639.543
SOT

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA
DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima
y Ciencias del Mar

"Obtención de un Modelo do Infección Experimental en Juveniles de Penaeus vannamei, con el Vibrio vulnif icus"

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCION DEL TITULO DE

ACUICULTOR

Presentada por:
MARIA **AUXILIADORA SOTOMAYOR**
MACIAS

2000

CIB
D-20722

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

" Obtención de un Modelo de Infección Experimental en Juveniles de *Penaeus vannamei* , con el *Vibrio vulnificus*".

TESIS DE GRADO

previa la obtención del Título de:

ACUICULTOR

Presentada por:

María Auxiliadora Sotomayor Macías

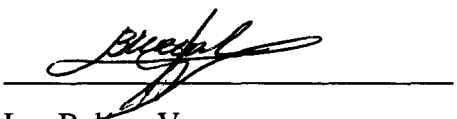
2000

DEDICATORIA

A *Dios*,

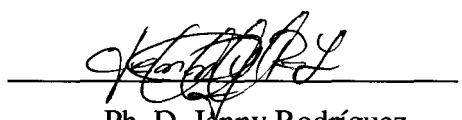
a mis padres,

y hermanas



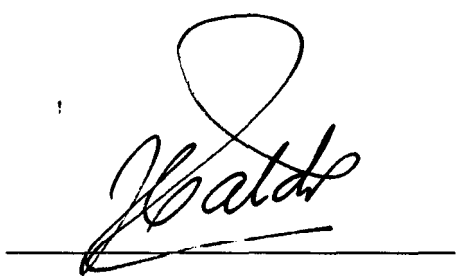
Ing. Bolívar Vaca

Presidente Tribunal



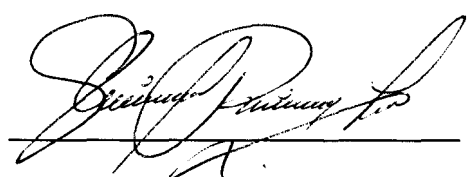
Ph. D. Jenny Rodríguez

Director de tesis



V.,Ph. D. Jorge Calderón

Miembro del Tribunal



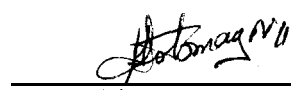
Ac. Gabriel Rivera

Miembro del Tribunal

DECLARACION EXPRESA

"La responsabilidad para los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y, el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL".

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL)



María Aux. Sotomayor Macías

AGRADECIMIENTO

A Dios, amado padre, por darme la oportunidad de conocer y vivir junto personas hermosas de corazón.

A mis padres, por ser mi refugio en las tempestades y el paraíso en las alegrías, por darme con muchos esfuerzos todo lo que soy, gracias por quererme.

A mami Gigi, Ruth, Eli, Pedro y Eduardo por ser mis hermanos.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas y a su director Jorge Calderón V.,Ph D, por darme la oportunidad de realizar esta tesis.

A Inge Visser, por darme la oportunidad y muchas facilidades para realizar esta tesis.

A mi directora de tesis, Dra. Jenny Rodríguez, que con sus ideas ha hecho que descubriera un mundo diferente, a que ame a este trabajo, gracias por sus consejos, y guía .

A mi segunda directora, Ac. Sonnya Mendoza, gracias no sólo por enseñarme y ayudarme en todo lo que he aprendido, sino sobre todo por convertirme en tu amiga.

A mis mejores y queridas amigas: Meche, Lita, Bertha, Sonnya, con ustedes el trabajo me fue muy ligero y las tristezas menos dolorosas.

Gracias a mis hermanos inmunólogos: Marcelo, Ricardo y Ernesto, porque cerca o lejos de mí han cuidado y seguido esta tesis, gracias por enseñarme y soportar a esta nueva integrante de la familia. Uds. son y serán el ejemplo que seguiré.

A todos los técnicos del área sobre todo a Fanny, Rosa, Bonny, Irma, Marina, y Franklin.

Gracias a todo el personal del CENAIM porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

A todos los que conocí en este tiempo y a aquellos que seguirán .

