad o enfermedad de considerable importancia se requiere enviar al menos 5 peces por estanque, procurando incluir peces que presentan los signos y lesiones de la enfermedad y de preferencia deben ser moribundos o recién muertos. En la muestra también deben incluirse peces aparentemente sanos.

Envío de peces vivos

Las mejores muestras son los peces vivos que muestren los signos de enfermedad. Estos se colocan en una bolsa de plástico que contenga una tercera parte de su capacidad de agua y las otras dos partes se llenan con oxígeno. Puede usarse una relación de 10 a 12 alevines por litro o 5 crías por litro que pueden durar hasta 48 horas si el agua permanece fría; 4 peces de tamaño de entre 150 y 200 gramos pueden durar hasta 24 horas manejados en 30 litros de agua fría con oxígeno. Peces mayores duran menos tiempo, por lo que deben remitirse al laboratorio lo más rápido posible.

Cualquier tipo de muestra de peces que se envía a un laboratorio siempre debe ser acompañada de todos los datos necesarios para el diagnóstico, es decir la historia clínica, en donde se indica la especie, edad, tipo de cultivo, lugar donde se ubica la granja, tipo de agua, tiempo de inicio de la enfermedad, signos clínicos y lesiones, tipo de alimento, si hubo medicación de los animales, origen de los peces, si han existido movimientos o entrada de peces, etc.

Los peces que son enviados vivos, pueden ser utilizados para realizar todos los procesos de diagnóstico que sean necesarios, tales como bacteriología, virología, histopatología, parasitología, hematología y serología.

Envío de peces muertos en hielo

Si no es posible remitir peces vivos al laboratorio o si los peces miden más de 25 centímetros, entonces también se pueden enviar muestras de peces recién muertos que deberán ser transportados a baja temperatura para evitar cambios en los peces que puedan afectar en el diagnóstico.

Si el pez pesa más de 500 gramos, debe ser puesto individualmente en una bolsa de plástico estéril; si pesan menos de 500 gramos, podemos enviar tres peces por bolsa bien sellada. Las bolsas se colocan en una caja de transportación o un termo y deberán estar bien cubiertas con hielo. Las muestras con suficiente hielo pueden durar 24 horas o más en buen estado de conservación.

Envío de peces muertos fijados

Otra opción para enviar muestras al laboratorio, es hacerlo en frascos con formol al 10%.

El formol es un producto químico que al entrar en contacto con los tejidos y células del animal las fija, es decir que evita que entren en descomposición y de esta manera cuando las muestras se analizan en el laboratorio se puede determinar que lesiones tienen. Sin embargo de estas muestras no es posible aislar a los agentes causales de enfermedad ya que también se destruyen.

El formol al 10% se prepara de la siguiente manera: para preparar un litro se pone una parte de formol puro tal y como se compra en la botica, y nueve partes de agua destilada.

Para tener una buena fijación es necesario usar una relación mínima de fijador y tejido de 10 a 1. Es decir que una parte de tejido por 10 de formol. De esta manera se pueden fijar animales enteros o solo algunas partes. Por ejemplo, si lo que se cree que está mal es el hígado ♦ entonces solo se envía este órgano.

Consideraciones...(viene de la pág 5)

Si los camarones deben ser almacenados o transportados en otra forma que no sea vivo, entonces hay que fijar con solución Davidson, o empacar en hielo o congelado en un contenedor estéril (i.e. Bolsas de plástico).

FIJACIÓN DE TEJIDOS PARA ANÁLISIS HISTOLÓGICO

1.-Importancia de una Fijación Apropiada.

Las técnicas de fijación de organismos, es simple de naturaleza, sin embargo, es de una alta importancia para la obtención de unas excelentes laminillas para su revisión al microscopio. La mala fijación puede dar resultados que puedan ser interpretados inadecuadamente. La capa de quitina no permite una adecuada infiltración de la solución fijadora si se colocan por inmersión (excepto larvas y postlarvas tempranas), por lo que primero se debe inyectar el fijador y posteriormente sumergir en la solución. Ya que si no se sigue este procedimiento, el organismo inicia una autólisis de muchos de los tejidos u órganos.

El tiempo de fijación es de igual importancia, los organismos deben ser fijados inmediatamente después de su extracción del medio en el que se encuentran, si bien, hay que trasladarlos a otro sitio para la realización de este proceso, se recomienda que se transporten los organismos en un recipiente con suficiente agua limpia y oxigenada, ya que el exceso de manejo, la falta de una adecuada oxigenación puede presentar problemas a la hora del examen por histopatología y se malinterpretan los resultados cuando en realidad es un camarón que goza de buena salud en su ambiente normal.

2.- Fijadores Apropiados.

