



ITSON

Educar para
Trascender

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias

LABORATORIO DE ANÁLISIS DE SANIDAD ACUÍCOLA

“SITUACION ACTUAL DE LAS ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DE CAMARON EN EL NOROESTE DE MEXICO”



FORTALEZA, BRASIL, NOVIEMBRE 2014

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias

LABORATORIO DE ANÁLISIS DE SANIDAD ACUÍCOLA



EDIFICIO DE ACUACULTURA



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN E
INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
AGROPECUARIA Y AMBIENTAL**

(CIIBAA)



**LABORATORIO DE ANÁLISIS
DE SANIDAD ACUÍCOLA**

EQUIPO DE TRABAJO

CUERPO ACADÉMICO:

BIOSISTEMAS ACUÁTICOS.

LGAC: BIOTECNOLOGÍA ACUÍCOLA Y SANIDAD ACUÍCOLA.

Dr. Fernando Lares Villa.

Dr. Ramon Casillas Hernandez.

Dr. Jose Cuauhtémoc Ibarra Gámez.

COLABORADORES.

M.A.A. CECILIA GUADALUPE LUNA BADILLO

MVZ. MARTHA ELENA QUIROZ MACIAS

QBP. JOSE REYES GONZALEZ GALAVIZ.

PROGRAMAS ACADÉMICOS VINCULADOS:

INGENIERO EN BIOSISTEMAS.

MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES.

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA.

TESISTAS:

DOCTORADO: SIETE ESTUDIANTES.

MAESTRÍA: TRES ESTUDIANTES.

LICENCIATURA: SIETE ESTUDIANTES

ACREDITACIÓN EMA

APROBACIÓN SENASICA



ITSON
Educar para
Trascender

acreditación



entidad mexicana de acreditación a.c.

ACREDITA
A

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

LABORATORIO DE ANÁLISIS DE SANIDAD ACUÍCOLA

5 DE FEBRERO No. 818 SUR, COL. CENTRO,
C. P. 85000, CIUDAD OBREGÓN, SONORA.

Como Laboratorio de Ensayos de acuerdo a los
Requisitos establecidos en la Norma Mexicana
NMX-EC-17025-IMNC-2006
(ISO/IEC 17025:2005) para las actividades de
evaluación de la conformidad en la rama/área:

Sanidad Agropecuaria*

"El cumplimiento de los requisitos de la Norma ISO/IEC 17025:2005 por parte de un laboratorio significa que el laboratorio cumple tanto los requisitos de competencia técnica como los requisitos del sistema de gestión necesarios para que pueda entregar de forma consistente resultados de ensayos y calibraciones técnicamente válidas. Los requisitos del sistema de gestión de la Norma ISO/IEC 17025:2005 (sección 4) están escritos en un lenguaje que corresponde con las operaciones de un laboratorio y satisfacen los principios de la Norma ISO 9001:2008 "Sistemas de Gestión de la Calidad - Requisitos" y además son afines a sus requisitos pertinentes."

María Isabel López Martínez
Directora Ejecutiva



Acreditación No: SA-0236-002/10
Vigente a partir del 2010-11-19*

*En el alcance establecido en el anexo técnico correspondiente 09LP0704
Siempre que se presente este documento como evidencia de acreditación, deberá estar
acompañado del anexo técnico.

FOR-LAB-011-01

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, PESQUERÍA Y MEDIO RURAL,
FOFIRA Y ALMACÉN SAN



Dirección General de Salud Animal
Dirección de Servicios y Certificación Pecuaria

"2013, Año de la Unidad Institucional y Centenario del Ejército Mexicano"

Nº de Oficio B00.02.08.01.01.1806/2013

México, D.F. a 12 de noviembre de 2013

DR. ISIDRO ROBERTO CRUZ MEDINA
REPRESENTANTE LEGAL DEL LABORATORIO
DE ANÁLISIS DE SANIDAD ACUÍCOLA
5 DE FEBRERO 818 SUR COL. CENTRO
C.P. 85000 OBREGÓN, CAJEME, SONORA
PRESENTE

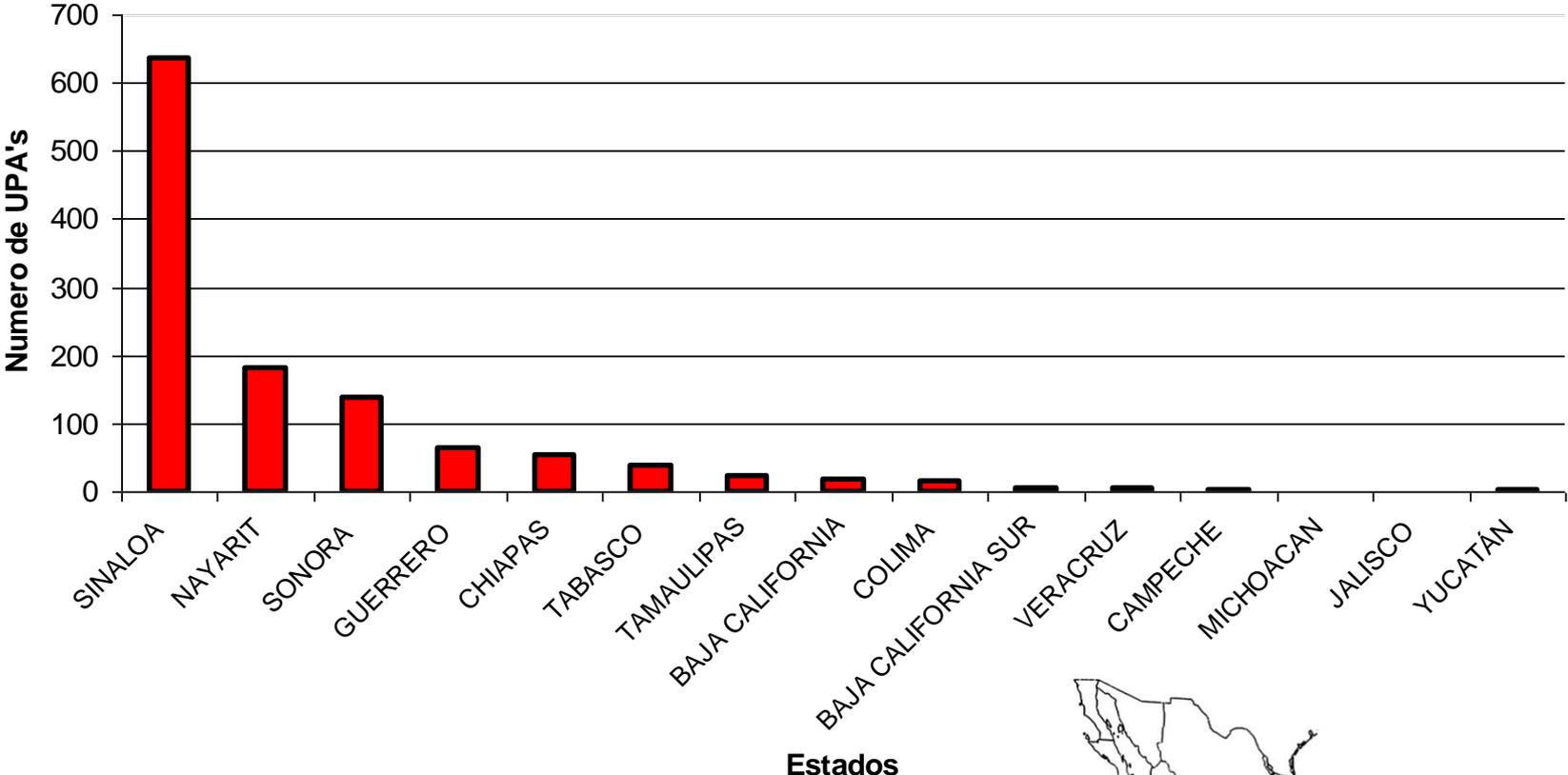
Con base en los artículos 4, 95, 103, 106 fracción I, 107, 109 fracción III, 111, 113 y 118 de la Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentables, los artículos 4, 6 fracciones VIII y XXXVII de la Ley Federal de Sanidad Animal y a los artículos 292 al 302 del Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal, me permito hacer de su conocimiento que el Laboratorio de Análisis de Sanidad Acuicola, ha sido aprobado con el No. D-002 por esta Dirección como Laboratorio de Diagnóstico para las siguientes pruebas:

