V. DISCUSIÓN.

V. 1. De las zonas de muestreo.

La zona norte de Nayarit fue una de las más afectadas ya que se encontró la presencia de los cuatro agentes virales en cuestión, con prevalencias que variaron entre el 14.3 % (1/7) para TSV y YHV, 57.1 % (4/7) para WSSV y el 100 % (7/7) para IHHNV.

El sur de Sinaloa fue la zona que se encontró en mejores condiciones sanitarias. La presencia de YHV fue nula. Tampoco fue posible detectar la presencia de WSSV con las pruebas de PCR, sin embargo con el DAV resultó positivo en 2 de 7 muestras (prevalencia del 28.6 %), la prevalencia más alta fue la del IHHNV la cual alcanzó el 42.9 % (3/7), y por último en el caso de TSV ésta fue del 28.6 % (2/7).

En el centro de Sinaloa al igual que en el norte de Nayarit fueron detectados los cuatro virus, sólo que ahora con prevalencias más altas con valores para WSSV y TSV del 66.7 % (2/3) y del 100 % (3/3) y 33.3 % (1/3) para IHHNV y YHV, respectivamente.

V.2. De los agentes virales.

V.2.1. IHHNV.

De manera global IHHNV fue el que tuvo la tasa de prevalencia más alta con un valor de 76.5 % (13/17). A partir de los problemas que ocasionó la presencia de IHHNV en cultivos de *P. stylirostris* en los estados de Sinaloa y Sonora a finales de los 80´s y principios de los 90´s (Lightner *et al.*, 1992b y c), Lightner *et al.* (1992c) sugirieron que la rápida dispersión de este virus fue de manera horizontal entre una granja y otra; sin embargo, en un sondeo realizado en 1990 por Pantoja-Morales y Lightner (1991) y por Pantoja-Morales (1993) en poblaciones silvestres de la región norte y centro del Golfo de California reportaron que IHHNV estuvo presente con altas tasas de prevalencia. Esto sugiere que la infección fue vertical ya que las poslarvas cultivadas, fueron obtenidas de reproductores colectados de poblaciones silvestres infectadas.

Lo anterior se reflejó en la disminución del 50% del volumen de las pesquerías en 1990 en la mayoría de los puertos de esta región. Esta disminución continuó hasta 1994, en donde a finales de ese año los pescadores de la zona reportaron un incremento en las capturas, observándose una recuperación de esta pesquería, debido posiblemente al

desarrollo de una resistencia de las poblaciones silvestres al virus, a través de procesos de selección natural (Moore, 1991; Hernández, 1992; Rosenberry, 1995; Lightner, 1996b) al grado que la presencia de este virus puede ser asintomática.

V.2.2. WSSV.

Los primeros estudios de WSSV realizados en países asiáticos desde su primera detección hasta a mediados de la década pasada, hablan de que este agente posee una alta virulencia, reportando mortalidades entre el 80 y 100 % una vez que parecen los signos clínicos (Inouye *et al.*, 1994 y 1996; Nakano *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994; Chen, 1995; Flegel *et al.*, 1995a; Wang *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1996; Wongteerasupaya *et al.*, 1995a; Lightner, 1996a).

En estudios posteriores se ha detectado la presencia de WSSV en muestras que no presentan los signos clínicos de este síndrome, tal es el caso de Otta *et al.* (1999) en el que evaluaron la presencia de WSSV en poslarvas y reproductores de *Penaeus monodon* de diferentes laboratorios de la India, además de juveniles cultivados en granjas y juveniles silvestres de la misma especie, entre otros crustáceos, encontrando prevalencias del 48 % (28/58) en las muestras de poslarvas. En el caso de los reproductores, sólo 7 de los 10 organismos mostraron signos clínicos de la enfermedad; sin embargo, el 100 % estuvo infectado, al igual que los juveniles cultivados y los silvestres.

