

Intestinal infestation by gregarines in farmed whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* in Nayarit, Mexico. Infestación intestinal por gregarinas en el camarón blanco *Penaeus vannamei* de cultivo en Nayarit, México.

Zavala-Leal, O.I.^{1,2*}, Hernández-Jaime, R.J.¹, Valdez-González, F.J.²,
Martínez-Cárdenas, L.^{1,2}, González-Huerta, C.A.², Cuevas-Rodríguez, B.²

¹ Programa de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias. Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Km. 9 Carretera Tepic-Compostela, Xalisco, Nayarit, C.P. 63780, México.

² Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera. Universidad Autónoma de Nayarit. Km. 12 Carretera Los Cocos, Bahía de Matanchén, San Blas, Nayarit, C.P. 63740, México.

Please cite this article as/Como citar este artículo: Zavala-Leal, O. I., Hernández-Jaime, R. J., Valdez-González, F. J., Martínez-Cárdenas, L., González-Huerta, C. A., Cuevas-Rodríguez, B. (2022). Intestinal infestation by gregarines in farmed whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* in Nayarit, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 9, e1277. <https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1277>



ABSTRACT

The presence of gregarines in shrimp farming is associated with a low growth rate. In this industry, growing time is critical to the crop's success. This work describes the intestinal infestation by gregarines in *Penaeus vannamei* and evaluates a method of control of the parasite. Sampling was carried out from May-August (dry season) and August-November (rainy season) on four farms. The degree of gregarine infestation, prevalence, and their relationship with salinity was determined. Finally, we tested the commercial antiparasitic PREOXOL® (oxibendazole) at 1.5 % as a control against these parasites in commercial production. The prevalence of gregarines in both crop cycles was high, ranging between 75 and 90 % in the dry season and between 70 and 87 % in the rainy season. The degree of severity of the infestation was higher in the dry season. The salinity recorded during the dry season ranged between 26 and 47 UPS, while it was between 6 and 26 UPS in the rainy season. We found a positive correlation between the degree of severity and salinity. The antiparasitic reduced

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: September 09th 2021.

Accepted/Aceptado: May 26th 2022.

Available on line/Publicado: June 17th 2022.

RESUMEN

La presencia de gregarinas en el cultivo de camarón está asociada con una baja tasa de crecimiento. En esta industria, el tiempo de crecimiento es fundamental para el éxito del cultivo. Este trabajo describe la infestación intestinal por gregarinas en *Penaeus vannamei*, y evalúa un método de control del parásito. El muestreo se realizó durante mayo-agosto (temporada seca) y agosto-noviembre (temporada de lluvias) en cuatro granjas. Se determinó el grado de infestación y la prevalencia de gregarinas y su relación con la salinidad. Finalmente, se probó el antiparasitario comercial PREOXOL® (oxibendazol) al 1.5 % como control contra estos parásitos, en la producción comercial. Se observó que la prevalencia de gregarinas en ambos ciclos de cultivo fue alta, osciló entre el 75 y el 90 % en la estación seca y entre el 70 y el 87 % en la estación lluviosa. El grado de severidad de la infestación fue mayor en la estación seca. La salinidad registrada durante la estación seca osciló entre 26 y 47 UPS, mientras que en el ciclo de lluvias fue de 6 a 26 UPS. Se observó que existe una correlación positiva entre el grado de severidad y la salinidad. El antiparasitario logró disminuir la prevalencia de gregarinas más del 90 %. Mientras que el grado de severidad disminuyó hasta en tres grados. Existe una correlación positiva entre el grado de severidad y la

*Corresponding Author:

O. I. Zavala-Leal. Programa de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias. Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Phone: (311) 103 24 53. E-mail: ziram28@hotmail.com

the prevalence of gregarines by more than 90 %, while the severity decreased by up to three degrees. There is a positive correlation between the degree of severity and salinity, but not with prevalence. The control method used with PREOXOL® turned out to be highly efficient in commercial shrimp production.

KEY WORDS

Degree of severity, gregarines, oxbendazole, commercial shrimp production.

Introduction

Crustacean farming has grown substantially in the generation of economic wealth worldwide (FAO, 2016). In Mexico, whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) farming is one of the most important and successful aquaculture activities. In terms of production volume, whiteleg shrimp are third place nationally however, they have the highest economic value of all the fishery resources exploited in Mexico. Similarly, shrimp is the most exported fishery resource, with the United States of America, Japan, and Italy being the main destinations. The main production area for whiteleg shrimp is northwestern Mexico (Sinaloa, Sonora, Baja California Sur, and Nayarit) (SAGARPA, 2015). As an industry, shrimp farming generates employment and has social and economic impacts. However, it also has requirements related to quality control and control of nutritional, viral, bacteriological, and parasitic diseases, reducing the negative effects on profitability (OMSA, 2008; Guzmán-Sáenz *et al.*, 2014).

Whiteleg shrimp are the most cultivated crustacean species in Mexico and are one of the most affected by sporozoan parasites, predominantly by gregarines which are intestinal endoparasites (Prado-Garcés, 1996; Lightner, 2010). Gregarines are opportunistic parasites that have frequently caused substantial economic losses in shrimp farming (Auró & Ocampo, 2006, Morales-Covarrubias, 2010). The most common genera that infest shrimp are *Nematopsis spp.*, *Paraophioidina spp.* and *Cephalolubus spp.* Gregarine parasitosis plays an important role in shrimp farm crops. In Latin America, it is one of the principal diseases

salinidad, no así con la prevalencia. El método de control empleado con PREOXOL® resultó ser altamente eficiente en la producción comercial de camarón.

PALABRAS CLAVE

Grado de severidad, gregarinas, oxibendazol, producción comercial de camarón.

Introducción

El cultivo de crustáceos ha crecido enormemente en la generación de divisas económicas alrededor de todo el mundo (FAO, 2016). El cultivo del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en México es una de las actividades acuícolas más importantes y exitosas. Por el volumen de producción se ubica en el lugar número tres, sin embargo, por su valor económico se encuentra en el primer lugar de todos los recursos pesqueros explotados en México. Del mismo modo, el camarón es el recurso pesquero que más se exporta, siendo Estados Unidos de América, Japón e Italia los principales destinos. La principal zona de producción de camarón blanco en México es la zona noroeste (Sinaloa, Sonora, Baja California Sur y Nayarit) (SAGARPA, 2015). Como industria, la camaronicultura genera empleo y tiene un impacto tanto social como económico, pero también mantiene exigencias relacionadas con el control de calidad, control de enfermedades nutricionales, víricas, bacteriológicas y parasitarias, disminuyendo los efectos negativos en la rentabilidad (OMSA, 2008; Guzmán-Sáenz *et al.*, 2014).