PRUEBA	ENFERMEDAD	RESPONSABLE
PCR	Hepatopancreatitis Necrotizante Bacteriana en crustáceos	Biol. Cecilia Guadalupe Luna Badillo Dr. José Cuauhtémoc Ibarra Gámez QBP. José Reyes González Galaviz
PCR	Virus del Síndrome del Taura (TSV) en crustáceos	
PCR	Virus del Síndrome de la Marcha Blanca en crustáceos	
PCR	Virus de la Cabeza Amarilla/virus asociado al hepatopancreas (YGV/GAV) en crustáceos	
PCR	Virus de la Necrosis Hematopoyética Hipodérmica Infecciosa en crustáceos	
PCR	Virus de la Mionecrosis Infecciosa en crustáceos	
PCR	Nodavirus de Penaeus Vannamei (PNV) en crustáceos	
PCR	Nodavirus de Macrobrachium Rosenbergii (MrNV) en crustáceos	

Con vigencia a partir del 12 de noviembre de 2013.

1 de 2

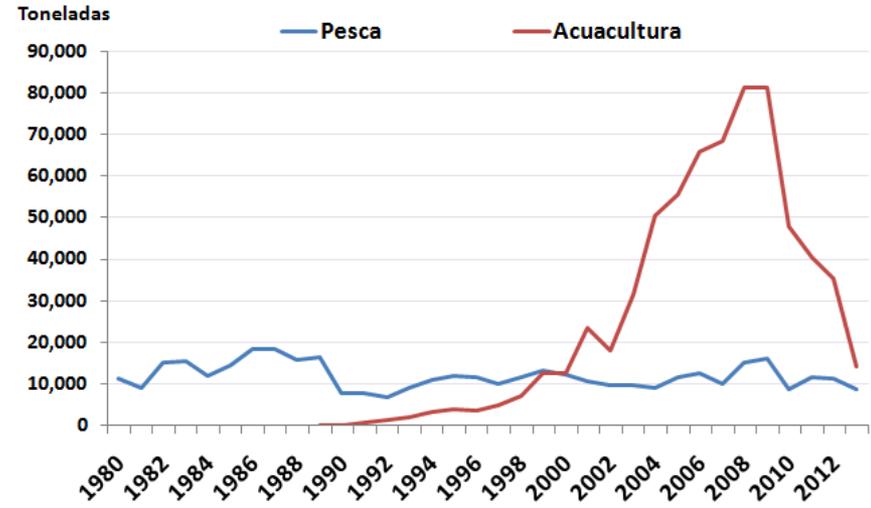
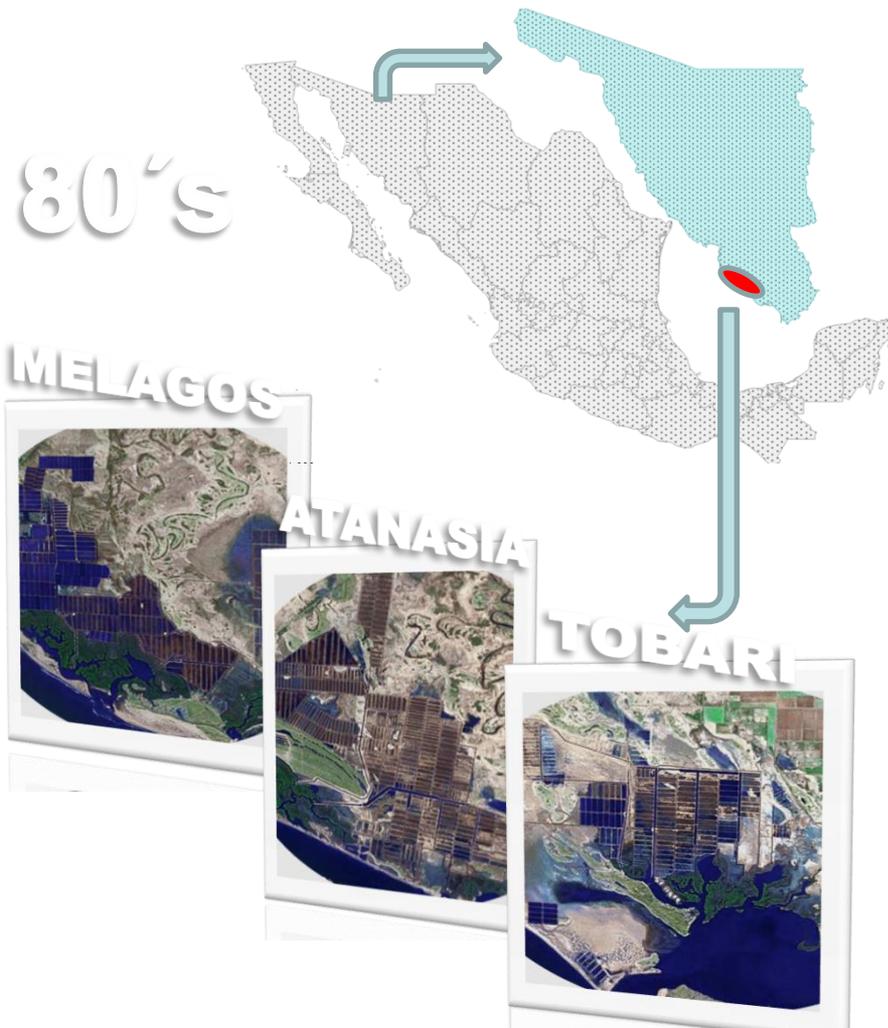
Distribución de las granjas de camarón en México



COSAES



La camaronicultura en Sonora



Infraestructura productiva

El 80% de las instalaciones acuícolas en el Estado están dedicadas al cultivo de camarón.

