



T
639.543
P896
C2

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y
Ciencias del Mar



“Diagnóstico, tratamiento y prevención de infestaciones
causadas por gregarinas en camarones *Penaeus vannamei*,
mediante dieta medicada.”

INFORME TECNICO

Previa a la obtención del Título de:

A c u i c u l t o r

Presentada por:

Carlos Alberto Prado Garces

Guayaquil - Ecuador
1996

AGRADECIMIENTO

En forma muy especial al Acuicultor Henry Alvarez A. y al M.Sc. Jerry Landivar Z. quienes me brindaron todas las facilidades y su dedicación para la culminación el mismo

Al Doctor Héctor Bastidas S. Gerente de Ventas de Molinos Champion. S.A., a mis compañeros del laboratorio de patología de camarones de Mochasa, a todas las personas vinculadas de una u otra forma en el desarrollo y realización de este informe técnico.

DEDICATORIA

A MI ESPOSA ROSARIO MOYA, A MI HIJO CARLO ANDRE, A MIS PADRES ABRAHAM PRADO Y LUZMILA GARCES, A MIS SUEGROS ANTONIO MOYA Y ROSARIO MORA, QUIENES ME APOYARON E IMPULSARON CONTINUAMENTE A LO LARGO DE MI CARRERA , CUYA VALIOSA AYUDA FUE DE INCALCULABLE VALOR PARA ALCANZAR ESTE SINGULAR LUGAR.

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos, ideas, y doctrinas expuestas en este informe técnico, me corresponden exclusivamente; y, el patrimonio intelectual de la misma , a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL)



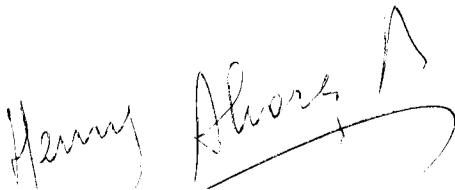
Carlos Alberto Prado Garces



TRIBUNAL DE GRADO ORAL Y ESCRITO



M.Sc. Víctor Osorio Cevallos
Presidente del Tribunal
y Miembro Principal



Acui. Henry Alvarez Arellano
Supervisor del Informe Técnico



M.Sc. Tamara Borodulina de Ross
Miembro Principal

RESUMEN

Las enfermedades están consideradas como uno de los factores biológicos que pueden limitar o impedir el normal desarrollo del cultivo de especies bio-acuáticas.

Mediante el presente informe, se da a conocer una técnica para el diagnóstico, y además se mencionan los tipos de antibióticos que sirven para el tratamiento de infestaciones causadas por gregarinas.

La recopilación de la información fue proporcionada por el Laboratorio de Patología de Camarones de Molinos Champion, empresa dedicada a la venta de alimentos balanceados, y que presta asesoría técnica, siendo ésta un servicio al cliente. La técnica de diagnóstico utilizada, es empleada para dar recomendaciones de alimentos medicados para el tratamiento de gregarinas.

El estudio fue realizado en base a los análisis patológicos (incluye el de gregarinas) hechos a los clientes durante Enero de 1994 a Diciembre de 1995, en tres provincias

El Oro, Guayas y Manabí. El universo de análisis fue de 2466 análisis, que representa 24.660 camarones analizados.

Se pudo confirmar la comprobación de la eficacia de los tratamientos ($P < 0.0001$) con alimento medicado a base de un antibiótico ionóforo, comercialmente conocido como “Alimento medicado G-20”. Así mismo, se demostró estadísticamente las tendencias espaciales y temporales de la infestación causada por gregarinas y además predominio de éstas infestaciones en función del peso.

ÍNDICE GENERAL

	Pág
RESUMEN.....	VI
ÍNDICE GENERAL.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIV
INTRODUCCIÓN.....	1
I.- APARATO DIGESTIVO DE PENAEIDOS.....	3
1.1.- Breve descripción anatómica y fisiológica de sus partes.....	4
1.2.- Intestinos.....	5
1.2.1.- Intestino anterior.....	5
1.2.2.- Intestino medio.....	6
1.2.3.- Intestino posterior.....	7
1.3.- Mecanismo de la alimentación.....	8
1.3.1.- Captura de alimentos.....	8
1.3.2.- Hábitos alimenticios.....	9
1.4.- Susceptibilidad del aparato digestivo a las enfermedades.....	10



II.- LAS GREGARINAS.....	12
2.1.- Biología general de las gregarinas.....	12
2.1.1.- Taxonomía y distribución.....	14
2.2.- Ruta de infectación de las gregarinas en <i>el Penaeus spp.</i>	17
2.3 .- Lesiones causadas por gregarinas	20
2.3.1.- Agentes más comunes de infección.	21
III.- DIAGNOSTICO, TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN.....	23
3 1.- Signos clínicos de la enfermedad.....	23
3.2.- Diagnóstico por microscopía.....	24
3.2.1.- Método directo (cualitativo).	24
3.2.2.- Método por dilución (cuantitativo).	25
3.2.2.1 Descripción del método.....	25
3.2.2.1.1.- Materiales y procedimiento	26
3.3 .- Tratamiento vía alimento medicado	32
3.3.1. Medidas preventivas.....	33
3.3.2. Medida terapéuticas	34
3.3.2.1 Los Coccidiostatos	35
IV.- EVALUACIÓN DE RESULTADOS	37
4.1 .- Influencia de la infección sobre el crecimiento del camarón	38

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1.- Aparato digestivo del camarón peneido..	.4
Figura 2.- Intestino anterior.....	.6
Figura 3.- Intestino medio7
Figura 4.- Intestino posterior.....	.8
Figura 5.- Trofozoito y sus partes.....	.13
Figura 6.- Gregarinas Acephalinas.....	.15
Figura 7.- Gregarinas Cephalinas15
Figura 8.- Formas de Gregarinas.....	.16
Figura 9.- Ciclo de vida de las Gregarinas en camarones..	.19
Figura 10.- Lesiones causadas por Gregarinas en el intestino, observación microscópica.....	.21
Figura 11.- Observación macroscópica de camarón infectado con Gregarinas.....	.23
Figura 12.- Medición de la cámara.....	.30
Figura 13.- Lectura de la cámara.(4 barridos).31
Figura 14.- Trofozoito vivo, antes de tratamiento.....	.36
Figura 15.- Trofozoito muerto, post-tratamiento36
Figura 16.- Análisis de la presencia de Gregarinas (Trofozoitos).40

Figura 17.- Frecuencia de infección Temporal y Espacial.....	42
Figura 18.- Frecuencia de infección según el peso.....	45
Figura 19.- Regresión de la concentración de trofozoitos sobre el peso.....	46
Figura 20.- Seguimiento Pre y Post-medicación con alimento medicado G-20.....	48



ÍNDICE DE TABLAS

Pág

Tabla I.- Microorganismos que infectan al Aparato Digestivo	11
Tabla II.- Análisis de la presencia de Gregarinas (Trofozoitos).	40
Tabla III.- Frecuencia de infección Temporal y Espacial.....	42
Tabla IV.-Frecuencia de infección según el peso..	44

INTRODUCCIÓN

Por mucho tiempo las gregarinas han sido la causa de grandes pérdidas económicas para la industria camaronera. Muchos de éstos problemas, se han suscitado por un desconocimiento de la técnica para el diagnóstico rápido de éstas infestaciones.

Las gregarinas son endoparásitos que causan detenimiento del crecimiento en el camarón infectado. En este negocio de gran riesgo, el tiempo y los crecimientos son fundamentales, por eso con una técnica de diagnóstico efectiva y un buen monitoreo de las piscinas se actuaría a tiempo y de ésta manera se impediría las equivocaciones que originen pérdidas.

Por otro lado, además de un buen diagnóstico a tiempo, se necesita un tratamiento eficiente y para que éste logre su objetivo se debe contar con un alimento medicado eficaz y buen criterio de medicación.

En este informe técnico el lector encontrará todo lo relacionado al diagnóstico, prevención y tratamiento contra infestaciones causadas por gregarinas, así mismo, criterios para realizar una medicación exitosa.

Este informe contiene análisis de muestras tomadas en tres provincias del país (El Oro, Guayas y Manabí), en donde se realizaron monitoreos de piscinas de camarón pre y post-tratadas con un alimento medicado formulado a base de un antibiótico ionóforo (monensina).

Cabe señalar que el presente informe técnico además de ver el efecto del tratamiento, permitirá despejar ciertas dudas que existían sobre:

- El efecto de las gregarinas en el crecimiento del camarón
- La mayor frecuencia de casos en los individuos más pequeños, así como la tendencia a encontrarse mayores concentraciones de gregarinas en los mismos
- La importancia de la zona y estación del año sobre la aparición de casos.

Comercialmente existen otros tipos de alimentos medicados en el país contra las gregarinas, los cuales contienen drogas conocidas tales como: Monteban, Cygro, Nicarbacina, Gromax, Cycostat, Baycox, Coxistac, Duocoxin entre otros. Es de mencionar que algunas de estas drogas se utilizan en **combinacion** con antibióticos (terramininas, nitrofuranos y sulfanamidas) con el objeto de provocar sinergismo. Cabe señalar que los resultados con éstos productos no se los podría comparar con los obtenidos, puesto que en muchos casos no se **realizan** los seguimientos posteriores al tratamiento, o sí los hacen, estos no son proporcionados al público.

1. APARATO DIGESTIVO DE PENAEIDOS

1.1.- Breve descripción de sus partes

El aparato digestivo se inicia con una abertura simple o boca, que se comunica a un corto esófago, el que termina en la cámara cardiaca del intestino anterior.

El intestino medio, nace con el divertículo anterior y se proyecta longitudinalmente hasta el divertículo posterior. Es en la región mas anterior del intestino medio donde se encuentran las aberturas que reciben las secreciones enzimáticas de la glándula media.

El intestino posterior es de un lumen más grueso y recorre un pequeño tramo del abdomen hasta su finalización de un ano simple (Lockwood, 1975).