El camarón blanco es la especie de crustáceos más cultivado en México y es una de las más afectadas por parásitos de tipo esporozoarios, predominantemente por las gregarinas que son endoparásitos intestinales (Prado-Garcés, 1996; Lightner, 2010). Las gregarinas son parásitos oportunistas, frecuentemente han sido reportadas como causantes de pérdidas económicas significativas en la camaronicultura (Auró & Ocampo, 2006, Morales-Covarrubias, 2010). Los géneros más comunes que infestan al camarón son *Nematopsis spp.*, *Paraophioidina spp.* y *Cephalolubus spp.* La parasitosis por gregarinas juega un papel importante en los cultivos de granjas camaroneras. Se ha reportado que en Latinoamérica es una de las principales enfermedades que afectan el cultivo de camarón (Morales-Covarrubias *et al.*, 2011; Guzmán-Sáenz *et al.*, 2014). En camarones

that affect shrimp farming (Morales-Covarrubias *et al.*, 2011; Guzmán-Sáenz *et al.*, 2014). In shrimp of the genus *Litopenaeus*, large quantities of gregarines (high prevalence) are associated with empty or partially empty intestines, which coincide with a low growth rate and a possible predisposition to viral and bacterial infections and nutritional problems. (Guzmán-Sáenz *et al.*, 2014). In some cases, massive infestations of gregarines (up to 65 % prevalence) in small-sized shrimp have produced high mortality rates (Jiménez, 1991). In Mexico, empirical methods using antibiotics are employed to control gregarines in shrimp farms yet controls and efficient application practices are lacking (Fajer-Ávila *et al.*, 2005). Records on the effects or use of antibiotics and their efficiency are scarce.

In this high-risk industry, the growth rate of shrimp is critical to the success and profitability of farming. For this reason, our research aims to describe intestinal infestation by gregarines in whiteleg shrimp *P. vannamei* in farms in Nayarit, Mexico, and the use of oxbendazole Preoxol® as a parasite control method. This will inform necessary actions needed to avoid economic losses of the crop and help improve management practices.

Material and Methods

The study was carried out in the northwestern Mexico. Monitoring occurred at four farms in the state of Nayarit, Mexico, located in different areas (La Única N 21°33'42.79" W 105°16'32.65"; Franco Shrimp N 21°36'16.04" W 105°18'32.11"; Buenos Aires N 21°37'49.54" W 105°19'6.59"; Las Palmas N 21°35'44.19" W 105°18'6.70"). These farms are dedicated to cultivating whiteleg shrimp in reservoir ponds with semi-intensive production systems. Stocking density was 12 to 18 shrimp per square meter, depending on the farm and the characteristics of the ponds. Sampling was carried out during May-August; in the spring-summer cycle (dry season), and August-November; in the summer-autumn cycle (rainy season).

Sampling occurred prior to stocking post-larvae on farms. Fifty post-larvae from the supplier laboratory were sampled from each lot destined for the four farms. Once stocked, ten organisms were sampled from a pond on each farm weekly until harvest. Random sampling was used, varying the number of samples between

del género *Litopenaeus* se ha reportado que la presencia de elevadas cantidades de gregarinas (prevalencia alta) se asocian a intestinos vacíos o parcialmente vacíos, coincidiendo con una baja tasa de crecimiento, así como la posible predisposición a infecciones virales, bacterianas y problemas nutricionales (Guzmán-Sáenz *et al.*, 2014). En algunos casos, invasiones masivas de gregarinas (hasta del 65 % de prevalencia) en camarones de tallas pequeñas han llegado a producir altas tasas de mortalidad (Jiménez, 1991). En México, se han empleado algunos métodos empíricos en el control de gregarinas a través del uso de antibióticos en granjas camarónicas y cada vez con menor control en la aplicación y eficiencia en la acción (Fajer-Ávila *et al.*, 2005). Sin embargo, los registros sobre los efectos o el uso de los antibióticos que se emplean y su eficiencia son escasos.

En esta industria de gran riesgo la tasa de crecimiento del camarón es fundamental para el éxito y rentabilidad del cultivo. Por tal motivo, en este trabajo se propone describir la infestación intestinal por gregarinas de camarón blanco *P. vannamei* en cultivo en Nayarit, México, así como el uso de un método de control del parásito con oxbendazol Preoxol®. Esto permitirá tomar las medidas necesarias para evitar las pérdidas económicas del cultivo mejorando el manejo.

Material y Métodos

El trabajo se realizó en la zona noroeste de México. Se monitorearon cuatro granjas del estado de Nayarit, México, localizadas en diferentes áreas (La Única N 21°33'42.79" W 105°16'32.65"; Franco Shrimp N 21°36'16.04" W 105°18'32.11"; Buenos Aires N 21°37'49.54" W 105°19'6.59"; Las Palmas N 21°35'44.19" W 105°18'6.70"). Estas granjas se dedican al cultivo de camarón blanco en estanques enclavados en tierra con sistemas de producción semi-intensiva. La densidad de siembra fue de 12 a 18 camarones por metro cuadrado según la granja y las características de los estanques. Los muestreos se llevaron a cabo durante Mayo-Agosto; en el ciclo llamado primavera-verano (periodo de secas), y de Agosto-Noviembre; en el ciclo llamado verano-otoño (periodo de lluvias).

La toma de muestra se realiza anticipadamente a la siembra de las post-larvas en las granjas. Se muestrearon 50 post-larvas del laboratorio proveedor, de cada lote destinado a las cuatro granjas. Una vez sembradas, se muestrearon 10 organismos de un estanque de cada granja con una frecuencia semanal hasta la cosecha. Los muestreos

six and eight per crop cycle for each farm. A sample of 290 shrimp per farming cycle was collected during the months of May-August and August-November, analyzing a total of 580 organisms in the four farms.

The organisms were transported to the laboratory and reviewed with the fresh analysis technique proposed by Lightner (2010), which consists of extracting the entire intestine with the help of scissors and dissection forceps. Then, each sample (intestine) was placed on a slide with 0.85 % saline solution (sodium chloride). Once the organisms were evaluated, the genera of gregarines present were identified according to Levine (1985) and Clopton (2002). Subsequently, the degree of infestation or severity was determined. For this, a count of the gregarines at different development stages found in the intestine was carried out using a manual counter (Sper brand). The classification proposed by Pantoja & Lightner (2008) was used to determine the degree of severity. Finally, the total prevalence of gregarines was estimated for the evaluated shrimp as described by Wayne (1991) using the following equation:

$$P = (IO / N) \times 100$$

P= Prevalence

OI= Organisms infested with gregarines

N= Number of organisms analyzed

During sampling activities in the ponds, the salinity (PSU) was taken using a refractometer (Biomarine brand) and recorded in the field log.