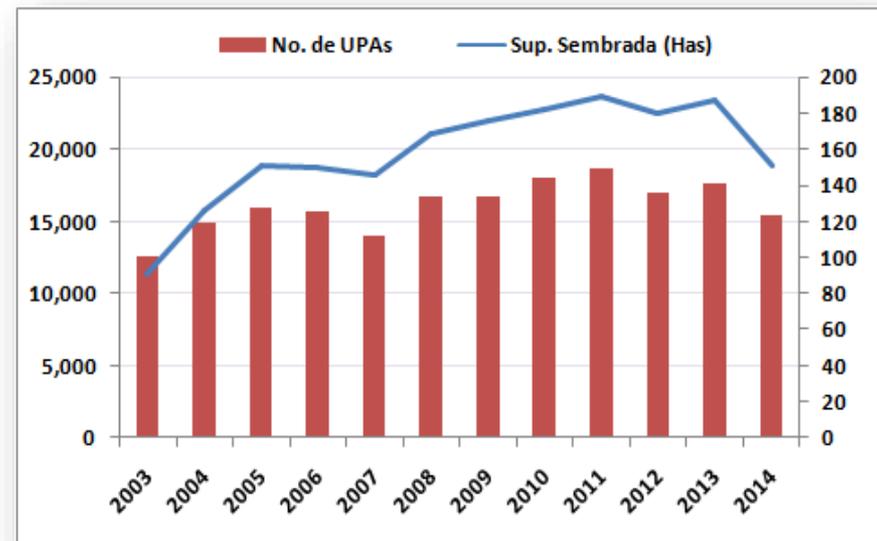
172 UPAs instaladas, con una superficie espejo de agua de 26,130 Has.

Las granjas se encuentran agrupadas en macro regiones (zonas), en las cuales se encuentran distribuidas las 15 juntas locales de sanidad acuícola.

En 2014 operan 124 UPAs en una superficie de 18,909 Has.

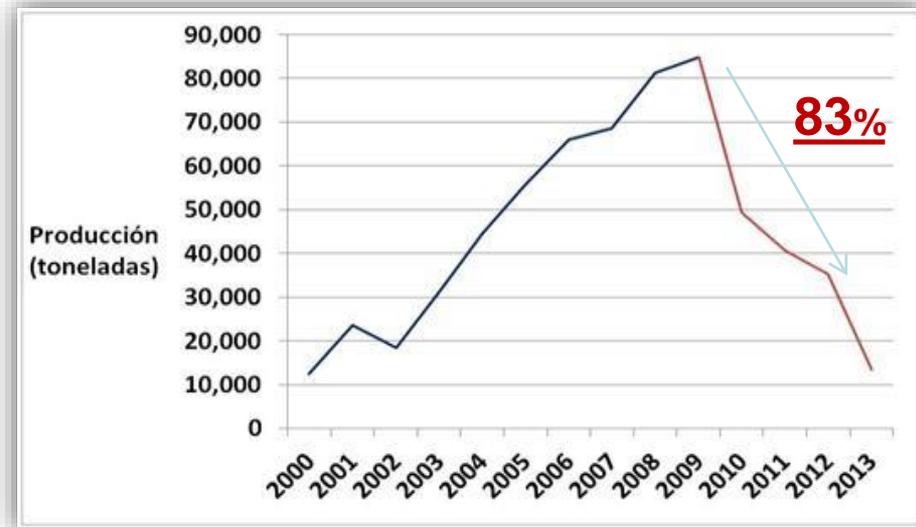
El 89% de la superficie productiva es operada por empresas privadas.

Estas empresas, son propietarias del 68% de la superficie que operan. El 32% restante, lo trabajan bajo los esquemas de arrendamiento, comodato, sociedad, etc.



Impacto de las enfermedades

Periodo	Patógeno	Mortalidades
1991 - 1994	IHHNV	> 90%
1995 - 1997	TSV	70 - 90%
1998 - 1999	IHHNV	30%
2000 - 2002		
2005	WSSV	> 50%
2010 - 2012		
2013 - 2014	Mortalidades atípicas	> 70%

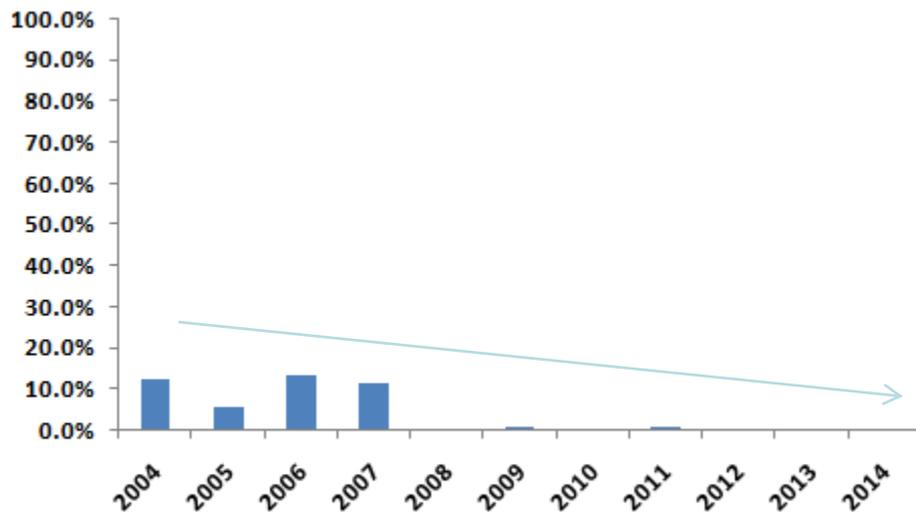


Síndrome de Taura (TSV)

OIE: Virus no envuelto de la familia *Dicistoviridae*.
Tiene tres variantes genotípicas.
Infección persistente y portadores asintomáticos.
Transmisión vertical y horizontal.

L. vannamei y *L. stylirostris* son altamente susceptibles

Prevalencia cercana a 0% en los últimos siete años



Fuente: ITSON

Hepatopancreatitis necrotizante (NHP)

OIE: Bacteria intracelular tipo *Rickettsia*.

Tiene cuatro fases bien diferenciadas: inicial, aguda, de transición y crónica.

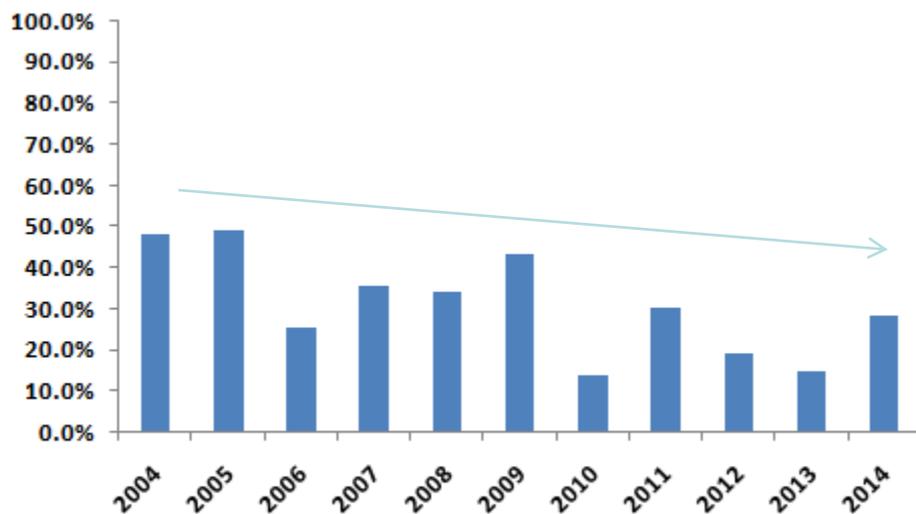
Todas las cepas aisladas son idénticas.
Transmisión horizontal.

L. vannamei y *L. stylirostris* son altamente susceptibles. Sin embargo, las infecciones son más severas en *L. vannamei*.



Prevalencias del 30% al 50%

Ha ocasionado mortalidades generalmente controladas con antibióticos.



Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV)

OIE: Virus no envuelto de la familia *Parvoviridae*. Existen cuatro genotipos distintos (dos de ellos son infecciosos). Transmisión horizontal y vertical.

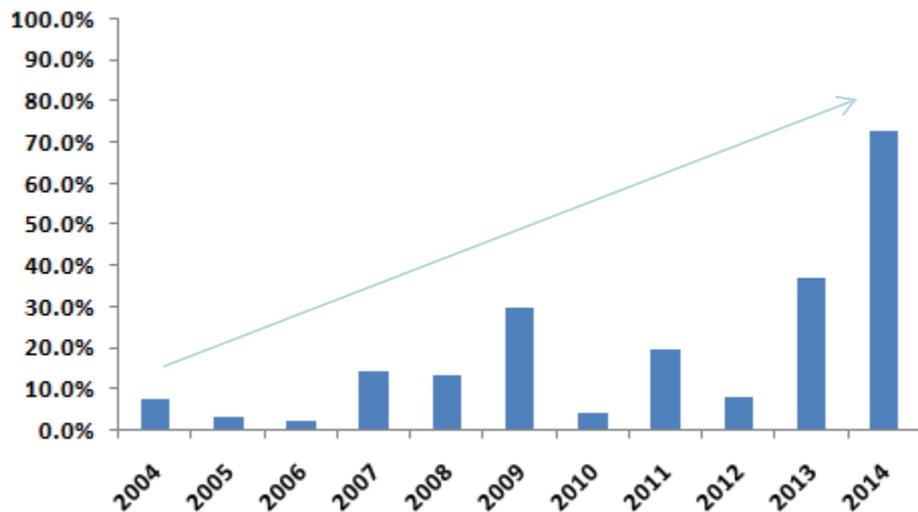
Afecta a la mayoría de las especies de camarones peneidos, provocando infecciones más graves en camarón azul.

Crecimiento reducido e irregular y deformidades cuticulares.



En los últimos dos años ha tenido altas prevalencias en los cultivos (40% - 70%).

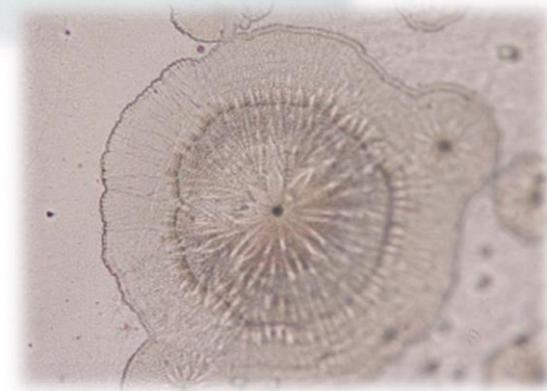
Aproximadamente el 50% de las detecciones se han realizado en UPAs con mortalidad.



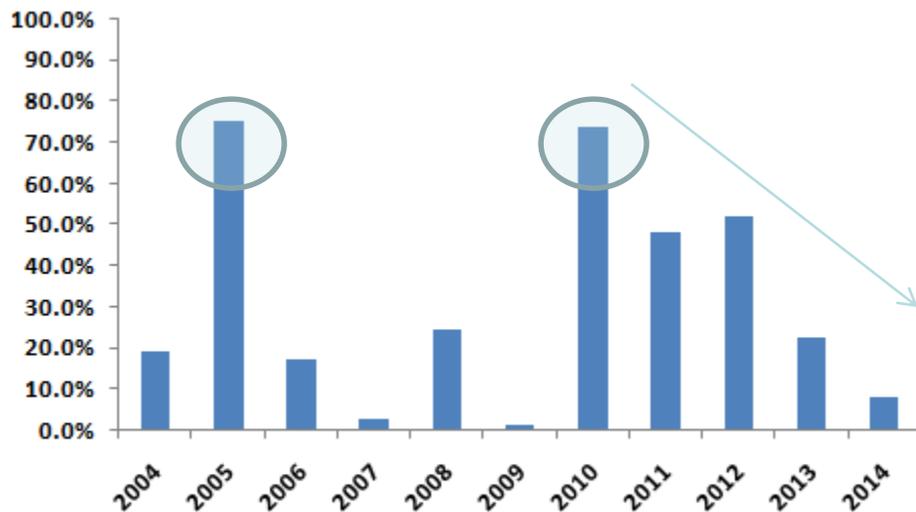
Enfermedad de las manchas blancas (WSSV)

OIE: Virus envuelto perteneciente a la familia *Nimaviridae*.
Existen distintas cepas con pequeñas variantes genéticas.
Transmisión vertical y horizontal.

Todos los crustáceos decápodos de aguas marinas, salobres o dulces son susceptibles.



Fuente: ITSON



La prevalencia se ha reducido en un 60% en los últimos cuatro años.

Mortalidades atípicas



Atribuibles a una cepa altamente patógena de *Vibrio parahaemolyticus*.

Provoca atrofia y coloración blanquecina del hepatopáncreas. Signología consistente con EMS.

Enfermedad emergente que aún no se encuentra en la lista de la OIE.

Mortalidades > 70% durante los primeros 7 – 35 días de cultivo.

2013 Vs 2014: Dispersión más lenta de la enfermedad. Reducción de la prevalencia de un 97% a un 70%.



Medidas implementadas

Diagnóstico. Rapidez, confiabilidad, especificidad.
Laboratorios oficiales y aprobados.



Vigilancia epidemiológica. Unidades de engorda, laboratorios de PLs y poblaciones silvestres (OASAS).

Cuidado de los factores ambientales. Establecimiento de fechas de siembra; calidad de agua; eliminación de vectores.



Manejo. Preparación de estanques; densidades de siembra; uso de PLs certificada; estrategias de alimentación.

Limpieza y desinfección. De instalaciones, materiales y equipos; disposición de los residuos.



Otras medidas. Vacío sanitario; cuarentenas; sacrificio o cosechas anticipadas de organismos; capacitación y divulgación; actualización del marco regulatorio; control de movilizaciones; investigación.

Tendencias de la industria en Sonora

Infraestructura:

Sistemas intensivos e hiper-intensivos. Son 16 UPAs las que emplean este tipo de sistemas, las cuales han obtenido rendimientos de 16,000 Kg/ha.

Maternidades. En los últimos años se ha incrementado en un 40% el número y capacidad de las maternidades.

Tratamiento del agua. Sistemas de sedimentación y recirculación que se están probando con éxito.

Insumos:

PLs. Uso de líneas resistentes; siembra de organismos con mayor talla (maternizados) y en fechas que representan mayor ventaja respecto a la temperatura; verificación sanitaria de los organismos.

Productos químicos y antibióticos. Se ha observado una mejoría en cuanto al uso racional de este tipo de productos.