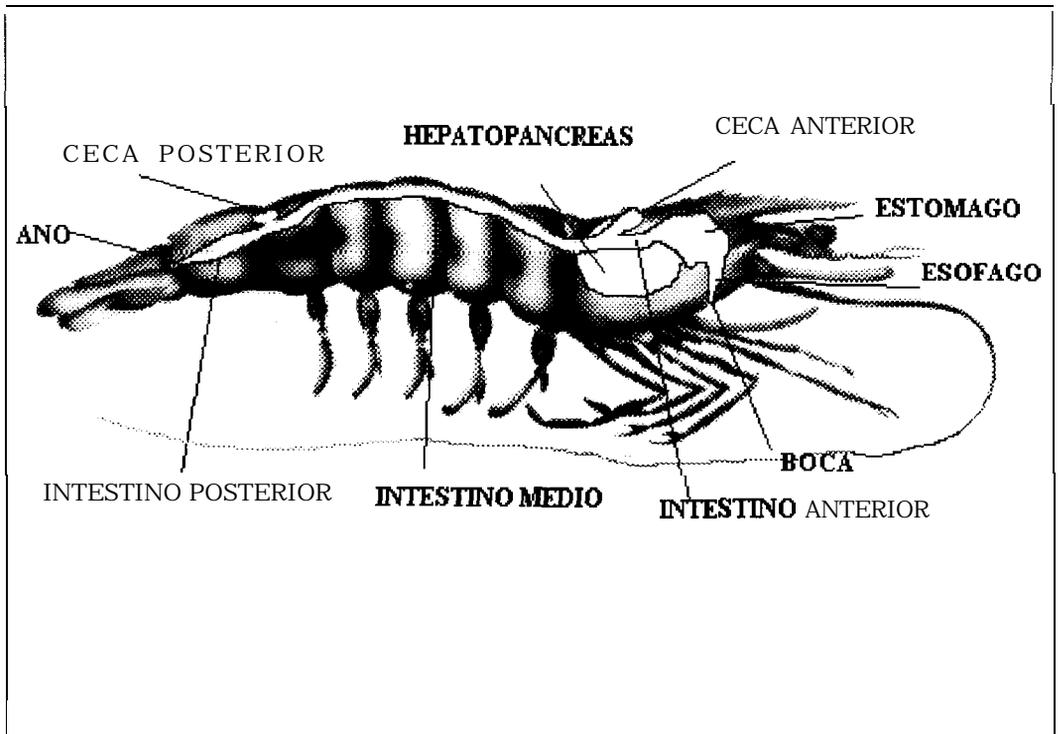
Los crustáceos no tienen capacidad de masticación y los alimentos se almacenan en la cámara cardiaca, donde son triturados por la acción del molino gástrico, que es una combinación de dientes y dentículos de las cámaras.



Las partículas de tamaño apropiado pasan al hepatopáncreas donde se mezclan con enzimas y luego son absorbidas. Las que no son absorbidas siguen el curso del intestino hasta el ano. Sólo la región pilórica del aparato digestivo no está recubierta por quitina. (Lockwood, 1975).

El hepatopáncreas tiene tres funciones: proporcionar enzimas para desdoblar alimentos (proteasas, lipasas y amilasas). También como almacén de reservas de glucógeno y por último para la asimilación de sustancias alimenticias.

FIGURA 1. El aparato digestivo del camarón peneido



1.2.- Intestinos

El intestino consiste de tres partes; intestino anterior, intestino medio e intestino posterior. El intestino anterior y posterior tienen origen ectodérmico y recubierta quitinosa.

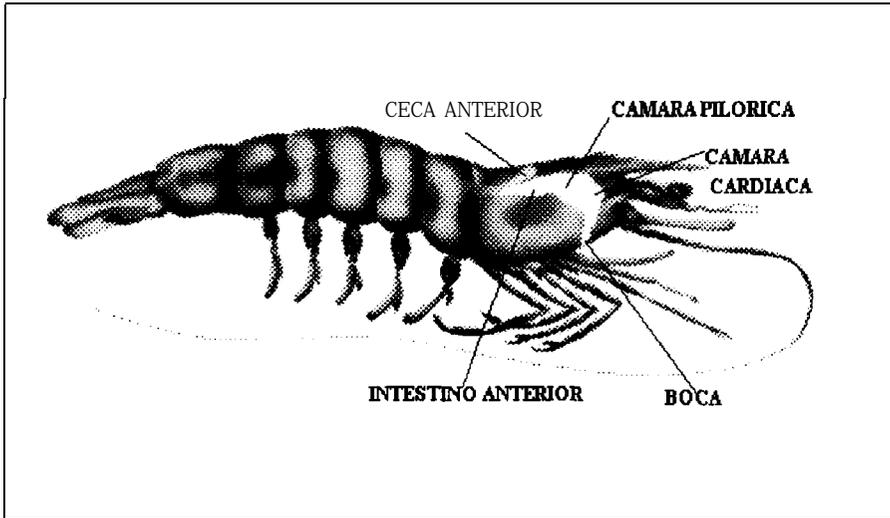
El intestino medio es de origen endodérmico, sin quitina, porque está mas relacionado con actividad enzimática (Lockwood, 1975).

1.2.1.- Intestino anterior

Es de estructura quitinosa y presenta una cámara anterior y posterior provista con mecanismos de trituración, filtro y selección.

Las paredes internas en las cámaras de los decápodos, presentan **profundos** dobleces y reforzados por platos calcificados u osículos, que se encargan de la trituración y mezcla de los alimentos. Aquí no se dan mayormente procesos digestivos (Lockwood 1975).

FIGURA 2. Intestino anterior



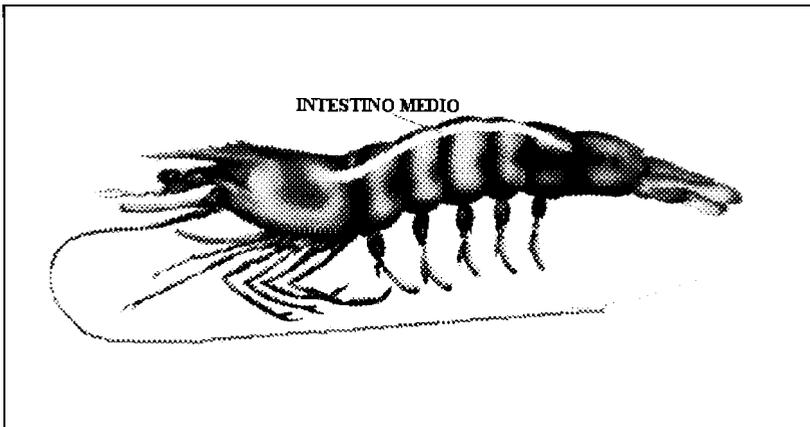
1.2.2.- Intestino medio

El intestino medio está morfológicamente asociado con las glándulas y divertículos. Es a nivel de esta porción del intestino donde se encuentran los más variados tipos de células epiteliales que recubren internamente esta porción y donde se da una gran actividad de secreción enzimática y de digestión.

El epitelio de la mucosa está compuesto de células columnares simples, que se encuentran sostenidas por una base de membrana, una capa de tejido muscular circular y finalmente por una capa muscular longitudinal. (Bell and Lightner 1988).

El lumen está recubierto por un borde de microvellosidades (Bell and Lightner, 1988). Y es en este lugar donde mayormente las gregarinas parasitan el camarón.

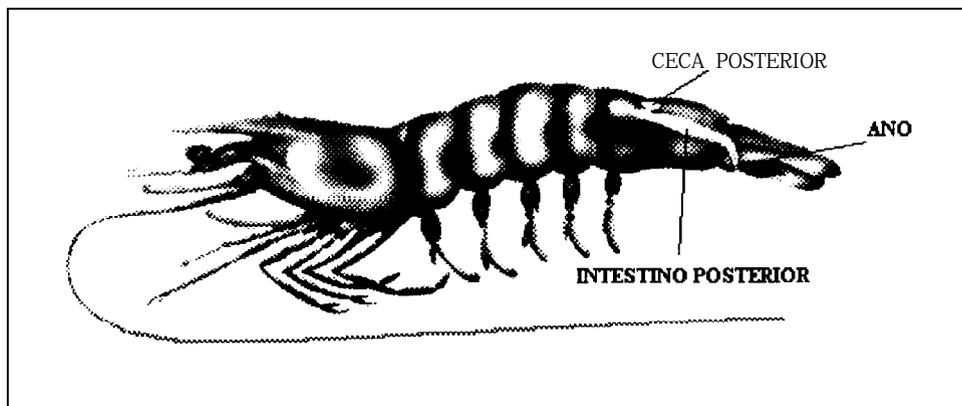
FIGURA 3. Intestino medio



1.2.3.- Intestino posterior

Corresponde a la última porción del aparato digestivo y termina en el ano. Presenta múltiples pliegues para dar una mayor capacidad de absorción. En esta porción encontramos flora bacteriana normal (Lightner, 1988), y también es sitio de alojamiento de los gametocistos de las gregarinas (Johnson, 1978).

FIGURA 4. Intestino posterior



1.3.- Mecanismos de la alimentación

El camarón peneido durante su desarrollo va sufriendo metamorfosis que no solamente implican cambios en la anatomía del aparato digestivo, sino que también se van dando alteraciones de su fisiológica, como el de aminorar o incrementar las secreciones enzimáticas en las distintas etapas. Estos cambios también se reflejan en sus hábitos de alimentación, que nacen con la tendencia a ingerir fitoplancton y terminan consumiendo materia orgánica del bento. (Lockwood, 1975).

1.3.1.- Captura del alimento.

La captura del alimento en los camarones varía de acuerdo a su estadio, así tenemos que en las etapas larvales zoea y mysis la captación

del alimento está dada por la acción rítmica que ejercen los apéndices sobre el agua, los cuales provocan corrientes que pasan cerca de la boca.

Los estadios de postlarvas tienen en su cefalotórax ocho pares de apéndices, de los cuales los tres primeros participan en la captación del alimento hacia la boca y toman el nombre de maxilípedos, los restantes son patas caminadoras (Enciclopedia Grolier, 1993).

La detección de los alimentos se complementa por la acción de los órganos sensoriales o quimiorreceptores. (Lockwood, 1975).

1.3.2- Hábitos alimenticios

Los hábitos alimenticios del camarón están relacionados con su comportamiento, los más pequeños por lo general son pelágicos, es decir que se mueven en la columna de agua y por ende su alimentación es a base de fito y zooplancton de esta franja. Los adultos son de hábitat bentónicos, es decir que se alimentan de plancton y restos orgánicos que se depositan en el fondo.