Additionally, a control method against gregarines was tested in the commercial production of two shrimp farms, El Estero (N 21°56'59.69" W 105°26'58.87") and Los Otates (N 21°58'10.12" W 105 °26'36.95"), during the May-August growing cycle. For this, the antiparasitic oxibendazole with the commercial name PREOXOL® at 1.5 % was used in the feed at a rate of 2g per kg of feed in all feed rations for three days. Five 10 ha ponds were used at the El Estero farm and three 5 ha ponds at the Los Otates farm. The antibiotic was administered when the shrimp presented grade two severity or higher.

se realizaron de forma aleatoria variando el número de muestreos entre seis y ocho por ciclo de cultivo por granja. Se muestrearon 290 camarones por ciclo de cultivo, durante los meses de Mayo-Agosto y Agosto-Noviembre analizando un total de 580 organismos en las cuatro granjas.

Los organismos fueron transportados al laboratorio y revisados con la técnica de análisis en fresco propuesta por Lightner (2010), la cual consiste en extraer el intestino completo con la ayuda de tijeras y pinzas de disección. Cada muestra (intestino) se colocó en un portaobjetos con solución salina al 0.85 % (cloruro de sodio). Una vez revisados los organismos se identificaron los géneros de gregarinas presentes de acuerdo con Levine (1985) y Clopton (2002). Posteriormente, se determinó el grado de infestación o severidad. Para ello, se realizó un conteo de las gregarinas en los diferentes estadios a lo largo del intestino con la ayuda de un contador manual (marca Sper). Para determinar el grado de severidad se utilizó la clasificación propuesta por Pantoja y Lightner (2008). Finalmente, con la revisión de los organismos se estimó la prevalencia total de gregarinas de acuerdo con Wayne (1991) mediante la siguiente ecuación:

$$P = (OI / N) \times 100$$

P= Prevalencia

OI= Organismos infestados con gregarinas

N= Número de organismos analizados

A la par que se realizaron los muestreos en los estanques de cultivo, se determinó la salinidad (UPS) mediante un refractómetro (marca Biomarine) y se registró en la bitácora de campo.

Adicionalmente, se probó un método de control contra gregarinas en la producción comercial de dos granjas camarícolas, El Estero (N 21°56'59.69" W 105°26'58.87") y Los Otates (N 21°58'10.12" W 105°26'36.95"), durante el ciclo de cultivo Mayo-Agosto. Para ello se usó el antiparasitario oxibendazol de nombre comercial PREOXOL® al 1.5 % en el alimento a razón de 2g por kg de alimento en todas las raciones de alimento durante tres días. Se emplearon cinco estanques de 10 ha en la granja El Estero y tres estanques de 5 ha en la granja Los Otates. El

Around 50 shrimp were sampled before the application of the control method and one week after the start of the treatment.

Normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homoscedasticity (Levene's test) tests were performed on the data. Depending on the results, the non-parametric Kruskal-Wallis test was performed. A Spearman correlation was performed to determine the relationship between the presence of gregarines and salinity. All statistical analyzes were performed with the program Statistica ver. 7 from StatSoft company. The graphs were made with the SigmaPlot program ver. 12.0 from Systat Software Inc.

Results

The gregarines found in the two crop cycles belonged to the genus *Nematopsis*.

Phylum: Apicomplexa

Class: Sporozoa

Subclass: Gregarinia

Order: Eugregarinida

Family: Porosporidae

Genus: *Nematopsis*

In this genus, the sporonts form associations of two or more individuals; called syzygies, the anterior part is known as Primate, and the posterior part is known as Satellite (Figure 1a). These sporonts also form pre-reproductive associations with two or more individuals either in a chain, straight or bifurcated (Figure 1b), primate with a common epicyte slightly compressed at the junction of the deutomerite and protomerite forming a muscular neck, homogeneous protoplasm, the gametocyte presents a single nucleus, rounded protomerite, primate shorter than the length of the satellite, the nucleus generally located between the middle and posterior part of the deutomerite and satellite, also presents a gradual thinning in the last part of the syzygy.

During the sampling at the four shrimp farms, gametocytes and syzygies were generally detected in

antibiótico se suministró cuando los camarones presentaban grado dos de severidad o mayor. Se muestrearon alrededor de 50 camarones antes de la aplicación del método de control y una semana después del inicio del tratamiento.

Se realizaron pruebas de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homoscedasticidad (prueba de Levene's) de los datos. De acuerdo a los resultados se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para determinar la relación entre la presencia de gregarinas y la salinidad, se realizó una correlación de Spearman. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica ver. 7 de StatSoft company. Las gráficas se realizaron con el programa SigmaPlot ver. 12.0 de Systat Software Inc.

Resultados

Las gregarinas encontradas en los dos ciclos de cultivo pertenecen al género *Nematopsis*.

Phylum: Apicomplexa

Clase: Sporozoa

Subclase: Gregarinia

Orden: Eugregarinida

Familia: Porosporidae

Género: *Nematopsis*

En este género, los esporontes forman asociaciones de dos o más individuos; llamadas sicigias, la parte anterior se le conoce como Primito y la parte posterior se le conoce como Satélite (Figura 1a). Estos esporontes también forman asociaciones pre-reproductivas con dos a más individuos ya sea en cadena, rectos o bifurcados (Figura 1b), primito con epicito común ligeramente comprimido en la unión del deutomerito y protomerito formando un cuello muscular, protoplasma homogéneo, el gametocito presenta un solo núcleo, protomerito redondeado, primito más corto que el largo del satélite, el núcleo generalmente localizado entre la parte media y posterior del deutomerito y satélite, también presenta un adelgazamiento gradual en la última parte de la sicigia.

De manera general, durante los muestreos realizados se detectaron gametocitos y sicigias en el lumen del intestino

the lumen of the shrimp intestines analyzed during the two culture cycles. The trophozoites were observed, some free in the intestinal lumen and others adhered to the intestinal epithelium, the sporonts forming syzygies, generally predominating those of two associations. The epimeritus was visible in most syzygies. The gametocytes were observed in the rectal ampulla, which is in the last abdominal segment of the hindgut.

de camarones analizados durante los dos ciclos de cultivo procedentes de las cuatro granjas. Los trofozoitos se observaron algunos libres en el lumen intestinal y otros adheridos al epitelio intestinal, los esporontes formando sicigias generalmente predominando las de dos asociaciones. El epimerito fue visible en la mayoría de las sicigias. Los gametocitos fueron observados en la ampolla rectal que se ubica en el último segmento abdominal en intestino posterior.