Magbanua *et al.* (2000) realizaron un estudio con poslarvas y juveniles de *P. monodon* en diferentes regiones de Filipinas durante el primer semestre de 1999. Estos investigadores encontraron que de un total de 71 muestras, 16 de 16 que presentaron signos clínicos de WSSV estaban infectadas (100 %) y el resto de las muestras que se tomaron, sin ninguna sospecha de la presencia del virus, 35 de 55 resultaron positivas (63.6 %) con una prevalencia global alrededor del 72 % (51/71).

Después de que WSSV fue detectado por primera vez en América en los cultivos de *Penaeus setiferus* de las costas del Golfo de México en Texas en el año de 1995 (Lightner, 1996a), este agente infeccioso fue reportado por Jory y Dixon (1999) en países de Centro y Sudamérica. Sin embargo, en ese mismo año, aún no se había reportado la presencia de WSSV en granjas de Nayarit, Sinaloa y Sonora (Vega-Pérez, 2003), aunque según algunos técnicos encargados de granjas, ya se le atribuían eventos de alta mortalidad en granjas del Pacífico

mexicano. Para el 2000, fue el segundo virus más abundante con una prevalencia global del 47.1 % (8/17), distribuido en las tres zonas de muestreo (Tabla III).

Los organismos que resultaron infectados por WSSV presentaron en algunos casos una sintomatología que coincidió con la descrita por la mayoría de los autores (Inouye *et al.*, 1994; Momoyama *et al.*, 1994; Nakano *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994 y Lightner, 1996a; Karunasagar *et al.*, 1997), pero en ninguno de los casos se observaron manchas blancas ni mortalidades masivas. La razón de esto pudo ser que la infección se detectó en estadios muy tempranos, donde aún no se presentaron los signos clínicos más evidentes, ya que días posteriores al muestreo se empezaron a presentar fuertes eventos de mortalidad en granjas del sur de Sinaloa, las cuales fueron atribuidas a este síndrome (Espinosa-Angulo *com pers.*).

Un par de año después fue reportada la presencia de WSSV por Mijangos-Alquisires (2002) en organismos silvestres colectados en el 2001 frente a la costa norte de Sinaloa.

V.2.3. TSV.

La prevalencia global de TSV fue del 29.4 % (5/17); su presencia fue detectada en las tres zonas de muestreo. Según la clasificación hecha por Lightner *et al.* (1995), Lightner (1996a) y Hasson *et al.* (1999), los organismos infectados por este virus se encontraron en la fase de transición a la fase crónica, ya que a pesar de que presentaron algunos de los síntomas más evidentes de TSV, su desarrollo se reportó de manera normal, incluyendo sus actividades motoras, alimentación y de crecimiento, observando casos de mortalidad sólo en aquellas muestras que resultaron infectadas por más de dos agentes virales, tal es el caso de la 00 NAY 5-1, 00 SIN C 4-1 y 00 SIN C 5-1.

Zarain-Herzberg y Ascencio-Valle (2001) evaluaron las tasas de prevalencia de TSV en muestras del estado de Sinaloa colectadas entre 1995 y 1998, con técnicas de histología (tinción Hematoxilina & Eosina) y sonda molecular (hibridación *in situ*), encontrando tasas de prevalencia global del 44.8 % (13/29) en 1995, con un máximo de 81.8 % (27/33) en 1996 y posteriormente una disminución a 47.8 % (11/23) y 34.7 % (8/23) en 1997 y 1998, respectivamente. Estos investigadores concluyeron que tal disminución estuvo relacionada con el cambio de *L. vannamei* que es el hospedero de mayor susceptibilidad a *L. stylirostris* el cual posee una resistencia natural al virus (Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a;

Overstreet *et al.*, 1997).

Posteriormente, Vega-Pérez (2003) encontró la presencia de TSV en muestras colectadas en 1999 en granjas de las costas de Nayarit, Sinaloa y Sonora, con tasas de prevalencia global del 54.5 % (12/22).

Considerando solamente las muestras colectadas en el estado de Sinaloa, tenemos que para 1999 la prevalencia de TSV fue del 57.1 % (8/14) (Vega-Pérez, 2003), la cual reflejó una disminución al 40.0 % (4/10) en las muestras colectadas para este estudio.