1.4.- Susceptibilidad del aparato digestivo

El aparato digestivo es susceptible a contraer problemas de tipo parasitarios, bacterianos, vírales y problemas no infecciosos. Estas enfermedades tienden a ser específicas en el ataque a algún órgano en particular. Los problemas parasitarios, por lo general se dan a nivel de intestino y entre sus causantes principales están las gregarinas, los nemátodos y microsporidios.

En la tabla I, se observan los principales microorganismos que infectan al aparato digestivo (Lightner, 1996).

TABLA 1. Microorganismos que infectan al aparato digestivo

MICROORGANISMOS	GENEROS O TIPOS	ÓRGANO AFECTADO	ESPECIES AFECTADAS
VIROS	HPV, MBV, BP, REO-LIKE	HEPATOPANCREAS	<i>P. merguiensis</i> <i>P. semisulcatus</i> <i>P. chinensis</i> <i>P. esculentus</i> <i>P. monodon</i> <i>P. japonicus</i> <i>P. indicus</i> <i>P. vannamei</i> <i>P. stylirostris</i>
BACTERIAS INTRACELULARES	RICKETTSIA-LIKE	HEPATOPANCREAS	<i>P. vannamei</i> <i>P. aztecus</i> <i>P. setiferus</i> <i>P. stylirostris</i> <i>P. californiensis</i> <i>P. merguiensis</i> <i>P. marginatus</i>
BACTERIAS	VIBRIOS, PSEUDOMONAS, AEROMONAS	HEPATOPANCREAS INTESTINO MUSCULOS,	Todos los Penaeidos
PARASITOS	GREGARINAS	INTESTINO	Todos los Penaeidos
"	MICROSPORIDIOS	HEPATOPANCREAS, INTESTINOS, MUSCULOS, VASOS SANGUINEOS	Todos los Penaeidos.
"	HAPLOSPORIDIOS	HEPATOPÁNCREAS	<i>P. vannamei</i> <i>P. monodon</i> <i>P. stylirostris</i>
ALGAS	VERDES-AZULES	INTESTINO (Enteritis hemocítica)	Todos los Penaeidos

También se han observado nemátodos del género *Contracaecum spp.*, parasitando el intestino medio del *Penaeus vannamei*, en muestras fresca. (Observación personal).

II. LAS GREGARINAS

2.1.- Biología general de las gregarinas

Las gregarinas son parásitos celozoicos de los invertebrados, especialmente en los artrópodos, anelidos y moluscos. Obtienen su alimento por ósmosis en la cavidad del intestino del huésped. Se lo observa grande y vermiforme (Kudo, 1996).

Sus formas maduras o trofozoitos llegan a medir unas 50 micras de longitud, mientras que sus formas inmaduras, gametocistos llegan a un tamaño de hasta 200 micras de diámetro (Mehlhorn et al, 1994).

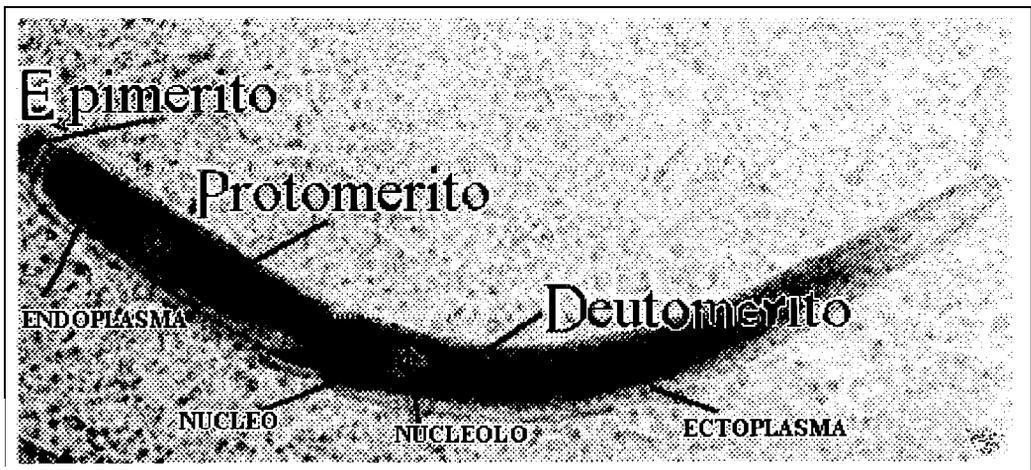
El cuerpo está cubierto por una membrana exterior definida y su citoplasma está claramente diferenciado en ectoplasma y endoplasma. El primero tiene mionemas, los cuales permiten al organismo realizar movimientos deslizantes (Kudo, 1966).

La parte anterior más pequeña es el **protomerito** y la parte posterior es el **deutomerito** que contiene un núcleo. El protomerito puede poseer un

anterior, a esto se le llama **epimerito**, que se expande libremente y es empleado como un succionador movable para adherirse al epitelio del intestino (Kudo, 1966).

Muchas gregarinas son solitarias y otras se encuentran en asociación extremo con extremo, esta asociación se llama sizigia. Al individuo anterior se lo conoce como primito y al posterior como satélite (Kudo, 1966).

FIGURA 5. Trofozoito y sus partes.



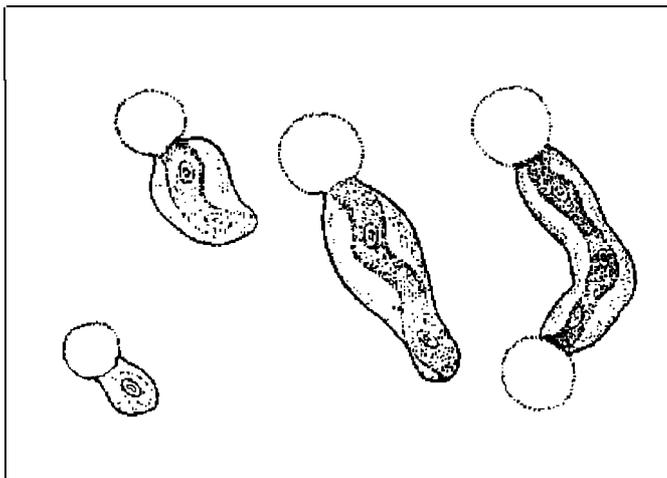
2.1.1.- Taxonomía y distribución

Se ha reconocido la siguiente clasificación (Kudo 1966):

REINO	Protista
PHYLUM	Protozoa
CLASE	Sporozoa
ORDEN	Gregarinida
	Coccidida
	Haemosporidia
	Haplosporida
SUBORDEN	Eugregarinina
SUPERFAMILIA	Acephalinoidea
	Cephalinoidea
GENERO	Nematopsis
	Cephalolobus
	Paraophioidina

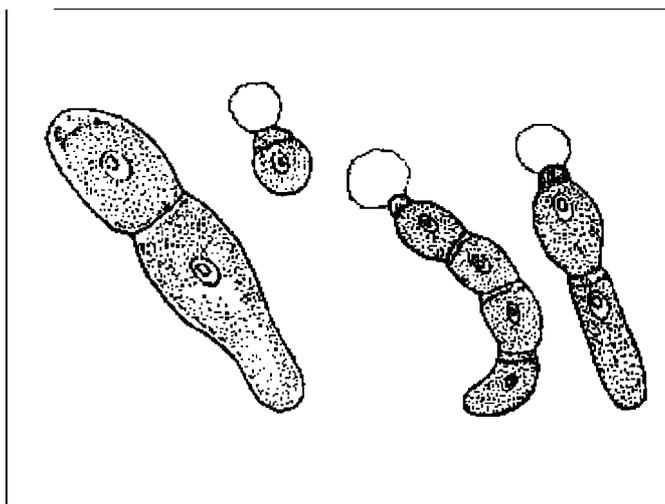
En Acephalinoidea, el cuerpo es de un sólo compartimiento (trofozoito no septado).

FIGURA 6. Gregarinas Acephalinas



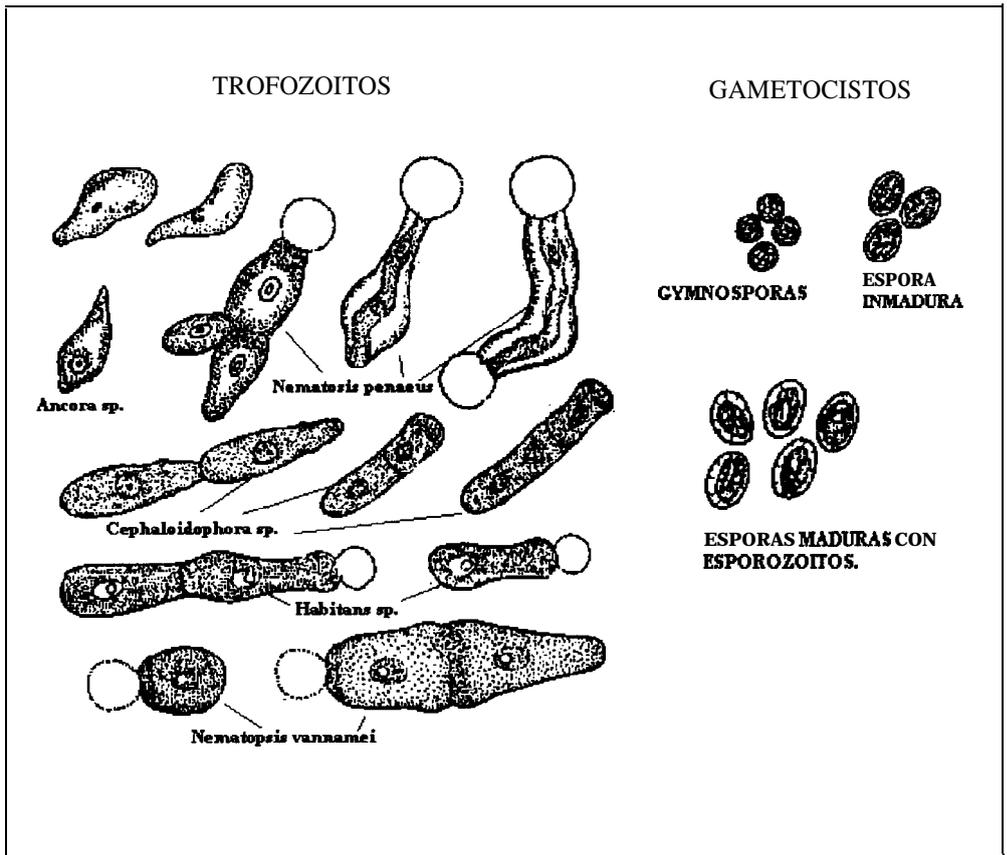
En Cephalinoideas, el cuerpo está dividido en dos compartimientos por un septo ectoplasmático (trofozoito septado).