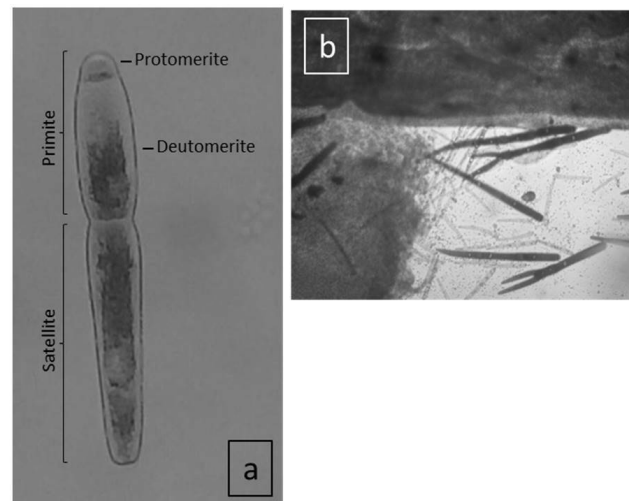


Figure 1. Morphology of gregarines. (a) Typical anatomy of sporont of *Nematopsis* sp (b) Bifurcated syzygy of *Nematopsis* sp. in the lumen of the gut.

Figura 1. Morfología de gregarinas. (a) Anatomía típica del esporonte de *Nematopsis* sp. (b) Sicigias bifurcadas de *Nematopsis* sp. en el lumen del intestino.

The analyzes carried out on the 400 post-larvae from the lots that were sown in the farms showed that there was no presence of intestinal gregarines. In the samples of the organisms sown in the first (May-August) and second cycle (August-November), no presence of gregarines was observed during the first week of cultivation at any of the four monitored farms (Figure 2a and b). In the second week of cultivation, the presence of the parasite was observed in the majority of farms, except in the Las Palmas (Figure 2a) and La Única (Figure 2b) farms in the first and second cycle, respectively. From the first appearance of the parasite, it remained present until harvest (Figure 2). Regarding the mean number of gregarines per organism (Table 1), no significant differences were observed between farms during cycle 1 ($p = 0.2549$) nor in cycle 2 ($p = 0.1517$). However, significant differences were observed between both cycles ($p = 0.0001$).

Los análisis realizados de las 400 post-larvas de los lotes que fueron sembrados en las granjas mostraron que no hubo presencia de gregarinas en el intestino. En los muestreos de los organismos sembrados en el primer ciclo (Mayo-Agosto) y segundo ciclo (Agosto-Noviembre), se observó que durante la primera semana de cultivo no hubo presencia de gregarinas en ninguna de las cuatro granjas monitoreadas (Figura 2a y b). En la segunda semana del cultivo, se observó la presencia del parásito en la mayoría de las granjas, excepto en la granja Las Palmas (Figura 2a) y en la granja La Única (Fig. 2b) en el primer y segundo ciclo, respectivamente. A partir de la primera aparición del parásito siempre estuvo presente hasta la cosecha (Figura 2). En cuanto al número promedio de gregarinas por organismos (Tabla 1), no se observó diferencias significativas entre granjas durante el ciclo 1 ($p = 0.2549$), ni en el ciclo 2 ($p = 0.1517$). Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre ambos ciclos ($p = 0.0001$).

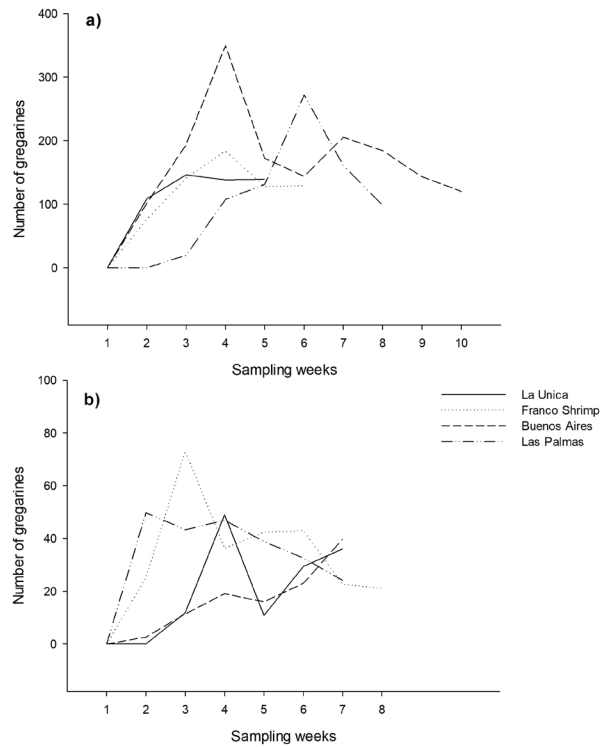


Figure 2. Variation in the mean number of gregarines in four shrimp farms from San Blas, Nayarit. a) May-August cycle, b) August-November cycle.

Figura 2. Variación del número promedio de gregarinas en cuatro granjas camaronícolas de San Blas, Nayarit. a) Ciclo Mayo-Agosto, b) Ciclo Agosto-Noviembre.

Table 1. Number of gregarines (mean \pm standard deviation) by farm and by crop cycle.
Tabla 1. Número de gregarinas (promedio \pm desviación estándar) por granja y por ciclo.

Farm	Number of gregarines	
	May-Aug cycle	Aug-Nov cycle
La Unica	106.4 \pm 61.2	19.6 \pm 18.9
Franco Shrimp	109.7 \pm 63.8	33.0 \pm 21.4
Buenos Aires	161.5 \pm 88.9	16.0 \pm 13.4
Las Palmas	98.7 \pm 93.1	33.6 \pm 17.2
Mean	119.1	25.5

In general, the prevalence of gregarines in both crop cycles was high. This ranged from 75 to 90 % in cycle 1 and 70 to 87 % in cycle 2 (Table 2). The statistical comparison did not show significant differences ($p = 0.4852$) between crop cycles. The degree of severity of the infestation ranged from zero to four in the first crop cycle and from zero to three in the second (Table 2). Consequently, significant differences were observed between crop cycles, being higher in cycle 1. The salinity recorded during the first crop cycle or dry period (May-August) ranged from 26 to 47 PSU, while in the rainy cycle (August-November) was from 6 to 26 PSU. During the dry season, a higher prevalence of gregarines and degree of severity were observed in the farms that presented higher salinity. However, even at lower salinities, both prevalence and degree of severity were high (Table 2). During the rainy cycle, a high prevalence of gregarines was also observed, although with a degree of severity considered low in the four farms. Only the Franco Shrimp farm which presented the highest salinity is where the highest degree of severity was recorded in this cycle (Table 2).