Varios fijadores han sido usados para la preservación de camarones y otros crustaceos con exitos variados. Los más usados son: Helly's, Bouin's, 10.5 neutral buffered formalin (Luna, 1968) and Davidson's AFA (Humason, 1972). La experiencia ha mostrado que la solución Davidson AFA a represen-

los mejores resultados para propósitos generales para camarones peneidos.

3.- Volumen necesario de fijador. Preparar una adecuada cantidad de fijador; una regla general es de que un mínimo de ~10X del volumen del organismo puede ser usado para cada espécimen (i.e. un camarón de 10 ml de volumen, se requiere de 100ml de fijador).

4.- Solución Davidson: Alcohol, formalina, ácido acético (Davidson AFA) (para 1 lt.) (Bell y Lightner, 1988):

- *330 ml 95% alcohol etílico.
- *220 ml 100% formalina (solución acuosa saturada de gas de formaldehído 37-39%).
- * 115 ml. Acido acético glacial.
- * 335 ml. agua de preferencia destilada.
- * Almacenar a temperatura ambiente.

5.- Procedimiento de fijación con solución Davidson AFA.

Evitar el contacto de la solución con la piel y los ojos, en caso de exposición accidental: lavar inmediatamente con grandes cantidades de agua y solicitar ayuda médica.

6.- Larvas y postlarvas tempranas.

> Sumergir los organismos seleccionados directamente al fijador.

> Fijar por 12 a 24 horas en la solución Davidson, posteriormente transferir a 50 - 70% alcohol etílico para su almacenaje.

Tabla1.Tamaño de muestra basado en la prevalencia, asumida, de un patógeno en una población (Lightner, 1996).

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

7.- Grandes postlarvas, juveniles y adultos.

Inyectar el fijador en un volumen de 0.1 a 10 ml, dependiendo del tamaño del organismo, con una jeringa con aguja de calibre adecuado al organismo, por ejemplo: en PL's y pequeños juveniles el calibre es No. 27; la fijación siempre tiene que ser *in vivo*.

La aguja debe ser introducida por la parte lateral del cefalotórax directamente al HP, posteriormente en la región anterior abdominal y en la región posterior del abdomen.

La cantidad de fijador debe ser dividido en las diferentes regiones mencionadas anteriormente.

Una excelente regla es inyectar un equivalente al 5-10% del peso del cuerpo del camarón, hasta que no se perciban señales de vida y exista un visible cambio de color.

Inmediatamente después de la inyección, cortar la cutícula partiendo del 6° somite abdominal y terminando en la región cefalotorácica.

Organismos mayores a 12 gramos, deben ser cortados transversalmente justo en la parte posterior de la unión de la región cefalotorácica y la región abdominal y, opcionalmente, en la parte media del abdomen.

Posteriormente se sumerge en el resto de la solución fijadora.

Mantener en la solución fijadora a temperatura ambiente por un tiempo de 24 - 72 horas, dependiendo del tamaño del organismo (entre más grande más tiempo).

Posterior al tiempo de fijación los organismos deben ser transferidos a 50 - 70% alcohol etílico para su almacenaje por tiempo indefinido.

Se debe registrar la mayor cantidad de datos posibles tales como: observaciones gruesas, la especie, edad,

(Cont. En la pág. 8)

Consideraciones... (Viene de la página 7)

El peso, fuente de postlarvas y fuente de progenitores y cualquier otra información histórica pertinente, lo anterior debe ser escrito en un pedazo de papel albanene con lápiz de grafito y se coloca en una bolsa plástica Junto con el organismo.

Envío de Muestras para el Proceso por Histología

Remover el espécimen del alcohol etílico 50%. Envolver en una toalla de papel secante, introducir este paquete en una bolsa sellable y saturar con alcohol etílico al 50%.

Marcar la bolsa con los datos principales como historia, número de envío, etc.

Colocar esta bolsa dentro de otra para evitar el posible accidente de liberación de alcohol.

Literatura Citada

Bell, T.A., and D.V. Lightner. 1988. A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. 114 p.

Conroy, D.A. y G. Conroy. 1990. Manual de Patología de los camarones peneidos. 2a. edición. pp. 1-6. Tissue Technique. 3rd Edition. W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA.

Lightner, D.V. 1996b. A handbook of shrimp pathology and diagnostics procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Section 3: Viruses. World Aquaculture Soc. Baton Rouge, LA.

Luna, L.G. (ed.) 1968. Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd Edition. ♦

IV Foro de Truticultores Martha Rodríguez. UAM-X

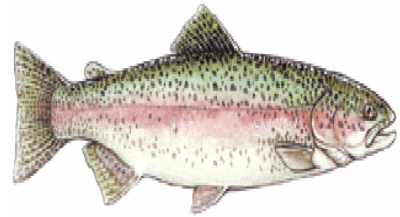
El pasado 27 y 28 de Enero del presente, se llevó con mucho éxito el IV Foro de Truticultores, organizado por la Delegación Federal del Estado de México, la Secretaría de Desarrollo Agropecuario del Gobierno del Estado de México; la Dirección General de Acuicultura de la SEMARNAP y el H. Ayuntamiento de Valle de Bravo.