FIGURA 7. Gregarinas Cephalinas



La distribución geográfica de las poblaciones de gregarina que parasitan al camarón salvaje como al de cautiverio han sido observada en todo los continentes (Lightner 1996).

FIGURA 8. Formas de gregarinas



2.2.- Las gregarinas en el camarón *Penaeus vannamei*

Según Johnson 1988 y Lightner 1996, la vía de contagio presenta la siguiente ruta. (Ver figura 9)

A.- En el camarón las infecciones de gregarinas resultan por la ingestión de un hospedador intermediario infectado que contiene esporas de gregarinas, que generalmente lo encuentra en el detritus del fondo de las piscinas.

B.- Las esporas ingeridas germinan para convertirse en esporozoitos los mismos que se adhieren a la cubierta quitinosa de las paredes de la parte terminal del filtro gástrico o invaden o se adhieren a las células del epitelio del intestino medio o a las de la ceca anterior del mismo intestino, con su proceso especializado.

C.- Una vez adherido pasan al estadio de trofozoito, el cual consiste de un epimerito, y un protomerito con núcleos distintivamente centralizados.



D.- Los trofontes se liberan de su adhesión en el estómago o intestino medio, y se convierten en el estadio sporadino del parásito. y pasan al intestino posterior donde se acumulan.

E.- En el intestino posterior cada célula individual de sporadina, se desarrolla a gametocisto, con algunas células formando microgametos y otras formando macrogametos.

F.- Cuando los gametocistos se rompen, los gametos se liberan y se fusionan formando zigotes (gymnosporas) que son liberados al ambiente externo.

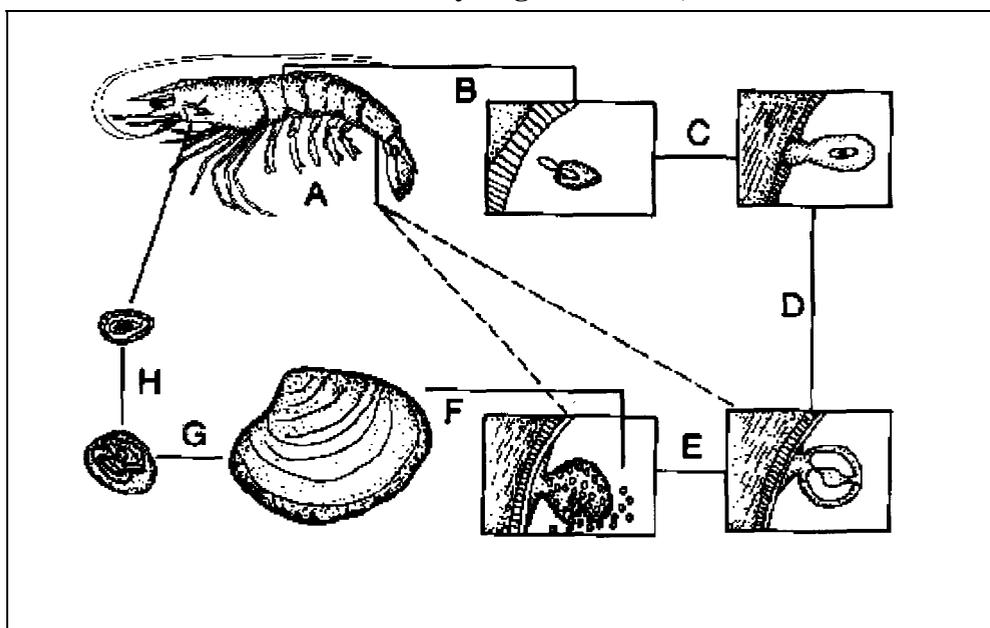
G.- Las zygosporas son ingeridas por un molusco bivalvo o por gusanos anelidos como *el Polydora cirrhosa* muy comúnmente llamado poliqueto que vive en el fondo de las piscinas de camarones.

El intestino del gusano o molusco se infecta por la gregarina y el proceso de la sporogonia ocurre en las células epiteliales infectadas

H.- Los esporocystos son liberados por medio de las pseudoheces de los moluscos e ingerido por un camarón, o por consumir un poliqueto infectado. Los esporozoitos son liberados en el tracto gastrointestinal del camarón e infectan al estómago posterior o al

intestino medio adhiriéndose en la cutícula del estómago 0 penetrando a la membrana celular de la célula huésped.

FIGURA 9. Ciclo de vida de gregarinas en camarones, según Johnson 1988 y Lightner 1996,



Según estudios realizados en laboratorios con gusanos poliquetos (*Polydora cirrhosa*) y gregarinas para conocer el tiempo que toma una infección alta (Prepatencia), se llegó a determinar que es de 14 días (Lightner 1993).

2.3.- Lesiones causadas por gregarinas

G.H. Ball, Universidad de California (1950), a través de cortes histopatológicos observó efectos perjudiciales en crustáceos marinos tales como la oclusión prácticamente completa de los pequeños ductos de la caeca, la destrucción del tejido epitelial del intestino por efecto de la presión que ejercen los protomeritos de los trofozoitos de las gregarinas.

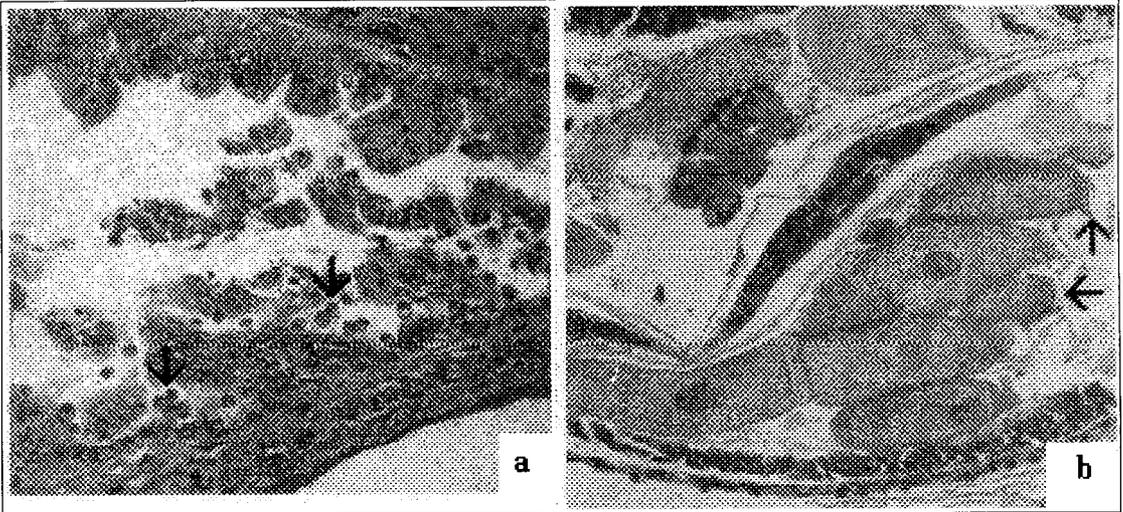
La acción continúa succionadora de las gregarinas en los tejidos es favorecida por el estímulo del contacto (thigmotactio) que mantiene al parásito en contacto con los tejidos adyacentes y entre ellas mismas, una vez que ha iniciado la acción de la delaminación del tejido epitelial intestinal.

Daños en la mucosa podrían ser la ruta de entrada de una potencial bacteremia causada por bacterias oportunistas *Vibrios spp* (Lightner, 1996).

En las gregarinas acephalinas se ha observado que la infección empieza con la ingestión de las esporas maduras por un huésped en cuyos

tubos digestivos son liberados los trofozoitos y se desarrollan allí y atraviesan la pared del intestino

FIGURA 10. Lesiones causadas por gregarinas en el intestinos, observación microscópica



a) Corte sagital del intestino medio, infección severa de esporozoitos y estadios muy temprano de trofozoitos de *Nematopsis sp.* que se están adhiriendo a la mucosa. La presencia de la infección provoca una hiperplasia del epitelio de la mucosa, y que podría ser la vía de entrada para una bacteremia causada por *Vibrio sp.*

b) Corte sagital de la parte anterior del intestino medio, trofozoitos de gregarinas de *Cephalolobus sp.* parasitando el lumen, se puede apreciar como adhieren con su epimerito (ver las flechas) a la cutícula del estómago posterior.

2.3.1.- Agentes más comunes de infección

Los tres géneros más comunes que infectan al camarón son :

- *Nematopsis spp.*
- *Paraophioidina spp.*
- *Cephalolobus spp.*

Los esporozoitos de los generos de *Nematopsis spp.* y *Paraophioidina spp.* tienden a desarrollarse a trofozoitos en el intestino medio, mientras

que el genero *Cephalolobus spp.* lo hace en el **estómago** posterior (Lightner 1996).

III. DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

3.1.- Signos clínicos de la enfermedad

Las poblaciones severamente afectadas de camarones juveniles podrían tener crecimientos reducidos y elevada conversión alimenticia. En individuos severamente afectados se podría ver una decoloración amarillenta del intestino medio a través de la cutícula del abdomen (Lightner 1996).

FIGURA II. Observación macroscópica de camarón infectado con gregarinas



Coloración amarillenta-rojiza del intestino en camarones con síntomas de la enfermedad

3.2.- Diagnóstico por microscopía

La palabra diagnóstico significa, el acto de reconocer una enfermedad mediante exámenes y signos (Diccionario Universal Aula , 5^{ta} edición, 1991).

En este tipo de diagnóstico podemos reconocer la enfermedad mediante algunos métodos.

3.2.1.- Método directo (cualitativo)

El método directo es por observación al microscopio en lente de 10X, su análisis es cualitativo, es decir que podemos ver la presencia del parásito en el intestino del camarón infectado. Su observación se puede realizar mediante técnica de montaje húmedo o por cortes histológicos.