De manera general, la prevalencia de gregarinas en ambos ciclos de cultivo fue alta. Esta osciló de 75 a 90 % en el ciclo 1 y de 70 a 87 % en el ciclo 2 (Tabla 2). La comparación estadística no mostró diferencias significativas ($p = 0.4852$) entre ciclos de cultivo. Los grados de severidad de la infestación fueron de cero a cuatro en el primer ciclo de cultivo y de cero a tres en el segundo (Tabla 2). En ese sentido, se observaron diferencias significativas entre ciclos de cultivo siendo mayor en el ciclo 1. La salinidad registrada durante el primer ciclo de cultivo o secas (Mayo-Agosto) osciló de 26 a 47 UPS, mientras que en el ciclo de lluvias (Agosto-Noviembre) fue de 6 a 26 UPS. Durante el ciclo de secas se observó mayor prevalencia de gregarinas y grado de severidad en las granjas que presentaron mayor salinidad. Sin embargo, aún en salinidades menores tanto la prevalencia como el grado de severidad fueron altos (Tabla 2). Durante el ciclo de lluvias también se observó alta prevalencia de gregarinas aunque con grado de severidad considerados bajos en las cuatro granjas. Solo la granja Franco Shrimp que presentó más alta salinidad es donde se registró el más alto grado de severidad en este ciclo (Tabla 2).

Table 2. Prevalence of gregarines and severity degrees in the white leg shrimp from four farms in San Blas, Nayarit.

Tabla 2. Prevalencia de gregarinas y grados de severidad en el cultivo de camarón blanco de cuatro granjas de San Blas, Nayarit.

Farm	Prevalence (%)		Severity degree		Salinity (UPS)	
	Cycle May-Aug	Cycle Aug-Nov	Cycle May-Aug	Cycle Aug-Nov	Cycle May-Aug	Cycle Aug-Nov
La Unica	80	70	Four	Zero-One	36 ± 0.8	6 ± 0.9
Franco Shrimp	83	87	Three-Four	Zero-Two-Three	35 ± 0.5	26 ± 3.8
Buenos Aires	90	81	Four	Zero-One-Two	44 ± 2.6	16.4 ± 2.2
Las Palmas	75	85	Two-Three-Four	Zero-Two	27 ± 0.9	14 ± 1.8

Finally, it was observed that there was a positive correlation between the mean number of gregarines (degree of severity) and salinity (Table 3). Similarly, there was a correlation between the prevalence of gregarines and the degree of severity with respect to salinity (Table 3).

Finalmente, se observó que existe una correlación positiva entre el número promedio de gregarinas (grado de severidad) y la salinidad (Tabla 3). De igual manera, existe una correlación entre la prevalencia de gregarinas y el grado de severidad con respecto a la salinidad (Tabla 3).

Table 3. Correlation between the prevalence of gregarines and the salinity at farms cultivating whiteleg shrimp in San Blas, Nayarit.

Tabla 3. Correlaciones entre la presencia de gregarinas y la salinidad en granjas de cultivo de camarón blanco en San Blas, Nayarit.

Variables	Spearman R	p
No. of gregarines & Salinity	0.5918	0.0215*
Prevalence & Salinity	0.7229	0.0000*
Degree of severity & Salinity	0.6125	0.0000*

* Shows significant differences ($p \leq 0.05$)

* Muestra diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Regarding the gregarine control method, it was observed that in both farms, the treatment with PREOXOL® significantly reduced the parasite load. In general, the prevalence of gregarines after treatment decreased by more than 90 %, while the degree of severity decreased by up to three degrees (Table 4). In both farms and for all the experimental ponds, PREOXOL® was used 2 to 4 times during the crop cycle, and this allowed the endoparasite to be maintained at these prevalence levels and degree of severity until harvest.

En cuanto al método de control de gregarinas se observó que en ambas granjas el tratamiento con PREOXOL® redujo significativamente la carga parasitaria. De manera general la prevalencia de gregarinas después del tratamiento disminuyó más del 90 %. Mientras que el grado de severidad disminuyó hasta en tres grados (Tabla 4). En ambas granjas y para todos los estanques experimentales el desparasitante se empleó de 2 a 4 veces durante el ciclo de cultivo y ello permitió mantener el endoparásito con estos niveles de prevalencia y grados de severidad hasta la cosecha.

Table 4. Effect of treatment with PREOXOL® against gregarines in shrimp in commercial production.

Tabla 4. Efecto del tratamiento con PREOXOL® contra las gregarinas en camarón en producción comercial.

Farm	Initial (mean)	Prevalence (%)		Severity degree		
		Min-Max	Final (mean)	Min-Max	Initial	Final
El Estero	97	72 - 100	5	8 - 16	Four	One
Los Otates	94	64 - 100	2	2 - 5	Three	Zero-One

Discussion

Gregarines are important disease-causing parasites of wild and farmed penaeid shrimp (Lightner, 1985, Lightner & Redman, 1998). Within this group, the most reported genera in shrimp are *Nematopsis* and *Cephalolobus* (Lightner, 1983). However, in the present study, only the presence of gregarines of the genus *Nematopsis* was found, as previously reported in eight regions dedicated to the cultivation of whiteleg shrimp *P. vannamei* in Latin America (including the Mexican Pacific and the Gulf of Mexico) (Morales-Covarrubias *et al.*, 2011). In wild organisms of species such as *L. setiferus*, *Farfantepenaeus aztecus* and *F. duorarum* from the Gulf of Mexico, the presence of both genera of gregarines has been reported, although with a higher degree of severity (number of parasites per organism) for *Nematopsis* sp. (Chavez-Sanchez *et al.*, 2002). This difference may be due to the aforementioned authors reporting the presence of the genus *Cephalolobus* in the stomach and of *Nematopsis* in the intestines, and in the present study, only the shrimps intestine were studied. However, Saavedra-Bucheli *et al.* (2008) report the presence of *Nematopsis* sp. in the stomach and hepatopancreas.

During the sampling of the post-larvae that were sown on the farms, the presence of gregarines was not observed. This parasite was not observed until the second week of culture. This indicates that the organisms were free of the endoparasite when they were stocked and contracted them in the grow-out ponds. Studies have shown that in ponds in which there is no accumulation of organic matter, as in the case of tanks covered with plastic (liner), there are fewer parasites and a higher shrimp production than in tanks with earth bottoms (Olivas-Valdez *et al.*, 2010). The ponds used in the monitored farms have a soil bottom that allows the presence of a variety of organisms (in addition to shrimp) during cultivation, such as polychaetes, crustaceans, and mollusks. The latter group is intermediaries to complete the life cycle of gregarines (Lightner, 1983). Therefore, they could promote the presence of gregarines in the intestine of the shrimp during the second week of culture. In general, once the presence of the parasite was detected, it remained present until harvest, as has been observed in other studies (Saavedra-Bucheli *et al.*, 2008, Calderón-Pérez, 2009, Guzmán-Sáenz *et al.*, 2014). In this study,