Investigaciones

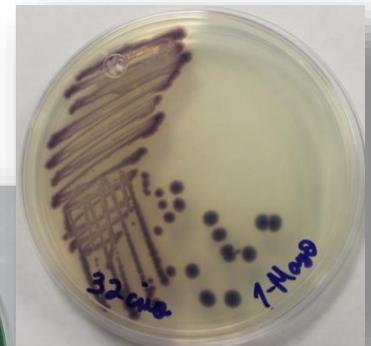
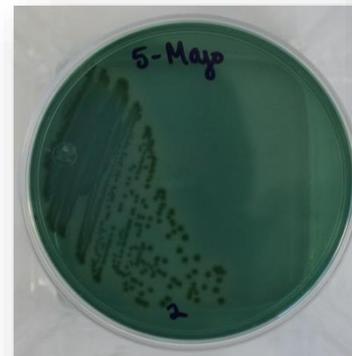
- **Caracterización e identificación** de bacterias asociadas a cultivos de camarón.
- Montaje de nuevas técnicas de **diagnóstico**: virus y bacterias.
- **Seguimiento en calidad de agua** de maternidades o granjas.
- Análisis de **componentes celulares en hemolinfa** (evaluación de dietas y desafíos).
- Evaluación de **antivirales** contra WSSV
- **Variaciones genotípicas** de virus (WSSV, IHHNV) y bacterias (*V. parahaemolyticus*).





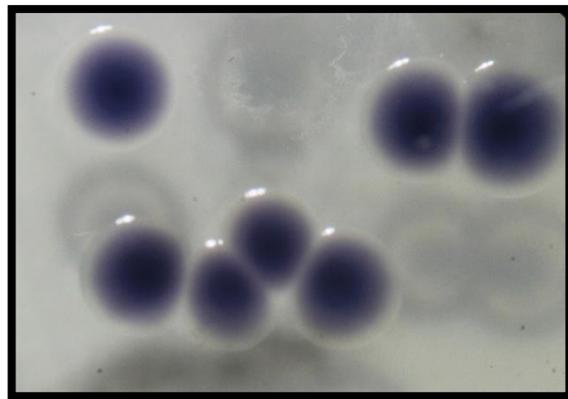
Estudios con *V. parahaemolyticus*

- Aislamiento, caracterización e identificación
- Antibiogramas
- Criopreservación
- Bioensayos (dietas-desafío) con Pl, juveniles y adultos, copépodos
- Antagonismo con bacterias marinas y extractos de algas
- Identificación por métodos moleculares
- Análisis de genes de distintos aislados
- Secuenciación 16S rARN





Tipo de Muestra	Toma de Muestra
Aislamiento, caracterización e identificación	De muestras silvestres y camarón de cultivo. 360 cepas; 60 presuntivas.
Antibiogramas	Oxitetraciclina, Enrofloxacina, Florfenicol
Criopreservación	Ultracongelación de cepas para resguardo (-80°C)



Aislamiento de bacterias



Toma de muestra
(hepatopáncreas o estómago)



Pesado de la muestra (< 1 gr)
por separado.



Colocar la muestra en 10 ml de
Solución salina estéril y se
macera.



Tomar 100 ml de la solución
formada.



Incubar de 18 a 24 hrs a 30°C e
identificar colonias de interés.

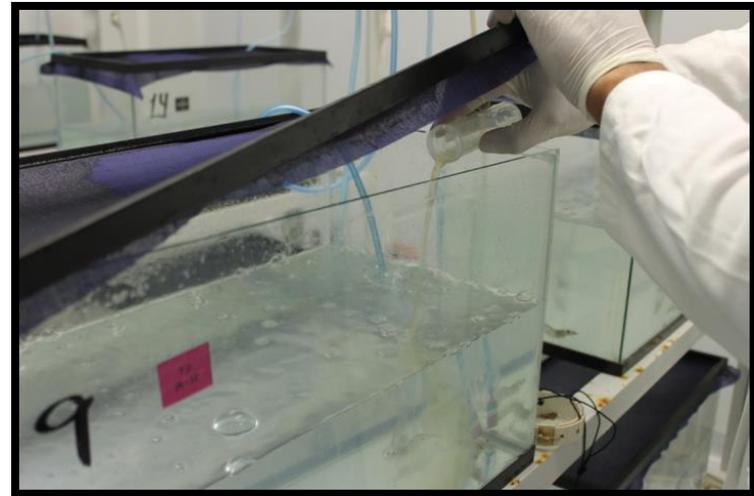
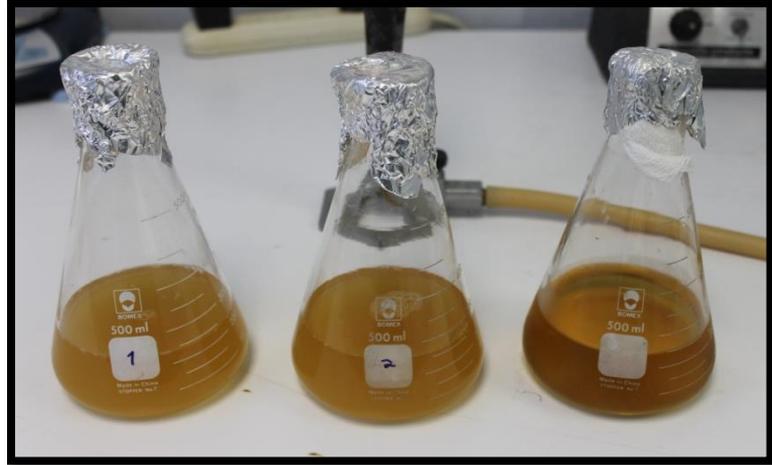


Diseminar con una varilla de cristal
acodada y el calor del mechero

Desafíos de patógenos

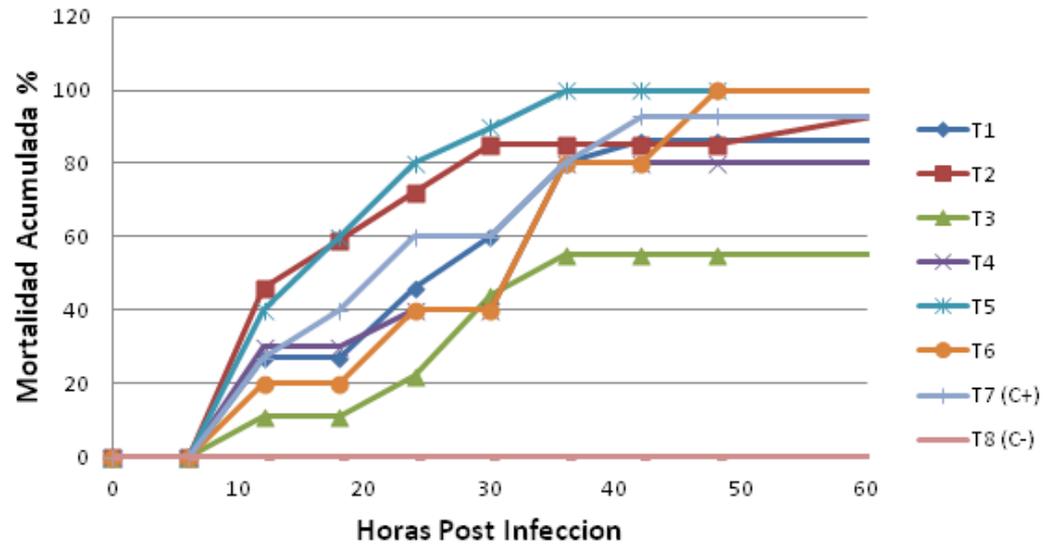
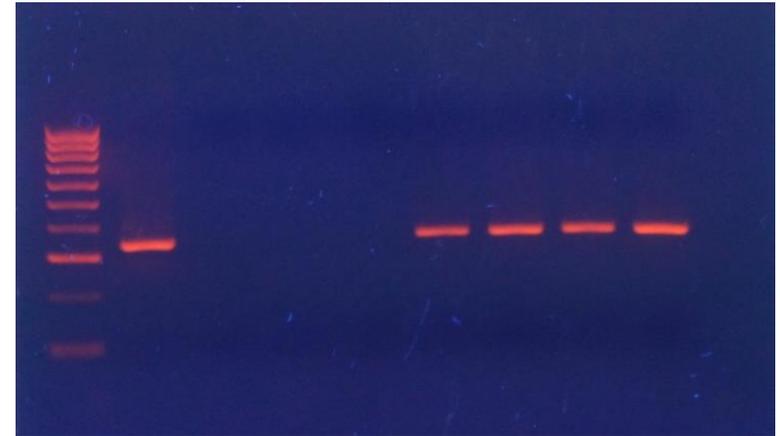
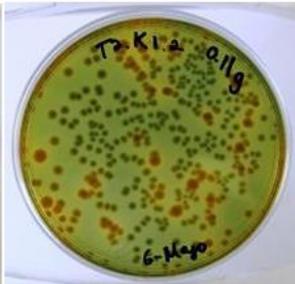
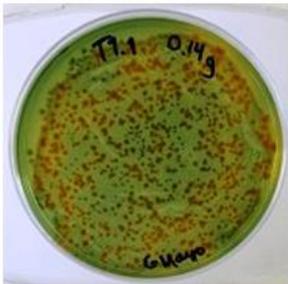
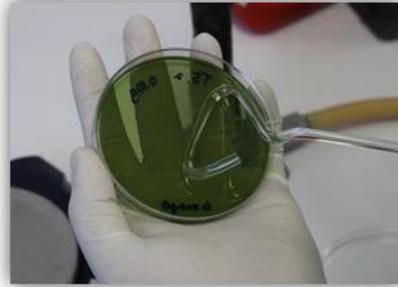