El aumento en las tasas de prevalencia para el estado de Sinaloa a partir de 1999, posiblemente se debió a que en ese mismo año *L. vannamei* empezó a retomar su posición dominante sobre *L. stylirostris* en los cultivos de esta entidad o bien a que las técnicas de detección empleadas en los estudios realizados en 1999 y 2000 son más sensible que las que utilizaron Zarain-Herzberg y Ascencio-Valle (2001) y que estos últimos hayan reportado falsos negativos en muestras con bajos niveles de infección.

V.2.4. YHV.

La presencia de YHV en los cultivos de camarón en México no había sido documentada hasta el momento, sin embargo a principios de 1999 la Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), emitió la Norma Oficial Mexicana de emergencia NOM-EM-001PESC-1999, la cual alertaba a los productores de la posible presencia de dos nuevos virus de origen asiático en territorio mexicano, refiriéndose a WSSV y YHV. En dicho documento se describen los procedimientos de seguridad a seguir en la comercialización de larvas, poslarvas y reproductores, con el fin de evitar la dispersión de estos agentes virales en los cultivos mexicanos. En ese mismo año, Vega-Pérez (2003) encontró la presencia de YHV en muestras colectadas de granjas de las costas de Nayarit, Sinaloa y Sonora con tasas de prevalencia de 40.0 % (2/5), 42.9 % (6/14) y 33.3 % (1/3), respectivamente y una global de 40.9 % (9/22). Estas prevalencias pueden considerarse muy altas, tomando en cuenta que en este estudio, sólo se detecto la presencia de este agente en 2 muestras de 17 analizadas lo que representa una prevalencia global del 11.8 %. Siendo este, el virus menos frecuente en las granjas de las costas de Nayarit y Sinaloa.

Flegel *et al.* (1996) asociaron la presencia de YHV con WSSV en los cultivos de *P. monodon* en países del sureste de Asia. Este fenómeno también fue reportado por

Lightner *et al.* (1997) en los cultivos *P. setiferus* en Texas, sin embargo en este estudio, no se detectó la presencia de WSSV en las muestras positivas para YHV.

V.3. De las condiciones de cultivo.

En la tabla IV se especifican algunas de las características en las que fueron cultivados los organismos de las 17 muestras colectadas para la realización de este estudio.

Tabla IV. Características de las muestras. Origen de la poslarva: L (laboratorio) y S (silvestre); especie: 01 (*L. vannamei*) y 02 (*L.stylirostris*) y sistema de cultivo: 01 (extensivo), 02 (semiintensivo) y 03 (intensivo).

Clave	Origen de la poslarva	Especie	Sistema de cultivo	WSSV	IHHNV	TSV	YHV
00 NAY 5-1	L 01	01	02	+	+	+	–
00 NAY 6-1	L 05	01	02	+	+	–	–
00 NAY 7-1	L 10	01	02	–	+	–	–
00 NAY 7-2	L 10	01	02	+	+	–	–
00 NAY 8-1	S 03	01 y 02	01	+	+	–	–
00 NAY 4-1	S 03	01 y 02	01	–	+	–	+
00 NAY 9-1	S 02	01 y 02	01	–	+	–	–
00 SIN S 3-1	L 07	01	03	–	–	–	–
00 SIN S 5-1	L 09	01	02	+	–	–	–
00 SIN S 5-2	L 09	01	02	+	–	+	–
00 SIN S 6-1	L 03	01	02	–	+	+	–
00 SIN S 6-2	L 03	01	02	–	+	–	–
00 SIN S 7-1	L 02	01	03	–	+	–	–
00 SIN S 8-1	L 08	01	03	–	–	–	–
00 SIN C 3-1	L 04 y L 06	01	02	+	+	–	–
00 SIN C 4-1	S 01	01 y 02	02	+	+	+	–
00 SIN C 5-1	L 10	01	02	–	+	+	+

- La información relacionada con el origen y la especie de la poslarva fue recopilada durante el muestreo.
- La clasificación de los sistemas de cultivo fue hecha de acuerdo con Martínez-Córdova y Porchas-Cornejo (1999).