Discusión

Las gregarinas son parásitos causantes de enfermedades importantes en camarones peneidos silvestres y cultivados (Lightner, 1985, Lightner & Redman, 1998). Dentro de este grupo, los géneros más reportados en camarón son *Nematopsis* y *Cephalolobus* (Lightner, 1983). Sin embargo, en el presente trabajo solo se encontró la presencia de gregarinas del género *Nematopsis* tal y como se ha reportado en ocho regiones dedicadas al cultivo de camarón blanco *P. vannamei* de Latinoamérica (incluidos el Pacífico mexicano y el Golfo de México) (Morales-Covarrubias *et al.*, 2011). En organismos silvestres de especies como *L. setiferus*, *Farfantepenaeus aztecus* y *F. duorarum* del Golfo de México se ha reportado la presencia de ambos géneros de gregarinas, aunque con mayor grado de severidad (número de parásitos por organismo) para *Nematopsis* sp. (Chávez-Sánchez *et al.*, 2002). Esta diferencia puede deberse a que estos últimos autores reportan la presencia del género *Cephalolobus* en el estómago y de *Nematopsis* a lo largo del intestino y en el presente estudio solo se revisó el intestino de los camarones. Aunque Saavedra-Bucheli *et al.* (2008), reportan la presencia de *Nematopsis* sp. en estómago y hepatopáncreas.

Durante los muestreos de las post-larvas que se sembraron en las granjas no se observó la presencia de gregarinas. Este parásito se observó hasta la segunda semana de cultivo. Lo cual indica que los organismos estaban libres del endoparásito al ser sembrados y lo contrajeron en los estanques empleados para la engorda. Se ha observado que en estanques en los que no hay acumulación de materia orgánica; como en el caso de tanques recubiertos con plástico (liner), se presenta una menor cantidad de parásitos y tienen una mayor producción de camarón que en tanques con fondos de tierra (Olivas-Valdez *et al.*, 2010). Los estanques empleados en las granjas monitoreadas presentan fondo de tierra lo cual permite la presencia de diversos organismos (además del camarón) durante el cultivo como poliquetos, crustáceos y moluscos. Este último grupo, es empleado como intermediarios para completar el ciclo de vida de las gregarinas (Lightner, 1983). En ese sentido, se considera que esto pudo favorecer a la presencia de gregarinas en el intestino del camarón a la segunda semana de cultivo. De manera general, una vez que se detectó la presencia del parásito, se mantuvo presente hasta la cosecha tal y como se ha observado en otros estudios (Saavedra-Bucheli *et al.*, 2008, Calderón-Pérez, 2009, Guzmán-Sáenz *et al.*, 2014). En este estudio,

the mean number of gregarines per organism ranged from 25.5 to 119.1. The number of gregarines per individual can vary due to environmental conditions and even the shrimp species (Chávez-Sánchez *et al.*, 2002, Jiménez *et al.*, 2002, Aguado-García, 2013). For example, Guzmán-Sáenz *et al.* (2014) found a parasitic load in *P. vanammei* between 8 and 12 gregarines/organism. While Saavedra-Bucheli *et al.* (2008) reported mean values between 23 and 59 gregarines per intestine, and Jiménez *et al.* (2002), reported an oscillation between 10 and 5,000 gregarines for this same species. In farmed blue shrimp *L. stylirostris*, a range of 54 to 134 gregarines/organism has been reported (Saavedra-Bucheli *et al.*, 2008).

Among the main environmental factors that have been investigated are pH, salinity, turbidity, dissolved oxygen and temperature (Gutiérrez-Salazar *et al.*, 2011, Saavedra-Bucheli *et al.*, 2008). Temperature has been reported to directly affect the prevalence of gregarines in whiteleg shrimp (Gutiérrez-Salazar *et al.*, 2011), while Saavedra-Bucheli *et al.* (2008) report that variable salinity such as that produced during the rainy season reached an oscillation of 16 PSU, the degree of infestation by gregarines is greater. In the present study, the prevalence of gregarines did not show significant differences between cycles (cycle 1 or dry, 75-90 %; cycle 2 or rainy, 70-87 %). However, the degree of infestation was higher in the first cycle. Salinity was also different between cycles. During the dry cycle, salinity was higher (26-47 PSU), and a positive correlation between salinity and degree of severity was observed. In reference to the findings of Saavedra-Bucheli *et al.* (2008), the present study did not find the same pattern in the parasites behavior. Salinity variation or oscillation was 21 PSU and 20 PSU for each crop cycle, and even so, significant differences were observed in the degree of infestation between the two sampled cycles. The results of this study show that high salinities could lead to a high degree of gregarine infestation. Durán-Cobo (2016) reported a similar prevalence (49-61 %) in three salinity management schemes (10, 16, and 32 PSU) with degrees of severity of one and two. However, Olivas-Valdez *et al.* (2010) mention that there was no presence of gregarines in low salinity cultures (0.8-1.9 PSU).

Little information is available regarding control methods for gregarine infections. Some producers in the area

el número promedio de gregarinas por organismos osciló entre 25.5 y 119.1. El número de gregarinas por individuo puede variar de acuerdo a las condiciones ambientales e inclusive a la especie de camarón (Chávez-Sánchez *et al.*, 2002, Jiménez *et al.*, 2002, Aguado-García, 2013). Por ejemplo, Guzmán-Sáenz *et al.* (2014), encontró una carga parasitaria en *P. vanammei* entre 8 y 12 gregarinas/organismo. Mientras que Saavedra-Bucheli *et al.* (2008) reportó valores promedios entre 23 y 59 gregarinas por intestino y Jiménez *et al.* (2002), reportaron una oscilación entre 10 y 5,000 gregarinas para esta misma especie. En camarón azul *L. stylirostris* de cultivo, se ha reportado una variación de 54 a 134 gregarinas/organismo (Saavedra-Bucheli *et al.*, 2008).

Dentro de los principales factores ambientales que se han investigado son el pH, salinidad, turbidez, oxígeno disuelto y temperatura (Gutiérrez-Salazar *et al.*, 2011, Saavedra-Bucheli *et al.*, 2008). Se ha reportado que la temperatura afecta de manera directa la prevalencia de gregarinas en camarón blanco (Gutiérrez-Salazar *et al.*, 2011), mientras que Saavedra-Bucheli *et al.* (2008) reporta que al existir poca estabilidad en la salinidad; como lo fue la época de lluvias que alcanzó una oscilación de 16 UPS, el grado de infestación por gregarinas es mayor. En el presente estudio se observó que la prevalencia de gregarinas no mostró diferencias significativas entre ciclos (ciclo 1 o secas, 75-90 %; ciclo 2 o de lluvias, 70-87 %), sin embargo, el grado de infestación fue mayor en el primer ciclo. En ese sentido, también se observó que la salinidad fue diferente entre ciclos. Durante el ciclo de secas la salinidad fue más alta (26-47 UPS) y se observó una correlación positiva entre la salinidad y el grado de severidad. De acuerdo a lo reportado por Saavedra-Bucheli *et al.* (2008), en el presente trabajo no se observó ese mismo patrón de comportamiento del parásito. La inestabilidad de la salinidad u oscilación fue de 21 UPS y de 20 UPS para cada ciclo de cultivo y aun así se observaron diferencias significativas en el grado de infestación entre los dos ciclos muestreados. De acuerdo con los resultados de este estudio, altas salinidades podrían propiciar un alto grado de infestación de gregarinas. Durán-Cobo (2016) reportó prevalencias similares (49-61 %) en tres esquemas de manejo de la salinidad (10, 16 y 32 UPS) con grado de severidad de uno y dos. Por su parte, Olivas-Valdez *et al.* (2010) menciona que no hubo presencia de gregarinas en cultivos de baja salinidad (0.8-1.9 UPS).