ITSON
Educar para
Trascender





ITSON
Educar para
Trascender



Diagnóstico molecular



ITSON
Educar para
Trascender

Primer	Secuencia blanco	Autor
TLH	Hemolisina termolábil (marcados específico de Vph)	Ribeiro, 2011
TDH, TRH	H. directa termoestable; H. relacionada termoestable.	
IQ2000EMS	1 plásmido de virulencia (PCR, RTPCR, PockIt)	Lightner, 2013
AP1, AP2	2 plásmidos de virulencia	Flegel y Fang, 2013
AP3	Gen que produce toxina	Sirikharin <i>et al.</i> , 2014
LAMP	1 plásmido de virulencia (AP2)	Suebsing <i>et al.</i> , 2013
Multilocus	7 genes de la especie (2 cromosomas)	Gonzales-Escalona <i>et al.</i> , 2008



ITSON
Educar para
Trascender

ESTUDIOS EN DESARROLLO

Identificación Bacteriológica Ciclo 2014



ITSON
Educar para
Trascender

Durante el ciclo 2014 se realizaron 202 análisis en fresco, bacteriológico, microbiológico y de PCR de granjas productoras de camarón del estado de Sonora con el apoyo de COSAES.

Se realizaron 362 aislados bacteriológicos de agua, sedimento y camarón.

En la mayoría de las granjas se encontraron signos clínicos anormales, se realizaron análisis bacteriológicos y PCR para obtener un mejor diagnóstico.



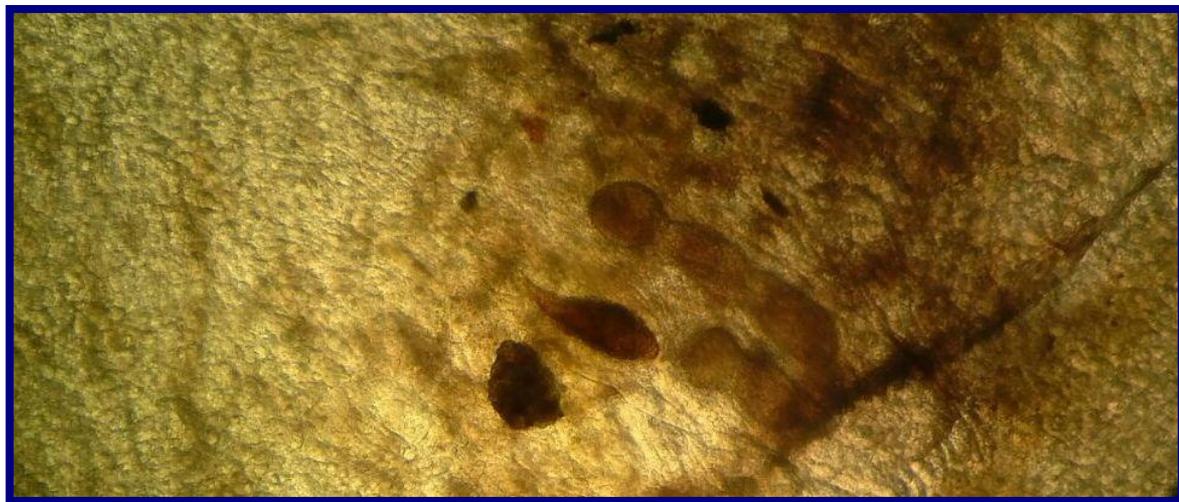
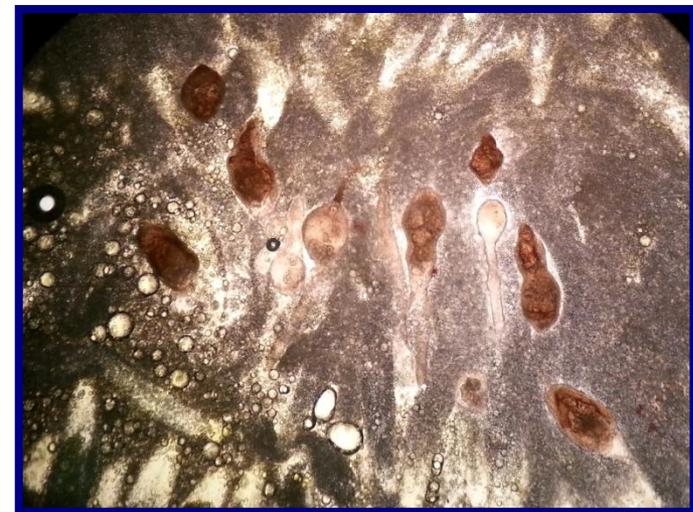
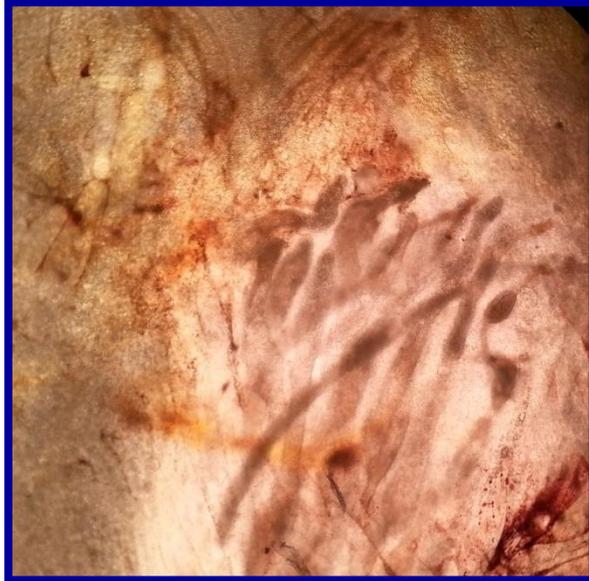