El montaje en húmedo consiste en raspar el intestino del camarón para obtener su contenido y ponerlo directamente en un porta-objeto con una gota de lugol diluido, luego se lo cubre con una laminilla cubre-objeto para su examinación con lente de 10X.

La técnica para la observación de cortes histológicos es mas complicada y por ende su demora es mayor, los cortes histológicos

con ayuda de tinciones proporcionan más detalles de las estructuras a observar. En los análisis de gregarinas se usa tinciones de eosina y hematoxilina.

3.2.2.- Método por dilución (cuantitativo)

Este método fue desarrollado por el Dr. Harry Daniels* quien trabajó en la camaronera DIBSA, compañía asociada a Molinos Champion.S .A. Esta técnica fué incorporada al laboratorio patológico de la camaronera, así como también al de la compañía (servicio al cliente).

* Ex -profesor de la ESPOL (Facultad de Ingeniería Marítima Y del Mar especialización Acuicultura).

3.2.2.1.- Descripción del método

Este método consiste en obtener una muestra homogénea y representativa del contenido intestinal de los camarones a analizar y mediante el conteo de los trofozoitos se establece el grado de infestación.

3.2.2.1.1.- Materiales y procedimiento

Los materiales a utilizar para la aplicación de esta técnica son:

- Microscopio (lente de 10X)
- Cámara de Sedgwick Rafter
- Contador
- Caja petri
- Espátula
- Bisturí
- Tijera
- Pinza
- Pipeta (5 ml)
- Pera (para pipeta)
- Tubo de ensayo (30 ml)
- Solución de Lugo1
- Papel toalla



El procedimiento para la aplicación de la técnica es el siguiente:

a) Selección y transporte de muestra.- Para seleccionar una muestra representativa se debe tomar camarones al azar de algunos puntos de la piscina, escogiendo a los que presenten intestinos vacíos y color amarillento que son signos macroscópicos de la enfermedad causada por gregarinas. Se lo transporta lo más rápido posible con hielo.

No se debe tener al camarón vivo por mucho tiempo ya que en el trayecto éste puede ir defecando y por ende liberar cierta cantidad de gregarinas

b) Preparación de solución de lugol.- En una fiola se mide 300 ml de agua destilada y se adiciona 2 gramos de Yoduro de Potasio, se disuelve y luego se incorpora 1 gramos de Iodo metálico y se procede a disolver, esta solución sirve para tinción y fijación de las gregarinas.

c) Preparación de muestra .- Se deben seguir los siguientes pasos:

- 1.- Se pesa 10 camarones, para obtener su peso promedio.
- 2.- Se mide 10 ml de la solución de lugo1 en un tubo de ensayo.
- 3.- Se coloca 5 ml de la solución de lugo1 (del tubo de ensayo) en una caja petri.
- 4.- Con ayuda de la pinza se levanta el cefalotórax, luego con la tijera se hace un corte longitudinal por el dorso, desde el primer segmento hasta el último segmento abdominal.
- 5.- Con la pinza se procede a extraer el intestino y se lo coloca en la solución de lugo1 que está en la caja petri.
- 6.- Se repite la operación con 10 camarones hasta obtener los 10 intestinos.
- 7.- Con un bisturí se raspa el intestino para obtener su contenido. Hay que tener cuidado de no romper el intestino pues esto complica el trabajo.
- 8.- Una vez obtenido el contenido intestinal de los 10 intestinos, se procede a disgregarlo con la ayuda de una espátula.
- 9.- Se recoge ésta solución con la pipeta y se la coloca en el tubo de ensayo donde se encuentra el resto de la solución de lugo1. Así se obtiene una solución que tiene una relación 1 a 1, es decir que por cada ml de la solución de lugo1 existe el contenido intestinal de un camarón.

Dependiendo de la cantidad del contenido intestinal se puede hacer variantes. En cuanto a ésta relación, se puede utilizar relación 2: 1, es decir que por cada ml de lugo¹ hay medio contenido intestinal, o también relación 1 : 2 , por cada ml hay 2 contenidos intestinales, etc, etc.

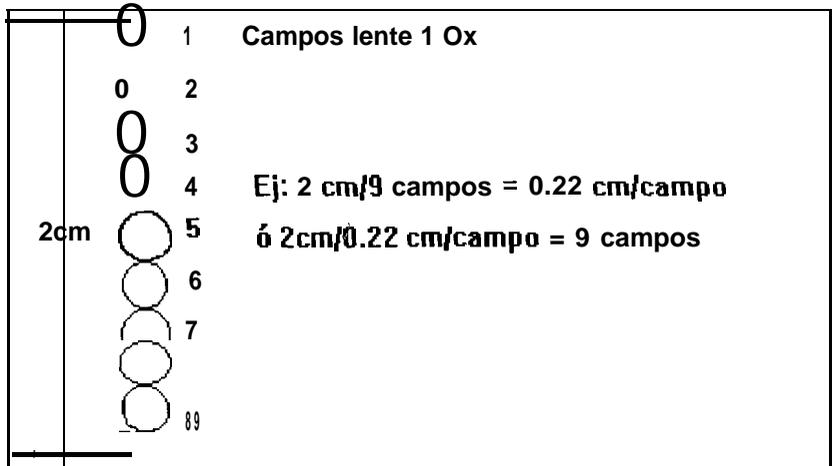
d) Preparación de la cámara.- Antes de colocar la suspensión a la cámara se procede a homogeneizar la muestra con la ayuda de una pipeta y una pera, se coloca 1 ml de la solución que tiene el contenido intestinal de 10 camarones en la cámara Sedgwick Rafter y se espera 5 minutos para su lectura, esto es con el fin de que las partículas suspendidas se asienten en el fondo de la cámara.

e) Medición de la cámara.- Cuando se va a observar por primera vez se tiene que calcular cuantos barridos tiene la cámara en total, describiéndose como un barrido todo el recorrido horizontal de un campo (en éste caso en lente de 10X)

Esto se puede calcular dividiendo 2 cm (que tiene la parte vertical de la cámara) entre el diámetro del campo, en centímetro o de otra forma midiendo cuantos campos hay en los

dos centímetros de la parte vertical de la cámara, así como muestra la figura.

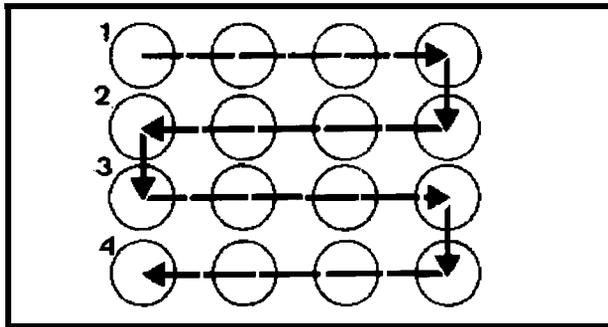
FIGURA 12. Medición de la cámara



f) Lectura de la cámara.- Para la lectura de la cámara se debe saber reconocer las gregarinas en estado de trofozoito y de gametocisto, en éste caso sólo se procederá contar los trofozoitos, ya que en base a éstos se hace el tratamiento.

Se cuentan sólo cuatro barridos horizontales, se empieza desde una esquina superior y se termina en la misma esquina inferior, como muestra la siguiente figura

FIGURA 13. Lectura de la cámara (4 barridos)



g) Cálculo del conteo.- Para calcular la cantidad de trofozoitos en la muestra se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{NoTrof/gr} = \frac{\text{TrC} \times \text{Bt}}{\text{Bc}} \times \text{Fr/Pm}$$

donde:

TrC = Trofozoitos contados

Bt = Barridos totales de la cámara

Bc = Barridos contados

Fr= Factor de relación

Pm = Peso promedio en gramo

h) Rangos- Estos junto con la técnica por el Dr

Harry Daniels, así tenemos que

RANGO BAJO < a 13 Trof/gr

RANGO MEDIO de 13 a 20 Trof/gr

RANGO ALTO > 20 Trof/gr.

Con este método los tratamientos se realizan a partir del rango medio:

3.3.- Tratamiento vía alimento medicado

Cuando existe una infestación causada por gregarinas, se debe atacar el problema con medidas terapéuticas y en forma directa. Lo más recomendable es hacerlo mediante vía alimento como vehículo para suministrar la droga al organismo.

La preparación del alimento medicado debe hacerse en una planta de balanceado, ya que ésto nos garantiza que el medicamento adicionado al pienso es homogéneo. Muchas veces las medicaciones no alcanzan su objetivo y una de las causas es porque se prepara el alimento medicado en forma rústica y su mezcla no es homogénea; así por ejemplo el error más común que se comete es cuando mezclan directamente el medicamento con aceite de pescado incorporándolo luego a los pellet de un balanceado normal.

3.3.1.- Medidas preventivas

Existen medidas que pueden ayudar a la prevención de éstas infestaciones, tales como:

La eliminación del exceso de materia orgánica que es fuente de proliferación de gusanos poliquetos, que son huéspedes intermediarios de las gregarinas.

La eliminación de ciertas clases de moluscos en las compuertas, ya que se conoce que éstos organismos, en especial los bivalvos silvestres (provenientes del medio natural), podrían ser huéspedes intermediarios del ciclo de vida de las gregarinas.

En zonas donde existe exceso de sedimento en suspensión, es conveniente hacer un canal de sedimentación, ya que éstos sedimentos son nichos de gusanos poliquetos.

3.3.2.- Medida terapéutica

Para el tratamiento de las infestaciones por gregarinas en camarones se utiliza los llamados anticoccidios, que son los antibióticos (*) utilizados para el control de coccidios del género Eimeria que ataca a los pollos.

Los tratamientos vía alimento medicado fueron recomendados en base a los resultados de los análisis patológicos. Este alimento es conocido comercialmente (Molinos Champion S.A.) como “MEDICADO G-20” siendo su principio activo la monensina. Entre los productos comerciales que contiene éste principio activo está el Elancoban.

El tratamiento debe realizarse durante diez días consecutivos, y la dosis de alimento se calcula en base a la biomasa de la piscina a tratar.

El porcentaje de proteína va de acuerdo al tamaño del camarón.

* (Medicamento que destruye los microorganismos patógenos o que detiene su reproducción- Diccionario Enciclopédico Aula).