TABLA DE CONTENIDOS

Tabla de contenidos ii

Indice de figuras v

Indice de tablas viii

Abreviaturas x

Resumen xiii

Introducción 1

1. Antecedentes

1.1 Enfermedades producidas por bacterias en el cultivo de camarón en el Ecuador

1.1.1 Generalidades 3

1.1.2 Vibrios marinos asociados a enfermedades bacterianas en el camarón 4

1.1.3. Características y Biología del *Vibrio vulnificus* 6

1.2. Antibióticos y resistencia bacteriana. 10

1.2.1. Clasificación de los antibióticos de acuerdo a su actividad 12

1.2.3. Mecanismo de acción de los antibióticos 14

1.2.4. Resistencia bacteriana a los antibióticos 15

1.2.5 Mecanismos bioquímicos implicados en la resistencia a antibióticos 19

1.3. Sistema inmunitario del camarón y sus mecanismos de defensa 23

1.3.1. Mecanismos de defensa a mediación celular: Hemocitos 24

1.3.2. Mecanismos de defensa humoral 27

1.4. Patogenicidad bacteriana y sus mecanismos 28

1.5. Infecciones experimentales realizadas en Peneidos 37

1.5.1. Interacción huésped -patógeno 37

1.5.2. Modelos de infecciones experimentales 39

2. Materiales y Métodos

2.1. Interacción patógeno – huésped 41

2.1.1. Protocolo para preparar bacterina 41

2.1.2. Protocolo para preparar periplasma 41

2.1.3. Producción de Anión Superóxido 42

2.1.4. Cuantificación de la Actividad Fenoloxidasa 43

2.15. Actividad Antibacteriana 44

2.2. Infecciones

2.2.1. Aumento de la virulencia bacteriana 44

2.2.1.1. Confrontación con el Sistema inmune del camarón 44

Selección de bacterias con capacidad de crecer en el plasma 45

Selección de bacterias que inhiben el choque respiratorio 47

2.2.1.2. Selección por crecimiento en medio de cultivo 48

2.2.2. Desinfección de Camarones 49

2.2.2.1. Metodología de desinfección 50

2.2.2.2. Técnicas bacteriológicas 52

Análisis Microbiológicos 54

Pruebas Bioquímicas 55

2.2.2.3. Inmunoensayos 58

Colony Blot 58

Dot Blot 60

2.2.2.4. Técnica de Biología Molecular 60

2.2.2.5. Técnica de Histología 62

2.2.3. Infecciones experimentales de camarones 66

2.2.3.1. Primer experimento de infección 66

2.2.3.2. Segundo experimento de infección 67

2.2.3.3. Tercer experimento de infección 69

2.2.3.4. Cuarto experimento de infección 70

3. Resultados y Discusión 72

3.1. Interacción patógeno- huésped 72

3.1.1. Producción de Anión Superóxido (O^-_2), vs. *V. vulnificus* 73

3.1.2. Estimulación del Sistema Fenoloxidasa por parte del V. *vulnificus* 74

3.1.3. Actividad Antibacteriana 76

3.2. Optimización de un protocolo de infección en juveniles de *P. vannamei*

3.2.1. Aumento de la virulencia bacteriana 78

3.2.1.1. Confrontación con el sistema inmune del camarón 78

3.2.2. Desinfecciones 82

3.2.2.1. Primer experimento de desinfección 82

3.2.2.2. Segundo experimento de desinfección 86

3.2.2.3. Tercer experimento de desinfección 89

3.2.2.4. Cuarto experimento de desinfección 91

3.2.3. Infecciones 93

3.2.3.1. Primer experimento de infección 93

3.2.3.2. Segundo experimento de infección 95

3.2.3.3. Tercer experimento de infección 97

3.2.3.4. Cuarto experimento de infección 99

3.2.3.5. Protocolo estandarizado de infección 102

4. Conclusiones y Recomendaciones 109

Referencias bibliográficas 111

Anexos 122

INDICE DE FIGURAS

Fig.1.	Mecanismos de adherencia bacteriales	30
Fig. 2.	Estructura de Endotoxina	35
Fig. 3.	Aumento de la Virulencia en la Cepa *V. vulnificus* (S2)	45
Fig. 4.	Selección de bacterias por su capacidad de aumentar su crecimiento en plasma de camarón con elevada actividad antibacteriana	46
Fig. 5	Vista parcial de la sala de experimentación de infecciones experimentales	50
Fig. 6.	Tiempos de desparafinado e hidratación	63
Fig. 7.	Producción de Anión Superóxido, usándose varios tipos de estimulantes	73
Fig. 8.	Estimulación de la actividad fenoloxidasa en tres muestreos	75
Fig. 9.	Actividad antibacteriana del plasma y el porcentaje de inhibición de crecimiento de tres tipos de bacterias	77
Fig.10.	Crecimiento del *V. vulnificus* en dos muestras de plasmas	79
Fig.11.	Estimulación de dos cepas de V. *vulnificus* en la producción de O_2^-	80
Fig. 12.	UFC/ ml del V. *vulnificus*, sometido a varias muestras de plasma en dos concentraciones de cloruro de sodio en agar LB	81
Fig. 13.	Presencia de bacterias observadas por histología, en animales sometidos a desinfección con varias concentraciones de antibióticos	85
Fig. 14.	Observación histológica de túbulos normales y levemente lisados de animal desinfectado con el tratamiento 40 ppm de oxitetraciclina y 40 ppm de cloranfenicol	85
Fig. 15.	Observación histológica de una encapsulación hemocítica, lisis de túbulos en animal no desinfectado	85
Fig. 16.	Concentración de bacterias medidas por turbidez en macerados de corazón de animales desinfectados con diferentes concentraciones de antibióticos	88
Fig. 17.	Porcentaje de animales desinfectados y UFC/g. de hepatopáncreas	89

recuperadas, al aplicarse 40 ppm de oxitetraciclina y cloranfenicol

Fig. 18. Densidad óptica de crecimiento bacteriano en macerados de corazón, luego de la aplicación de dos concentraciones de antibióticos (30 ppm y 40 ppm) 90