Las poslarvas con las que se sembraron los estanques de donde se colectaron las muestras fueron obtenidas de 10 laboratorios 76.5 % (13/17), el resto fueron de origen silvestre 23.5 % (4/17), obtenidas de 4 zonas diferentes. El 100.0 % de las poslarvas cuyo origen fue de laboratorio fueron de *L. vannamei*, en el caso de las poslarvas de origen silvestre, se presentó una combinación de esta especie con *L. stylirostris*.

Se realizó un análisis comparativo de la información detallada en la tabla IV, con la intención de establecer alguna relación entre el origen y especie de la poslarva con la presencia y prevalencia de algún virus en particular. Las únicas muestras en las que no se detectó la presencia de los agentes virales en cuestión, fueron la 00 SIN S 3-1 y 00 SIN S 8-1, las cuales fueron sembradas con poslarvas de los laboratorios L 07 y L 08, respectivamente.

No se pudo establecer una clara relación, cuando se compararon los resultados de dos o más muestras con el mismo origen de la poslarva, como es el caso de las muestras 00 SIN S 6-1 y 00 SIN S 6-2 que fueron sembradas del L 03, en ambas se detectó la presencia de IHHNV, pero TSV, sólo se presentó en la primera. Las muestras 00 SIN S 5-1 y 00 SIN S 5-2, fueron sembradas con poslarva del L 09, en la primera se detectó WSSV y en la segunda WSSV y TSV. En el caso de las muestras sembradas del L 10, en la 00 NAY 7-1 se detectó IHHNV, en la 00 SIN S 7-2, WSSV e IHHNV y en la 00 SIN C 5-1, IHHNV, TSV y YHV. En el caso de las muestras sembradas con poslarva de la zona S 03, se detectó WSSV e IHHNV en la 00 NAY 8-1 y IHHNV y YHV en la 00 NAY 4-1. Tampoco fue posible relacionar la presencia de dos o más virus en una muestra.

En el estudio hecho por Zarain-Herzberg y Ascencio-Valle (2000) encontraron que las prevalencias de TSV mantienen una relación directamente proporcional con la cantidad de *L. vannamei* cultivado. Por lo tanto a medida que esta especie fue siendo sustituida por *L. stylirostris* las prevalencias disminuyeron, sin embargo tampoco pudieron asociar esta variable con el origen de la poslarva.

El 17.65 % de las muestras (3/17) fueron obtenidas de sistemas extensivos, otro porcentaje igual (3/17) de sistemas intensivos y el resto, el 64.70 % (11/17) de sistemas semiintensivos. En las muestras de tipo extensivo se encontró la presencia WSSV con una prevalencia del 33.3 % (1/3), IHHNV con un 100.0 % (3/3) y YHV con un 33.3 % (1/3). TSV no se detectó en este tipo de muestras. En las muestras de tipo semiintensivo se detectó la presencia de los cuatro agentes virales con prevalencias de 63.6 % (7/11), 81.8 % (9/11), 45.5 % (5/11) y 9.1 % (1/9), para WSSV, IHHNV, TSV y YHV, respectivamente. En el caso de las muestras de tipo intensivo sólo se detecto IHHNV con una prevalencia del 33.3 % (1/3).

Considerando el número de muestras de cada tipo de cultivo y el número de agentes virales en cuestión, se obtuvo un 41.7 % de resultados positivos (5/12) en las muestras de

tipo extensivo, un 50.0 % (22/44) en las de semiintensivo y un 8.3 % (1/12) en las de intensivo.

Es evidente que las condiciones sanitarias de los sistemas intensivos fue superior a los de los extensivos y semiintensivo, esto pudo deberse al alto desarrollo tecnológico con el que se cuenta en estos sistemas, a demás de los planes estratégicos para la prevención y manejo de enfermedades con los que cuentan. El sistema que se encontró en peores condiciones sanitarias fue el semiintensivo ya que a pesar de que este cuenta con un mayor desarrollo tecnológico que el extensivo, también es mayor la probabilidad de que se presenten factores medioambientales que causen estrés en el camarón y es entonces, cuando regularmente se ha reportando la ocurrencia de epizootias virales en los cultivos de camarón (Zendejas-Hernández, 2003)

Considerando lo anterior, no se encontró ninguna relación entre las condiciones de cultivo, haciendo referencia a factores como ubicación geográfica, origen y especie de la poslarva, sistema de cultivo, étc., con la presencia y prevalencia de los agentes virales en cuestión.