3.3.2.1.- **Los anticoccidios**

Debido a las similitudes de las coccidias con respecto a las gregarinas; por su alimentación (ósmosis), órgano huésped (intestino) y ciclo reproductivo, se ha empleado la monensina, la misma que es un anticoccidial para su control.

Entre los principales antibióticos anticoccidios están: **amprolium**, **sulfonamidas**, ionóforos, halofuginona y nicarbacina.

Los antibióticos ionóforos (monensina, salinomicina, lasalocido, naransina, maduracina), tienen la capacidad de formar complejos con diversos iones, principalmente **sodio**, potasio y calcio, y transportarlo dentro y a través de las membranas biológicas lo que explica su modo de acción, es decir que causa un desbalance osmótico con la correspondiente ruptura de la membrana celular en las coccidias y gregarinas.

Los estudios *in vitro* e *in ovo* han demostrado que los ionóforos afectan tanto las etapas extra como intracelulares del parásito. Su actividad principal es ejercida durante las etapas iniciales asexuales del desarrollo del parásito.

La tolerancia al fármaco ha surgido lentamente y es variable en su ocurrencia, probablemente a la manera bioquímicamente no específica en que éstos productos naturales de fermentación (*Streptomyces actinomadura*) actúan sobre el parásito (Vademecum Veterinario 2^{da} edición 1988) . Las figuras 14 y 15, muestran el efecto del medicamento durante el tratamiento, (lisis de la pared celular).

FIGURA 14. Trofozoito vivo, antes de tratamiento

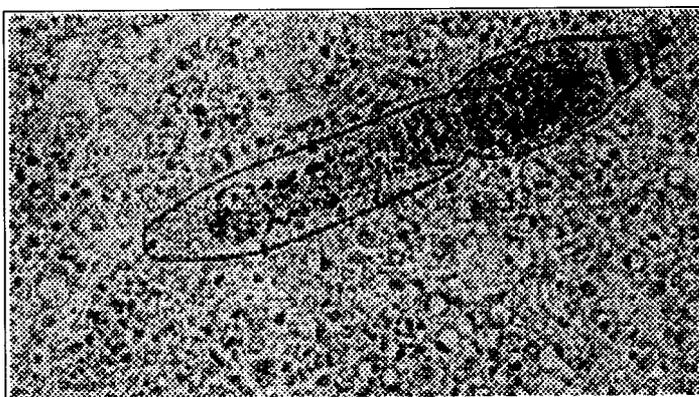


FIGURA 15. Trofozoito muerto, post-tratamiento



IV. EVALUACIÓN DE RESULTADOS

La evaluación de los resultados obtenidos en éste informe técnico, se basa en recopilación de los análisis patológicos de camarón, realizados durante los meses de Enero a Diciembre de los años 1994 y 1995, en tres provincias del Ecuador; El Oro, Guayas y Manabí.

Durante el año 1994 se muestrearon 83 camaronas en donde se procesaron 986 análisis, en 1995 el número de camaronas de donde se tomaron muestras he 117 y se realizaron 1480 análisis, es decir que para la evaluación de los resultados contamos con un total de 2466 análisis, lo cual representa 24.660 camarones analizados.

Esta información muy representativa, nos sirve para evaluar ciertas tendencias concerniente a los problemas asociados con esta enfermedad.

Con ayuda del software S.A.S (Statistical Analysis System), se realizaron todos los análisis estadístico correspondiente al presente informe técnico.

4.1.- Influencia de la infección sobre el crecimiento del camarón

El análisis estadístico (ANOVA) comparando el incremento en peso de una misma población de camarones cuando estuvo infestada y no infestada (luego del tratamiento), mostró que existía diferencia significativa ($F=5.5$; $P<0.05$), entre el incremento de los animales infectados vs los no infectados de las poblaciones analizadas.

Un análisis "LSD" sobre las medias de los incrementos confirmó que existió una diferencia significativa ($T=2.31$; $P=0.05$) entre los individuos infectados vs los tratados con alimento medicado.

4.2.- Evaluación de datos pre y post - medicación (Enero/94 a Diciembre/95)

Para lograr una mejor evaluación de los datos pre y post-medicación fue necesario realizar algunos análisis concernientes al tema, y de ésta manera obtener mayor información del comportamiento de la enfermedad en la zonas estudiadas.

4.2.1.- Análisis de la presencia de gregarinas

Para analizar la presencia de gregarinas en estado adulto (trofozoito), durante los años 1994 y 1995, en las zonas; de El Oro, Guayas y Manabí, se tomo en cuenta su grado (rango) de infección , donde :

Rango bajo, corresponde a camarones infectados con hasta 12 trofozoitos por gramo de peso.

Rango medio, corresponde a camarones infectados de 13 a 20 trofozoitos por gramo de peso.

Rango alto, corresponde a camarones infectados con mas de 20 trofozoitos por gramos.

La tabla II muestra la distribución de los porcentaje según el rango y la comparación por años. Realizando un test de chi cuadrado (χ^2) sobre las frecuencias existió diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los rangos analizados.

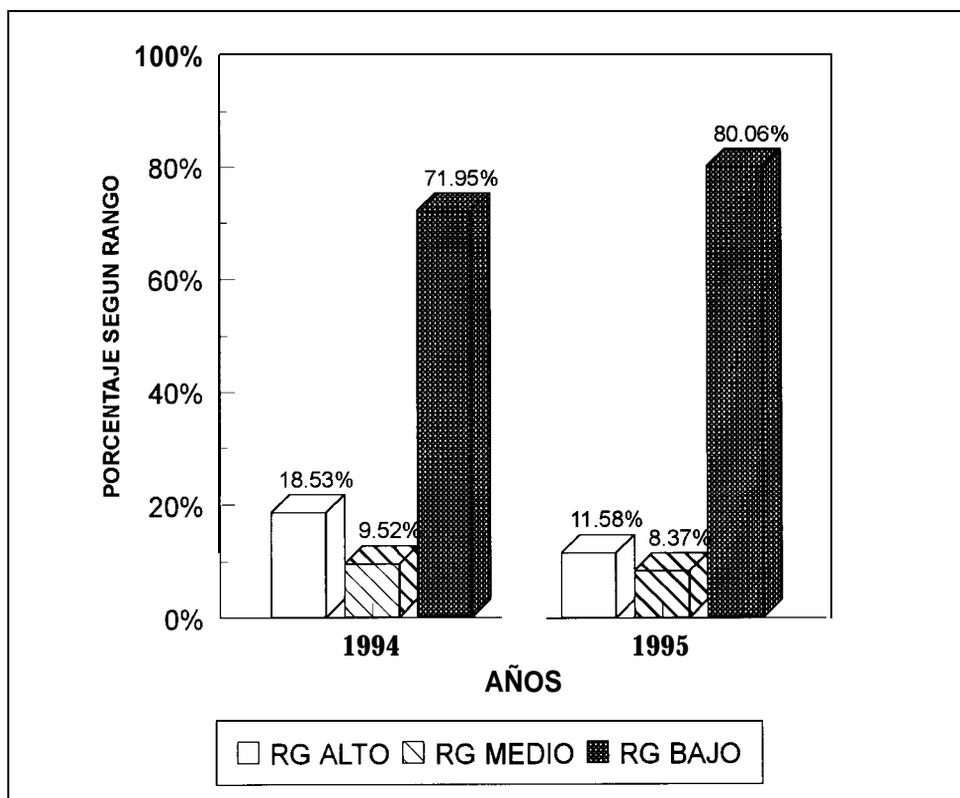
La aparición de los diferentes rangos se mantuvo con la misma tendencia en los dos años del estudio en las diferentes zonas, esto se

comprobó mediante χ^2 el cual demostró que no existía diferencias significativas ($P>0.05$) entre las apariciones de rango por zona.

TABLA II. Análisis de la presencia de gregarinas (trofozoitos)

A Ñ O S		
TIPO DE RANGO	1.994	1.995
ALTO	18.53%	11.58%
MEDIO	9.52%	8.37%
BAJO	71.95%	80,06%
<i>TOTAL ANÁLISIS</i>	599	<i>717</i>

FIGURA 16. Análisis de la presencia de gregarinas (trofozoitos)



4.2.2.- Frecuencia de infección temporal y espacial

La frecuencia de infección de los análisis positivos para gregarinas en los dos años analizados mostró que existe una tendencia mayor en la estación seca en las diferentes zonas. El análisis de X^2 sobre la frecuencia presentada en las dos épocas del año (estaciones lluviosa y seca), mostró que había diferencias muy significativas ($P \ll 0.05$) entre las dos estaciones del año, siendo mayor en la época seca.

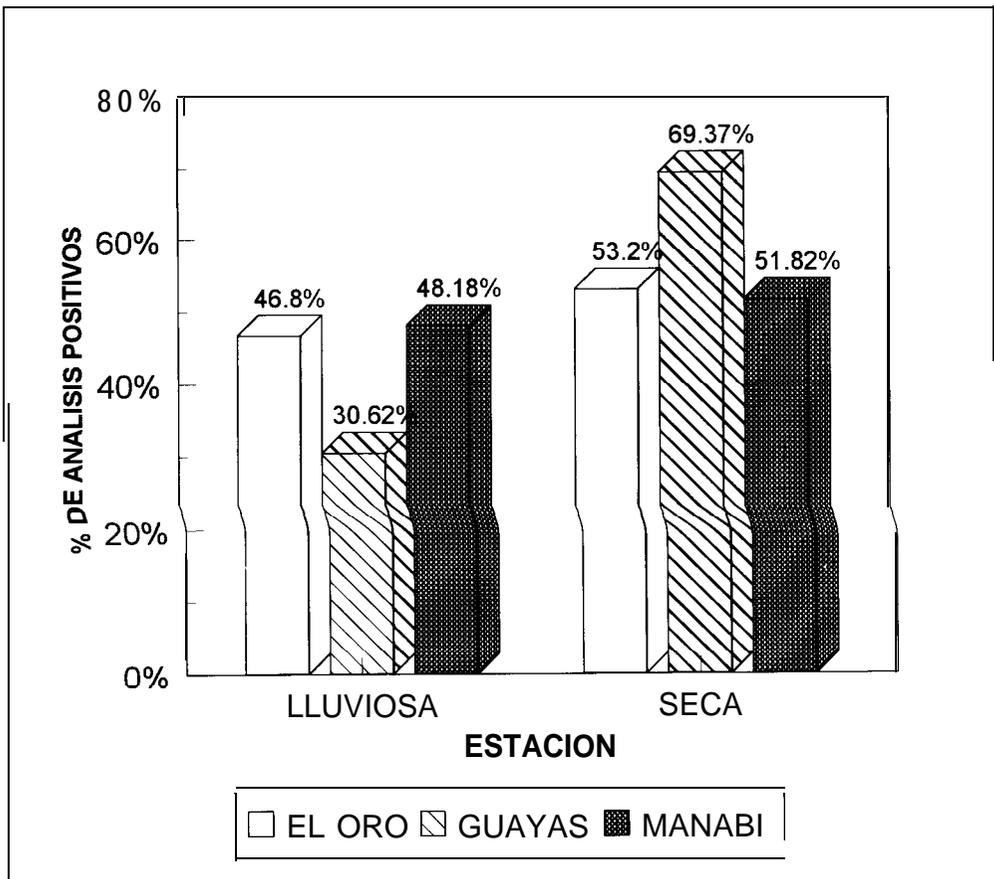
Esto se puede corroborar con las ventas de alimento medicados G-20 para el control de este tipo de enfermedad, ya que por lo general, del 100% de las ventas por año, el 43,73% corresponde a la época lluviosa y el 56,27% a la época seca.