ITSON
Educar para
Trascender



ITSON
Educar para
Trascender





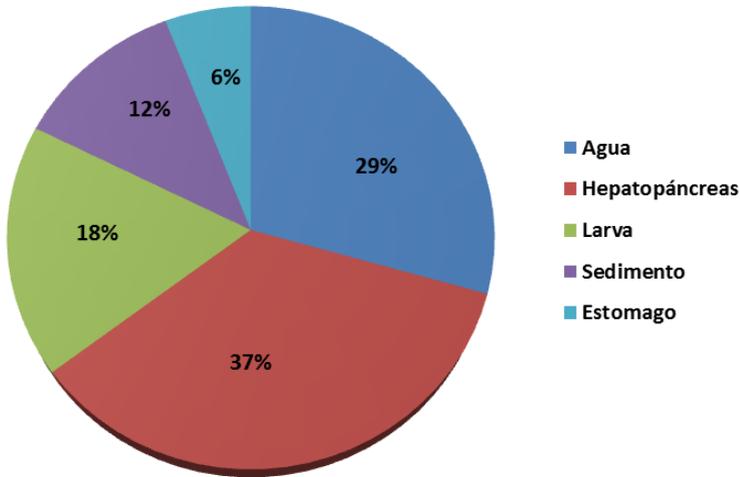
CEPAS IDENTIFICADAS	CICLO 2003	CICLO 2008	CICLO 2013
	PORCENTAJE (%)		
<i>V. parahaemolyticus</i>	12.5	20	26
<i>V. vulnificus</i>	12.5	5	19
<i>V. alginolyticus</i>	11	N.D	8
<i>V. damsela</i>	27	15	3
<i>V. fluviales</i>	30	15	2
<i>Vibrio sp</i>	N.D	10	16
<i>V. hollisae</i>	N.D	N.D	8
<i>V. cholerae</i>	N.D	30	8
<i>V. mimicus</i>	N.D	N.D	3
<i>V. cambellii</i>	N.D	N.D	3

N.D = No Identificada

* 2 Cepas positivas a EMS/AHPND con el kit IQ2000™ AHPND/EMS



Cepas de EMS/AHPND



En la gráfica se observa el porcentaje de las cepas según su tipo de muestra, se obtuvo mayor cantidad de asilados y de cepas positivas de hepatopáncreas.



Muestreos esteros sur de Sonora



ITSON
para
nder

PROYECTO ITSON

Objetivo: Monitorear los cuerpos de agua (esteros) del sur de Sonora mediante bacteriología de agua, sedimento y camarón silvestre para la determinación y confirmación de la presencia del agente causal de las mortalidades que se presentaron en Sonora en ciclo 2013.

Se muestrearon 3 esteros del sur de Sonora: **Atanasia, Melagos y El Riito.**

Tipo de muestras: Camarón silvestre, agua y sedimento.

Tipos de análisis: Análisis en fresco, bacteriología, histopatología y metagenómica.



Resultados de bacteriología en Esteros

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

Identificación	No. Cepas
<i>V. vulnificus</i>	34
<i>V. parahaemolyticus</i>	31
<i>Chromobacterium violaceum</i>	6
<i>V. damsela</i>	5
<i>Chromobacterium menigno</i>	3
<i>V. cholerae</i>	2
<i>Aeromona hydrophila</i>	1



Ninguna cepa positiva para EMS/AHPND

Muestreo de sedimento en estanques



ITSON
Educar para
Trascender

Seguimiento a un estanque afectado por la mortalidad atípica del ciclo 2013

Muestreo de sedimento para análisis bacteriológico en diferentes partes de un estanque afectado por la mortalidad atípica.

Objetivo: Determinar la presencia de la bacteria después de las actividades pre-operativas en un estanque afectado y determinar si el agente es viable e infectivo.



Se muestrearon en distintos puntos del estanque y a diferente profundidad, las muestras se tomaron en bolsas estériles Whirl-pack para transportarlo al laboratorio inmediatamente.

Puntos de muestreo:

E-12 (Entrada 10 cm)

M-3 (Salida 10 cm)

M-1 (E-12 35cm)

E-12 (Entrada 45 cm)

M2 (E-12 45 cm)

E-12 (45 cm)

E-12 (Dren salida)





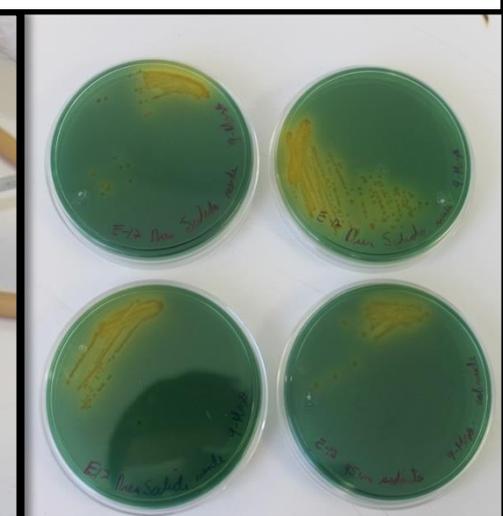
Se realizaron análisis bacteriológicos para cada muestra de sedimento del estanque en Agar TCBS.

Resultados (UFC/g):

E-12 (Entrada 10 cm)	0 UFC/g
M-3 (Salida 10 cm)	0 UFC/g
M-1 (E-12 35cm)	0 UFC/g
E-12 (Entrada 45 cm)	0 UFC/g
M2 (E-12 45 cm)	0 UFC/g
E-12 (45 cm)	1,300 UFC/g amarillas y <u>200 UFC/g verdes*</u>
E-12 (Dren salida)	9,400 UFC/g amarillas y <u>5,800 verdes*</u>

*Colonias aisladas se analizaron por PCR con el Kit IQ2000™ AHPND/EMS .

Resultados: **positiva E-12 dren de salida para EMS/AHPND**



Muestreo de zooplancton



ITSON
Educar para
Trascender

Muestreo de copépodos para análisis bacteriológico en el cárcamo de bombeo de la Junta local Atanasia (Sonora).

Objetivo 1: Determinar la presencia de agentes patógenos bacterianos y virales en copépodos mediante técnicas de microbiología y biología molecular para obtener el estatus sanitario.

Objetivo 2: Obtener organismos silvestres (Copépodos) para monitorearlos en el laboratorio.



Desafíos con copépodos

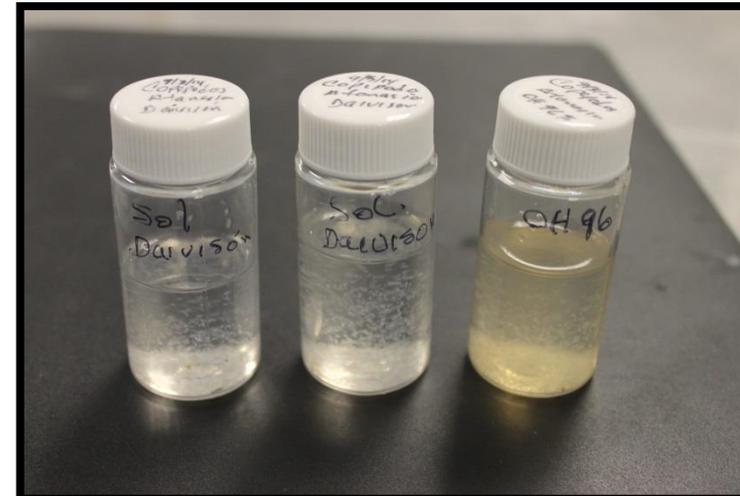


ITSON
Educar para
Trascender

Se desafiaron los copépodos con una cepa de *V. parahaemolyticus* (EMS/AHPND) positiva por PCR (IQ2000™ AHPND/EMS) provenientes de aislados de camarón del ciclo 2013.