En cuanto a métodos de control contra infecciones por gregarinas existe muy poca información. Algunos productores

report using empirical methods, such as the application of quicklime (calcium oxide) and some antibiotics, however, these are applied without proper controls or registration. In general, antibiotics for veterinary use are employed in the production of pigs, cattle, goats, and poultry. However, oxibendazole has not been used as a control method in shrimp production. This antibiotic, as with other benzamidazoles (albendazole, mebendazole, fenbendazole, triclabendazole, oxfendazole, flubendazole, and thiabendazole) have been used against monogeneans, cestodes and protozoa parasites on the skin, gills and internal organs in fish in commercial aquacultures (Athanasopoulou *et al.*, 2009).

Due to benzamidazoles effectiveness and accepted use in fish production, our research sought to test benzamidazoles as a control treatment for gregarines in shrimp farming, with positive results. However, sulfadimethoxine and sulfamethopyrazine are among the most widely used antibiotics in veterinary medicine are due to their low cost and relatively high efficiency against parasites (MVM, 1998, Fajer-Ávila *et al.*, 2005). As previously mentioned, there are few reliable reports on the use of pharmaceuticals to control gregarines in shrimp. However, monensin sodium and sulfachloropyridazine have been rigorously tested (Fajer-Ávila *et al.*, 2005). These authors report that monensin sodium reduced the presence of gregarines by 92 and 94% (at a concentration of 5.5 and 6 g kg⁻¹ of food, respectively), while sulfachloropyridazine reduced gregarines by 85 and 83% (at a concentration of 2.5 and 3.5 g Kg⁻¹ of food, respectively), although the efficiency of both drugs can be considered high, these tests were carried out on a small scale and for a limited period. This study showed that oxibendazole at a concentration of 2g Kg⁻¹ of food is more than 90% effective against gregarines throughout the entire production cycle.

Conclusions

In the majority of cases shrimp did not present gregarines until the second week of culture, therefore, it is important to ensure that these parasites are not present in the ponds before stocking. In addition, once the parasite was detected in the shrimp, it remained in the culture until harvest, highlighting the need for an

de la zona señalan que han hecho uso de métodos empíricos como la aplicación de cal viva (óxido de calcio) y algunos antibióticos, pero sin algún control ni registro como tal. De manera general, se emplean diversos antibióticos de uso veterinario para la producción de ganado porcino, bovino, caprino y aves de corral, sin embargo, el oxibendazol no ha sido un método de control que se haya empleado en la producción de camarón. Este antibiótico al igual que otros benzamidazoles (albendazol, mebendazol, fenbendazol, triclabendazol, oxfendazol, flubendazol y thiabendazol) han sido empleados contra parásitos en piel, branquias y en órganos internos, principalmente monogeneos, cestodos y protozoarios en peces en cultivos comerciales (Athanasopoulou *et al.*, 2009).

Debido a la efectividad en peces y la aceptación del uso de este tipo de benzamidazoles en la producción, se buscó probar un tratamiento de control para gregarinas en el cultivo de camarón, el cual resultó ser muy eficiente. No obstante, dentro de los antibióticos más empleados en la medicina veterinaria son la sulfadimetoxina y la sulfametopirazina, debido a su bajo costo y su eficiencia relativamente alta contra parásitos (MVM, 1998, Fajer-Ávila *et al.*, 2005). Como se mencionó con anterioridad, son escasos los reportes confiables sobre el uso de fármacos contra las gregarinas en camarón. Se han probado de manera rigurosa la monensina sódica y la sulfacloropiridazina (Fajer-Ávila *et al.*, 2005). Estos autores reportan que la monensina sódica disminuyó la presencia de gregarinas en un 92 y 94 % (a concentración de 5.5 y 6 g Kg⁻¹ de alimento, respectivamente), mientras que la sulfacloropiridazina la redujo en un 85 y 83 % (a concentración de 2.5 y 3.5 g Kg⁻¹ de alimento, respectivamente), aunque la eficiencia de ambos fármacos se puede considerar alta, estas pruebas se realizaron a una escala pequeña y por un corto periodo de tiempo. En este estudio, se demostró que el oxibendazol a concentración de 2g Kg⁻¹ de alimento es eficiente en más del 90 % contra las gregarinas, a lo largo de todo el ciclo de producción.

Conclusiones

Debido a que los camarones sembrados en los estanques no presentaron gregarinas hasta la segunda semana de cultivo para la mayoría de los casos, es preciso asegurar que este parásito se encuentra presente en los estanques. Además, se observó que una vez que se detectó el parásito en los camarones ya no desapareció del cultivo, por ello es evidente la necesidad de un método de control eficiente. De igual manera, se pone de manifiesto que la salinidad

efficient control method. Salinity directly affected the degree of severity of the gregarine infestation. We found that PREOXOL® at 1.5% was a highly efficient (more than 90%) as a control method for gregarine parasites in commercial shrimp production.

está directamente relacionada con la concentración de este parásito ya que este factor afectó el grado de severidad de la infestación. En cuanto al método de control empleado con PREOXOL® al 1.5 %, se pudo comprobar a nivel de producción comercial que es altamente eficiente (más del 90 %).

Acknowledgements

The authors wish to thank the representatives of the La Única, Franco Shrimp, Buenos Aires and Las Palmas shrimp farms for donating the studied organisms, as well as El Estero and Los Otates farms for allowing us to use some of their grow-out ponds.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a los representantes de las granjas camarónicas La Única, Franco Shrimp, Buenos Aires y Las Palmas por la donación de los organismos muestreados, así como también a las granjas El Estero y Los Otates por permitimos utilizar algunos de sus estanques durante su producción comercial, para emplear el método de control de endoparásitos.