En este foro estuvieron representados todos los sectores interesados en la truticultura de nuestro país como son: los productores de trucha de los diferentes estados, el sector gubernamental a través de las distintas instancias que promovieron en evento; así como PROFEPA; distintos prestadores de servi-

cios mostraron desde diseños de estanques para cría hasta aseguradoras de la producción; así como los académicos vinculados al desarrollo de la truticultura a través del Programa Nacional de Sanidad Acuicola representados por la Universidad Autónoma del Estado de México, y la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

La importancia del foro radicó en que se abordan diferentes tópicos de interés para promover e incrementar la producción de esta especie que día a día tiene mayor demanda en el mercado nacional, el cual aun no está satisfecho.

Entre las demandas de los productores de trucha se pudo destacar la necesidad de manuales sobre el cultivo de trucha, formas de asegurar la producción; así como la prevención de enfermedades; mismas que fueron turnadas a las autoridades para darles trámite. ♦



BO LETÍN DEL PROGRAMA NACIONAL DE SANIDAD ACUÍCOLA

RESPONSABLES DE EDICIÓN:
FERNANDO JIMÉNEZ GUZMÁN
DIRECTOR DE CONTROL Y SANIDAD ACUÍCOLA.
FRANCISCO NIETO SINCHÉZ
DIRECTOR DE FOMENTO ACUÍCOLA
MARTHA RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ, COORDINADORA DE LA RED DE DIAGNÓSTICO.
UAM-Xochimilco
LUZ ALEJANDRA DELGADILLO SIERRA
UAM-Xochimilco.

DIRECTOR IO
SEMARNAP: JULIA CARABIAS LILLO, SECRETARIA DEL MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA; CARLOS CAMACHO GAOS, SUBSECRETARIO DE PESCA; CARLOS RAMÍREZ MARTÍNEZ, DIRECTOR GENERAL DE ACUACULTURA; FERNANDO JIMÉNEZ GUZMÁN, DIRECTOR DE CONTROL Y SANIDAD ACUÍCOLA; FRANCISCO NIETO SINCHÉZ, DIRECTOR DE FOMENTO ACUÍCOLA; LETICIA RILDO, DIRECTORA DE INGENIERÍA Y CENTROS ACUÍCOLAS; M. EDUARDO OLMOS TOMASINI, DIRECTOR DE PROYECTOS ESPECIALES.
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA: JOSÉ LUIS GIZQUEZ MATEOS, RECTOR GENERAL; EDMUNDO JACOBO MOLINA, SECRETARIO GENERAL; DRA. PATRICIA ELENA ACEVES PASTRANA, RECTORA DE LA UNIDAD Xochimilco; ERNESTO SOTO REYES GARMENDIA, SECRETARIO DE LA UNIDAD Xochimilco; BEATRIZ GARCÍA, DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD; JOSÉ VICÓN PALE, JEFE DEL DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE; MARTHA RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ, LABORATORIO DE BIOLÓGIA DE LA REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA ACUÍCOLA; CLAUDIA BAUTISTA MORENO, JEFE DE LA SECCIÓN DE IMPRESIÓN.

Centro de Ciencias de Sinaloa.
M. en C. Martha Zaráin Herzberg
Tel. 01(671)2-29-39, 12-29-32,
12-28-80, Fax 01(671)2-31-4.
e-mail: martha@computo.ccs.net.mx

CIBNOR: Dr. Marco Linné Unzueta
Tel. 01(112) 1-22-37 y 1-22-38
e-mail: mlinne@cibnor.mx

UAEEM - CIESA
M. en C. César Ortega Santana
Tel. 01(729)655-55
e-mail: orsc@coatepec.uaemex.mx

UAM-Xochimilco
M. en C. Martha Rodríguez Gutiérrez
Tel. (01) 5483-7494
e-mail: rogm0211@cueyatl.uam.mx

UNISON: Dr. León Armando Pérez Alvidrez
DICTUS. Tel. 01(62)12-19-95
e-mail: lperez@guayacan.uson.mx

UANL
Centro Nacional de Sanidad Acuicola
Dr. Lucio Galaviz Silva
Tel/Fax. 01(81)8352-4425
e-mail: lgalaviz@ccr.dsi.uanl.mx

UAT
Dr. Jaime Luis Rábago Castro
Tel. 01(131) 210-61
e-mail: rabago@fmvz.uat.mx