Como se puede apreciar en la tabla III, la frecuencia de infección temporal y espacial indica que los mayores porcentajes de infección, se dan en la estación seca, esta tendencia fue mantenida en las tres zonas (El Oro, Guayas y Manabí), las mismas que no fueron significativamente diferentes ($P > 0.05$). Cabe señalar que según los datos obtenidos, la zona en la cual el efecto “estación”, es mucho más acentuado, es la del Guayas.

TABLA III. Frecuencia de infección Temporal y espacial

ZONAS	ESTACION		TOTAL
	LLUVIOSA	S E C A	
EL ORO			
Porcentaje	46.80 %	53.2 0%	100%
GUAYAS			
Porcentaje	30.62 %	69.37 %	100%
MANABI			
Porcentaje	48.18%	51.82 %	100%
TOTAL ANALISIS	542	774	1.316

FIGURA 17. Frecuencia de infección temporal y espacial



4.2.3.- Frecuencia de infección según el peso

Para evaluar la frecuencia de infección según el peso del camarón se realizó intervalos de clase de 1 gramo y se analizó desde 1.1 gramos hasta los 16 gramos.

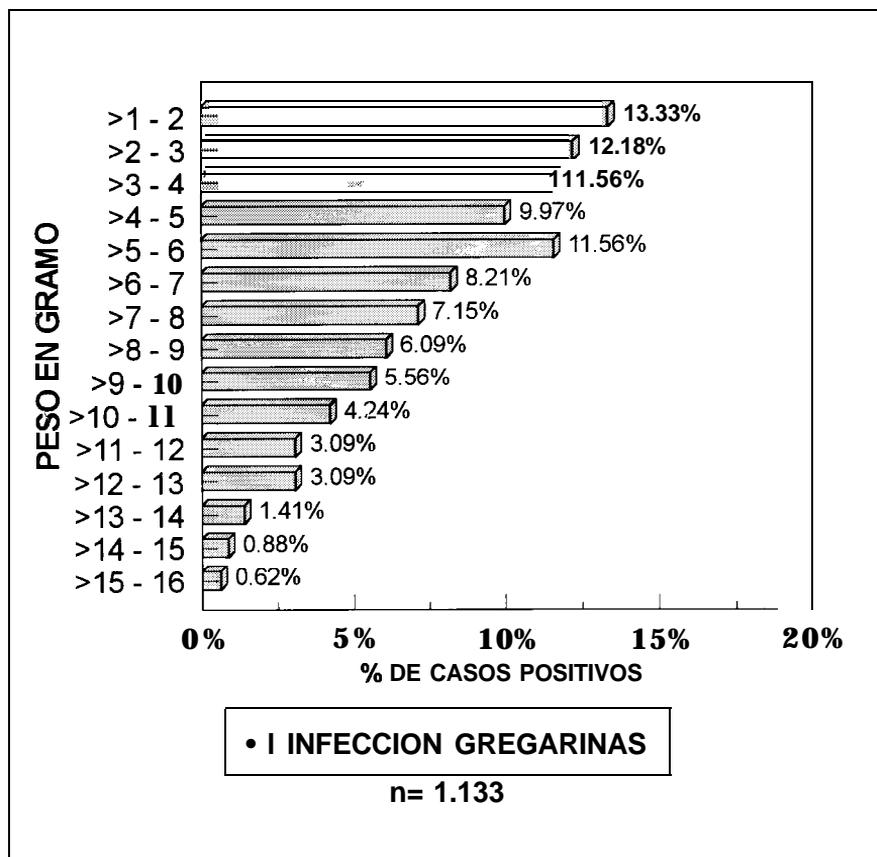
La curva de frecuencia revela que la mayoría de casos de infección se presentaban en los pesos mas pequeños que van de 1.1 a 6 gramos, después de este peso su frecuencia tiende a disminuir.

El análisis de χ^2 , sobre la frecuencias de infección según el peso por zonas (Guayas, El Oro y Manabí), demostró que no había diferencias significativas entre las frecuencias de cada zona ($P>0.05$), lo cual indica que los resultados obtenidos en las diferentes zonas son estadísticamente semejantes.

En general, se podría decir que la frecuencia de infección según el peso, es mayor en camarones pequeños (hasta 6 gramos) que en camarones grandes, según los análisis patológicos realizados por nosotros.

TABLA IV Frecuencia de infección según el peso

Intervalo de clase para el peso (g.)	% casos positivos
> 1 a 2	13.33%
>2 a 3	12.18%
>3 a 4	11.56%
>4 a 5	9.95 %
>5 a 6	11.56%
>6 a 7	8.21%
>7 a 8	7.15%
>8 a 9	6.09%
>9 a 10	5.56%
>10 a 11	4.24%
>11 a 12	3.09%
>12 a 13	3.09%
>13 a 14	1.41%
>14 a 15	0.88%
>15 a 16	0.62%
n= 1133	100%

FIGURA 18. Frecuencia de infección según el peso

Para verificar esta tendencia se realizó una regresión entre la variable cantidad trofozoito (Concentración) y el peso en gramo obteniéndose los siguientes resultados.

La regresión nos dá la siguiente ecuación

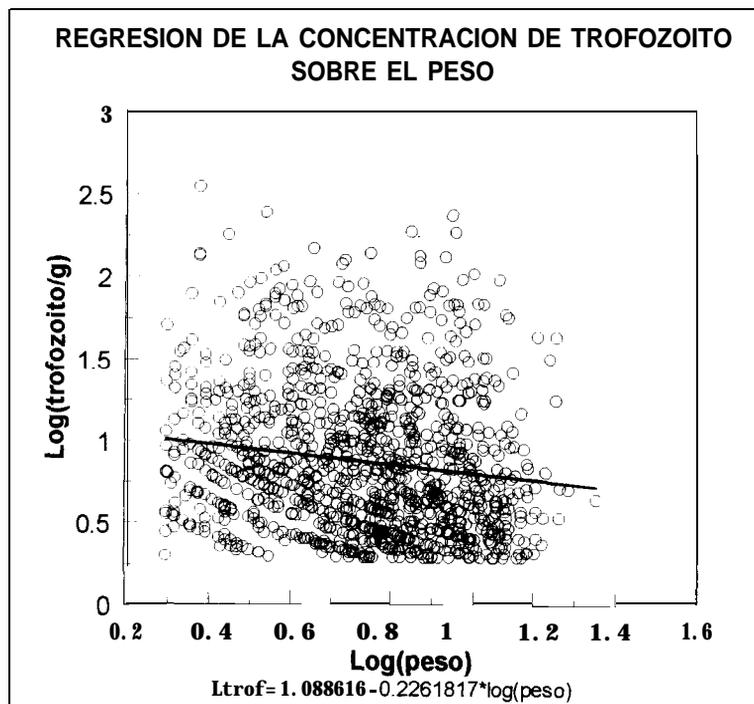
$$\mathbf{Ltrf = 1.0886 - 0.2618 \log P}$$

$$R^2 = 0.018 \text{ (} P < 0.001 \text{)}$$

Cabe señalar que a pesar que R^2 (Porcentaje que explica la ecuación) nos explica que apenas el 2% de la variabilidad de la

concentración de trofozoitos, el hecho que la regresión sea significativa ($P < 0.0001$) muestra que existe una tendencia de encontrarse las mayores concentraciones de trofozoitos en camarones de menor talla.

FIGURA 19.- Regresión de la concentración de trofozoitos sobre el peso



4.2.4.- Seguimiento de monitoreo antes y después de tratamiento con alimento medicado