References

- Aguado-García, N. (2013). Prevalencia y enfermedades y parásitos de camarones de Caño Mánamo, Estado Delta Amacuro Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 52(1), 145-153. <https://core.ac.uk/download/pdf/235929323.pdf>
- Athanassopoulou, F., Pappas, I. S., & Bitchava, K. (2009). An overview of the treatments for parasitic disease in Mediterranean aquaculture. In: The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. Rogers C. and Basurco, B. eds. 65-83 pp. Zaragoza, CIHEAM.
- Auró, A, & Ocampo, L.C. (2006). *El libro del camarón*. Distrito Federal, México, Editorial Universidad Nacional Autónoma de México.
- Calderón-Pérez, V. (2009). Determinación poblacional y control de gregarinas en juveniles (*Litopenaeus vannamei*) con Diclazuril al 5% [Tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Guatemala]. <https://1library.co/document/y651e55z-determinacion-poblacional-gregarinas-juveniles-camaron-litopenaeus-vannamei-diclazuril.html>
- Chávez-Sánchez, M. C., Hernández-Martínez, M., Abad-Rosales, S., Fajer-Ávila, E., Montoya-Rodríguez, L., & Álvarez-Torres, P. (2002). A survey of infectious diseases and parasites of penaeid shrimp from the Gulf of Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society*. 33(3), 316-329. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2002.tb00508.x>
- Clopton, R. E. (2002). Phylum Apicomplexa Levine 1970: Order Eugregarinorida Léger 1900. In: Illustrated guide to the protozoa, 2 edition. Lee J. J., Leedale, G., Patterson, D. and Bradbury, P. C. eds. 205-288 pp. Lawrence, Kansas, USA. Society of Protozoologists.
- Durán-Cobo, M. G. (2016). Evaluación patológica de *Litopenaeus vannamei* cultivados en granjas ubicadas en el estuario de Rio Chone (Ecuador). *Revista Aquatic*, 44, 12-29. <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/272/256>
- Fajer-Ávila, E. J., Morales-Covarrubias, M. S., Abad-Rosales, S., Roque, A., Meza-Bojórquez, P., & Hernández-González, C. (2005). Effectiveness of oral Elancoban™ and Avimix-ST™ against *Nematopsis* (Apicomplexa: Porosporidae) gametocysts infecting the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 244, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.005>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, Italy. Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/3/i5555e/i5555e.pdf>
- Gutiérrez-Salazar, G. J., Molina-Garza, Z. J., Hernández-Acosta, M., García-Salas, J. A., Mercado-Hernández, R., & Galaviz-Silva, L. (2011). Pathogens in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) and their

- relationship with physicochemical parameters in three different culture systems in Tamaulipas, Mexico. *Aquaculture*, 321(1-2), 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.032>
- Guzmán-Sáenz, F. M., Pérez-Castañeda, R., Gutiérrez-Salazar, G., González-Alanís, P., Hernández-Acosta, M., & Sánchez-Martínez, G. J. (2014). Impacto de la parasitosis por Gregarinas (*Nematopsis* sp) en el cultivo de camarón. *Ra Ximhai*, 10(6), 1-8. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46132135001>
- Jiménez, R (1991). Análisis de gregarinas asociadas al detenimiento de crecimiento en camarones *Penaeus vannamei*. *Acuicultura de Ecuador*, 16, 38-44.
- Jiménez, R., de Barniol, L., & Machuca, M. (2002). *Nematopsis marinus* n. sp., a new septate gregarine from cultured *Litopenaeus vannamei* (Boone), in Ecuador. *Aquaculture Research*, 33(4), 231-240. <https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2002.00647.x>
- Levine, N. D. (1985). Phylum II Apicomplexa Levine, 1970. In: An illustrated guide to the protozoa. Lee, J. J., Hunter, S. H. and Bovee. E. C. eds. 322-374 pp. Lawrence, Kansas. USA. Society of Protozoologists.
- Lightner, D. V. (1983). Diseases of cultured penaeid shrimp. In: Handbook of mariculture, vol. 1, Crustacean aquaculture. McVey, J. P. ed. 289-320 pp. Boca Raton, Florida. CRC Press.
- Lightner, D. V. (1985). A review of the diseases of cultured penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. In: Proceedings of the first international conference on the culture of penaeid prawns/ Shrimps. Taki, Y., Primavera, J. H. and Llobrera, J. A. eds. 79-103 pp. Iloilo City, Philippines. Publisher Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Lightner, D. V. (2010). *A handbook of shrimp pathology and diagnostic for disease of cultured shrimp (Crustacea: Decapoda) gross signs*. USA. The World Aquaculture Society.
- Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164, 201-220. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00187-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00187-2)
- MVM. (1998). *The Merck Veterinary Manual, eighth edition*. New Jersey. Merck and Co.
- Morales-Covarrubias, M. S. (2010). *Enfermedades del camarón, detección mediante el análisis en fresco e histopatología*. Editorial Trillas. S.A. de C.V.
- Morales-Covarrubias, M. S., Ruiz-Luna, A., Moura-Lemus, A. P., Solís-Montiel, V. T., & Conroy, G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. *Revista Científica*, 21(5), 434-446. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95919362010>
- Olivas-Valdez, J. A., Cáceres-Martínez, J., & Vásquez-Yeómans, R. (2010). Patógenos que afectan el cultivo de *Litopenaeus vannamei* en ambiente marino y dulce acuícola en el estado de Baja California. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 18 (3), 1-25. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63613123013>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2008). Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos 2006. Ed. OMSA.
- Pantoja, C., & Lightner, D. V. (2008). Enfermedades virales. In: Guía Técnica de Patología e Inmunología de camarones Penaeidos. Vielka-Morales, Q. and Ánjel-Cuellar, J. eds. 55-114 pp. Panamá. Programa CYTED Red II- D vannamei. http://www.cesasin.com.mx/LIBRO_PATOLOGIA0EINMUNOLOGIA.pdf
- Prado-Garcés, C. A. (1996). Diagnóstico, tratamiento y prevención de infestación causadas por gregarinas en camarones *Penaeus vannamei* mediante dieta medicada (Tesis de licenciatura). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencia del Mar. Guayaquil, Ecuador. 1-23 pp. <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/4634/1/7155.pdf>
- Saavedra-Bucheli, M., Álvarez-León, R., & Rey-Carrasco, I. (2008). Análisis de la incidencia de gregarinas en cultivos comerciales de *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris* en el sur del Caribe colombiano. *Archivos de Ciencias do Mar*, 41(1), 9-23. <https://labomar.ufc.br/wp-content/uploads/2017/01/acm-2008-41-1-02.pdf>
- SAGARPA, (2015). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013. Mazatlán, México. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca>
- Wayne, W. D. (1991). *Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud*. 3ª edición. Distrito Federal, México. Editorial Limusa. https://www.academia.edu/17988752/Bioestadistica_Base_para_el_analisis_de_las_ciencias_de_la_salud