Un aspecto muy importante que debe considerarse, es la presencia de patógenos específicos en el medio natural, tal es el caso de WSSV que se ha detectado en poblaciones naturales de camarones peneidos, así como también en larvas y juveniles de langostas (Panuliruidae), langostinos (Palemonidae) y jaibas (Portunidae) (Richman *et al.*, 1997 y Peng *et al.*, 1998), copépodos, *Artemia* e insectos acuáticos (Hasson *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1995b; Lo *et al.*, 1996b; Chang *et al.*, 1998; Kanchanaphum *et al.*, 1998 y Wang *et al.*, 1998), los cuales pueden infectar los cultivos, una vez que estos vectores son incorporados junto con el agua que se introduce a los estanques de las granjas camaroneras.

V.4. De las técnicas de diagnóstico.

La hibridación *dot-blot* ha sido considerada por algunos investigadores como una herramienta molecular muy útil en el diagnóstico de enfermedades virales, gracias a su sensibilidad y especificidad (Mari *et al.*, 1993a, 1998 y Durand *et al.*, 1996), empleando como molde homogenizados de tejido obtenidos regularmente de organismos procedentes de poblaciones altamente infectadas.

Las pruebas de hibridación *dot-blot* para determinar el grado de prevalencia en las muestras que resultaron positivas a cualquiera de estos agentes con las pruebas de PCR, DAV y

RT-PCR sólo se realizaron para TSV (muestra 00 SIN S 6-1) y YHV (muestras 00 NAY 4-1 y 00 SIN C 5-1) obteniendo tasas de prevalencia relativa del 80.0 % (8/10) y 100.0 % (9/9 y 10/10), respectivamente.

No se reportan tasas de prevalencia relativa para el resto de las muestras ya que la sensibilidad del *dot-blot* fue insuficiente para detectar los bajos niveles de infección presentes en las muestras, cuando se utilizó como molde homogenizados de tejido, por lo que fue necesario que estas pruebas se realizaran a partir de productos de RT-PCR en el caso de TSV y de extractos de ARN en el de YHV.

Con las técnicas de PCR y RT-PCR fue posible detectar la presencia de WSSV, TSV y YHV en muestras cuyo nivel de infección fue muy bajo, las cuales estuvieron conformadas por organismos que aún no mostraron signos clínicos de cualquiera de estos síndromes, debido a que el grado de sensibilidad de estas técnicas les permite detectar la presencia de una sola copia del ADN viral en la muestra y amplificarla más de un millón de veces, haciendo que el fragmento de ADN amplificado se evidencie en la electroforesis (Vázquez-Juárez, 2000; De la Rosa y Bonami, 2002).

Zarain-Hersberg (*com pers.*) obtuvo resultados negativos en pruebas de hibridación en muestras aparentemente sanas (sin signos clínicos), pero que resultaron positivas con PCR (falsos negativos), debido a que esta última es una técnica más sensible la cual detecta bajos niveles de infección, los cuales no pueden ser detectados con hibridaciones.

En un estudio hecho por Magbanua *et al.* (2000) con poslarvas y juveniles de *P. monodon* en Filipinas, encontraron una prevalencia de WSSV de 72 % (51/71) con la técnica de PCR. Posteriormente analizaron las 51 muestras positivas por la técnica de hibridación *western blot* y solamente 6 resultaron positivas (12 %).

Por otro lado, el hecho de que el DAV haya detectado la presencia de WSSV en tres de las muestras que no fue posible con PCR (00 NAY 8-1, 00 SIN S 5-1 y 00 SIN S 5-2) se debe a que el DAV, utiliza una técnica de detección (hibridación *dot-blot* de los productos de PCR) 100 veces más sensible que una electroforesis y 10,000 veces más que el método tradicional de *dot-blot*. Por esta razón el DAV se considera un método de diagnóstico ideal para muestras con bajos niveles de infección.