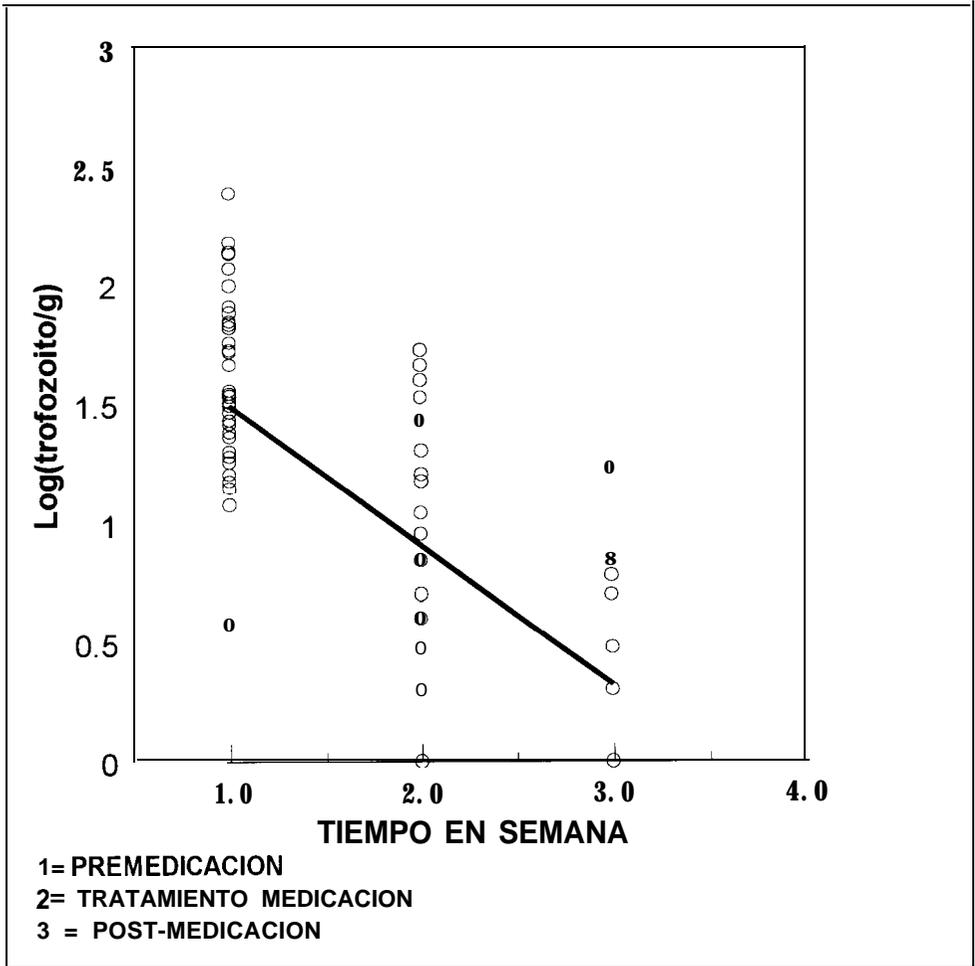
Se realizó el seguimiento de monitoreo de 105 piscinas en pre y post-medicación, para evaluar el efecto de la medicación sobre la concentración de gregarinas, se realizó una regresión en la cual se ve claramente el efecto del tratamiento con alimento medicado G-20.

La regresión nos da la siguiente ecuación:

$$\mathbf{\text{Log (Trof)} = 2.075 - 0.585 \text{ Semana Tratamiento}}$$

El R^2 indica que el 53.26 % de los casos monitoreados son explicados por la ecuación, así mismo la pendiente mostró ser altamente significativa ($P < 0.0001$).

FIGURA 20. Seguimiento pre y post medicación con alimento medicado G-20



4.3.- Evaluación de casos de gregarinas según zona y meses del año

En la provincia de El Oro la mayor cantidad de casos se presentó en los meses de Mayo, Junio, Julio y Agosto, y su promedio en los dos años de estudio, he de 37.5, 29.5 , 17 y 26.5 casos respectivamente.

En la provincia del Guayas el pico más alto de casos de gregarinas fue en el mes de Junio, con 49.5 casos, seguido por Julio, Agosto y Septiembre con 34.5, 21.5 y 15.5 respectivamente en promedio.

En la provincia de Manabí la mayor cantidad de casos se presentaron en los meses de Noviembre, Diciembre y Enero con 12, 35 y 22 casos respectivamente en promedio.

4.4.- Beneficio de los tratamientos

Las infestaciones de gregarinas causan el detenimiento del crecimiento en las poblaciones de camarón cultivado, y cuando las infecciones son en grado alto esta pueden ser la puerta de entrada para un problema bacteriano, lo cual agudiza aún más los rendimientos de una piscina.

Para demostrar los beneficios económicos de los tratamientos voy a poner un ejemplo:

Pérdida por detenimiento de crecimiento en camarones de 5 gramos

Densidad (cam/m ²)	10
supervivencia Estimada	60%
Porcentaje de biomasa alimentada	5.7 %
Balanceado/Kg/día/Ha	17.1
Conversión estimada	2:1
Balanceado Kg/Ha/10 días	171
Incremento esperado/10 días	1.42 gr
Biomasa esperada (Kg/Ha)	85.5
Costo alimento 30% /Kg	1,45 1.75 sucres
Costo alimento /Ha/10 días	248,249.25 sucres
Costo alim. medicado/Kg	1,693.30 sucres
Tiempo de tratamiento	10 días
Costo tratamiento/Ha	289,554.30 sucres
Costo antibiótico/tratamiento/Ha	41,305.05 sucres

Como se muestra en el resumen precedente el beneficio con el tratamiento es evidente, puesto que se pierden por cada hectárea en los 10 días no tratados 248,249 sucres (sólo en alimento), siendo la inversión para evitar ésta pérdida de apenas 41,305.05 sucres, señalando además

que en éstos cálculos no se ha tomado en cuenta el costo operativo por los días que se deja de producir (incremento de biomasa).

NOTA: Cotización dólar 3,299 sucre Agosto/96.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Evalutando los resultados obtenidos de dos años de estudios, podemos concluir que:

- 1.- En el transcurso de los dos años de estudio la presencia de gregarinas apareció con la misma intensidad de acuerdo a los rangos establecidos.
- 2.- Hay una mayor tendencia de apariciones de casos de gregarinas en la época seca, con lo cual se deduce que este tipo de parásitos podría estar asociados con aumento de salinidades. La zona con mayor incidencia de este comportamiento es Guayas.
- 3.- Según el peso, existe una mayor tendencia de infecciones en camarones de menor tamaño.
- 4.- Los antibióticos ionóforos, entre ellos la monensina, son efectivos para combatir este tipo de infecciones.

5.- Los tratamientos medicados vía alimento demuestran tener beneficio económicos y son la solución para este tipo de problemas, sin embargo la mejor alternativa es la prevención.

6.- La presencia de gregarinas podría estar asociada a problemas tales como:

- Densidades altas (contagio horizontal indirecto)
- Aumento de Salinidad
- Materia orgánica elevada
- Sólidos en suspensión.

7.- Infecciones altas de gregarinas pueden ser la vía de entrada de una septicemia bacteriana, en muchos casos causada por vibrios sp.

8.- La técnica de diagnóstico es muy sencilla y práctica, además tiene muchas ventajas con respecto a otras.

Una vez obtenidas las conclusiones derivadas de este informe, creo pertinente hacer algunas recomendaciones para obtener los mejores resultados en la medicaciones a efectuar.

1.- Para realizar un buen diagnóstico, primero se recomienda realizar un buen muestreo, esto es al azar, pero escogiendo los camarones con síntomas de enfermedad.

- 2.- Una vez tomada la muestra de los camarones para realizar el análisis, éstos deben morir, ya que si están vivo podría ir defecando en su trayecto al lugar del trabajo y de esta manera eliminaría partes de las gregarinas en las heces.
- 3.- Raspar bien el intestino, de manera que sea aprovechado todo su contenido, para el análisis.
- 4.- Dependiendo de la llenura del intestino del camarón realizar la dilución más conveniente para su lectura.
- 5.- Homogeneizar bien la muestra antes de poner en la cámara de Sedgwick Rafter.
- 6.- Esperar el tiempo suficiente (3 a 5 minutos) antes de leer la cámara, con el fin que todas las partículas se asienten en el fondo de la cámara.
- 7.- Para la lectura de la cámara, se debe saber bien identificar los trofozoitos, no se debe contar a los trofozoitos muertos.
- 8.- Se recomienda empezar una medicación contra gregarinas a partir de rango medio, es decir 13 trofozoitos por gramo.

9.- Para obtener una medicación exitosa se debe tomar en cuenta lo siguiente:

- Obtener un buen diagnóstico,
- Alimento medicado con un anticoccidio

10.- La cantidad de alimento a dar en el tratamiento debe ser lo más real a la biomasa, ya que lo que se busca en el tratamiento es dar la droga vía alimento y además que exista la mayor probabilidad que todos los animales ingieran el medicamento.

11.- Se recomienda dar de dos a tres dosis de alimento durante el tratamiento.

12.- El tiempo de tratamiento contra infecciones causadas por gregarinas con alimento medicado a base de anticoccidio es de 10 días.

13. - Cuando se realiza un tratamiento con alimento medicado es recomendable subir el punto de proteína con relación a la alimentación normal.

14.- No se recomienda fertilizar frente a una medicación, ya que lo que se busca en esta es que el camarón ingiera mas alimento balanceado medicado que algas.

15.- Los recambios de agua en la piscinas deberán ser normales durante el tratamiento.

16.- Es mejor realizar los tratamiento en aguaje (mayor actividad), ya que la mayoría de los camarones aprovechan la alimentación.

17.- Sí en la piscina hubo un problema de gregarinas, se recomienda poner cal hidratada en el suelo a manera de prevención.

18.- Cuando se utiliza sistemas de comederos en la piscina, se recomienda alimentar también al boleó frente a una medicación.

BIBLIOGRAFÍA

1.- BELL Thomas.A and LIGHTNER Donald V. Handbook of normal Penaeid Shrimp Histology, The World Aquaculture Society, Baton Rouge, 1988, pp. 58, 66, 86, 96.

2.- DICCIONARIO ENCICLOPÉDICO UNIVERSAL AULA. Cultura, Barcelona, 1991 .

3.- ENCICLOPEDIA MULTIMEDIA. The new Grolier, The software Toolwokrs. Inc California, 1993.

4.- JOHNSON S.K. Handbook of Shrimp Disease, Texas A& M University Sea Grant College Program., Texas, pp 10.

5.- JIMÉNEZ Roberto, Análisis de Gregarinas asociado al detenimiento de crecimiento en camarones *Penaeus vannamei*, Revista Acuicultura del Ecuador 1992, pp 38- 45.

6.- KUDO Richard P. Protozoologia, C.E.C.S.A , 1969, pp, 493-53 1.

7.- LOCKWOOD A.P.M Aspect of the physiology of crustacea. 1975 pp 255-258.

8.- LIGHTNER Donald. V. Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid Shrimp. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, 1996, sec 6.4.

9.- McVEY James .P. CRC Handbook of Mariculture Volumen 2, Crustacean Aquaculture. Boca Raton. 1993 pp 44 1-443.

10.- MEHLHORN. H, DUWEL.D, RAETHER.W, Manual de Parasitología Veterinaria, Grass-Iatros, Bogotá, 1994. pp 282 - 286; 421.

11.- VADEMÉCUM VETERINARIO ECUATORIANO. Segunda edición, 1988.pp 1694-1696

12.- PROGRAMA ESTADÍSTICO S.A.S (Statistical Analysis System, versión 6.08) .