Se instalaron peceras con un volumen de 20 litros de agua marina filtrada y previamente clorada. La densidad fue de 1650 copépodos/Litro. Inóculo fue de 1×10^6 UFC/ml.

Resultados: positivos para EMS/AHPND.



Bioensayo desafío bacteriano (EMS/AHPND)



ITSON
Educar para
Trascender

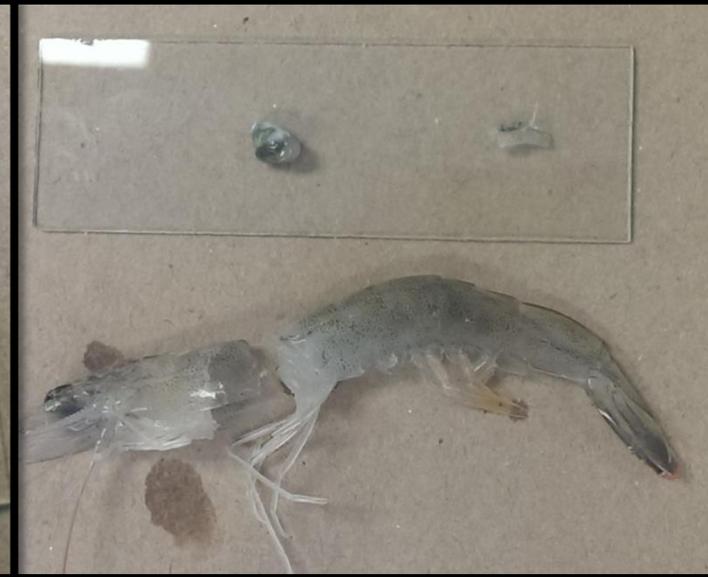
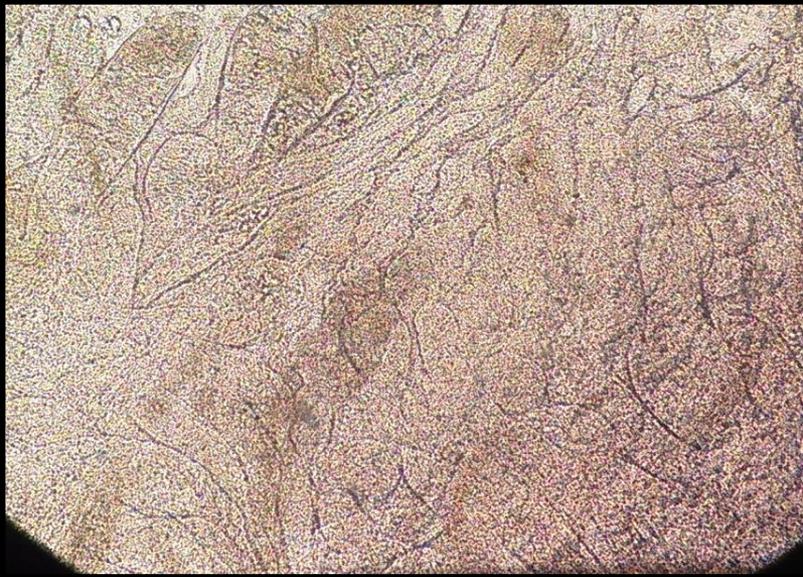
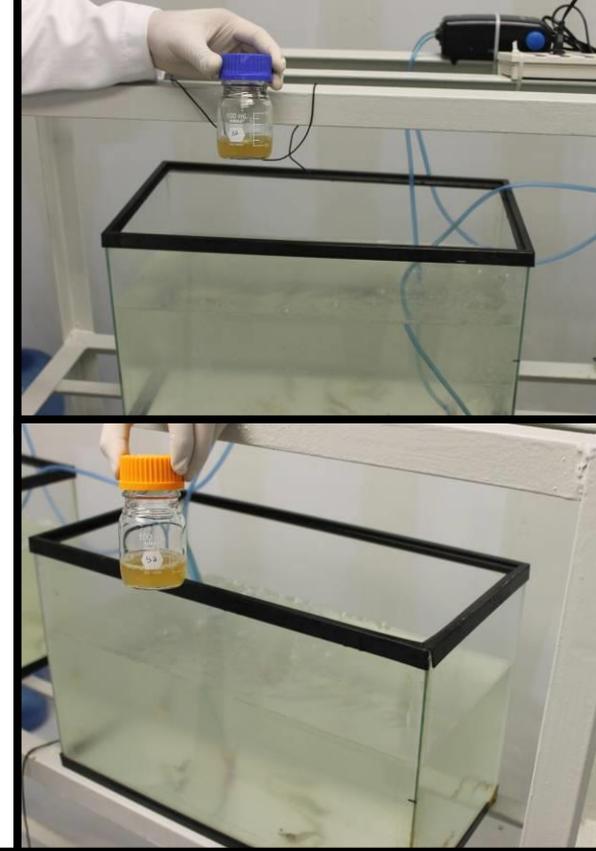
Se realizó un bioensayo preliminar con los aislados positivos por PCR a EMS/AHPND, en la cual se desafiaron camarones con la metodología de Tran (2013) modificada en la cual el inóculo se aplicó directo a las peceras con camarón.

- ❖ Se realizaron muestras para análisis bacteriológico de hepatopáncreas y estómago.
- ❖ Se fijaron en solución Davidson órganos y camarón entero para histopatología.
- ❖ Se fijaron hepatopáncreas en OH al 96% para PCR.



Resultados:

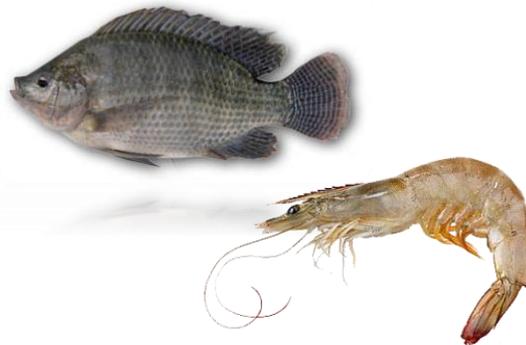
Cepa 1: 100% de mortalidad a las 24 horas. Análisis de PCR e Histopatológicos **positivos a EMS/AHPND**.





RECOMENDACIONES

- **Bi-cultivo camarón con tilapia y biofloc:** con la maduración microbiológica las bacterias benéficas compiten con las patógenas.



- **Biofloc:** floculos de bacterias, microalgas, protozoarios, materia orgánica (heces y alimento) y zooplancton.
- Equilibrio en la calidad del agua y producción de nutrientes (Hargreaves, 2013; Boonsirm, 2014).

GRACIAS POR SU ATENCIÓN



ITSON
Educar para
Trascender



LA SA
LABORATORIO DE ANÁLISIS
DE SANIDAD ACUÍCOLA