Fig. 19. Porcentaje de animales desinfectados al tiempo 12 horas, aplicando 30 ppm de oxitetraciclina- cloranfenicol y 40 ppm de oxitetraciclina y cloranfenicol 91

Fig. 20. Reconocimiento del *V. vulnificus*. a) Fotografía RAPD,, positiva b) Dot blot con anticuerpo específico 94

Fig. 21. Indice de histología y UFC/g de hepatopáncreas de animales infectados con dos concentraciones de V. *vulnificus* 95

Fig. 22. Observación histológica de hepatopáncreas y estómago de animal infectado con 10' b/ml con V. *vulnificus* 96

Fig. 23. Porcentaje de animales infectados con *V. vulnificus* (S,) y recuperación de UFC/g. de hepatopáncreas, aplicando dos concentraciones de *V. vulnificus* en animales previamente desinfectados con 40 ppm de antibióticos 96

Fig. 24. Indice histológico y UFC/g de hepatopáncreas de animales sometidos a las concentraciones 10^3, 10^4,10^5 y 10^6 bacterias/ml 98

Fig. 25. Porcentaje de animales infectados con ***V. vulnificus y*** UFC/g. de hepatopáncreas, utilizando cuatro concentraciones de inóculo bacteriano 99

Fig. 26. Porcentaje de animales infectados y número de bacterias recuperadas luego de realizar una infección con cuatro concentraciones de inóculo bacteriano L00

Fig. 27. Indice histológico y UFC/g de hepatopáncreas en agar Marino, de animales infectados con las concentraciones 10^4, 10^5,10^6 y 10^7 bacterias/ml /ml 101

Fig. 28. Observación histológica de hepatopáncreas con túbulos lisados y 101

encapsulados, de un animal infectado con *V. vulnificus* en la concentración de 10^7bacterias/ml

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características del género Vibrio y otros géneros morfológicamente iguales 5

Tabla 2. Diferencias bioquímicas del *V. vulnificus y V. harveyi* (Tomado Bergey, 1994) 8

Tabla 3. Características bioquímicas del *V. vulnificus* (Tomado de Siavichay, 1997) 9

Tabla 4. Factores de virulencia que promueven la colonización y supervivencia de las bacterias 28

Tabla 5. Características de las endotoxinas y exotoxinas clásicas de las bacterias. (Tomado de Levinson y Jawetz, 1998) 35

Tabla 6. Metodología y tiempos de deshidratación utilizados en histología 63

Tabla 7. Ponderación No.1. para calificación por el nivel de significancia de la patología 65

Tabla 8. Ponderación No. 3. calificación dada según el nivel de infección de la patología 66

Tabla 9. Intervalos de tiempo entre la desinfección y aplicación de la bacteria en la primera infección 69

Tabla 10. Indice de histología (I.H.) y número de bacterias observadas por histología en animales expuestos a varias concentraciones de antibióticos 83

Tabla ll. Observaciones microbiológicas e histológicas de animales expuestos a varias concentraciones de antibióticos 87

Tabla 12 Densidad óptica de los macerados de corazón en los dos tratamientos de desinfección con antibióticos y el control 91

Tabla 13. Unidades formadoras de colonias/g de hepatopáncreas recuperadas en 94

agar TCBS de animales infectados con dos métodos de infección

Tabla 14. Protocolo para desinfección en la sala de experimentación 103

Tabla 15. Protocolo de infección en la sala de experimentación 104

Tabla 16. Técnicas de análisis 104

Tabla 17. Diluciones recomendadas para análisis microbiológicos 105

Tabla 18. UFC/ g. de hepatopáncreas, Indice histológico, densidad óptica de macerados de corazón y número de bacterias observadas por histología, de animales expuestos a varias concentraciones de antibióticos. (Segunda desinfección) 127

Tabla 19. Observaciones microbiológicas y D.O. (550nm) de macerados de corazón. de animales expuestos a varias concentraciones de antibióticos.(Tercera desinfección) 128

Tabla 20. UFC/g. de hepatopáncreas y densidad óptica de macerados de corazón de animales desinfectados con dos tratamientos de antibióticos, al tiempo 12 horas. (Cuarta desinfección) 128

Tabla 21 Indice de histología y UFC/g. de hepatopáncreas recuperadas de animales infectados con V. *vulnificus,* con dos concentraciones de bacterias. (Segunda infección) 128

Tabla 22. Indice histológico y UFC/g. de hepatopáncreas, de animales infectados con cuatro dosis de bacterias de *V. vulnificus*. (Tercera infección) 129

Tabla 23. Indice de histología y UFC/g de hepatopáncreas, de animales infectados con varias concentraciones de *V. vulnificus*. (Cuarta infección) ,129

HP = Hepatopáncreas

I.B = Identificación bioquímica

I.H. = Indice histológico

Ili = *V. alginolyticus*

kDa = Rilo dalton

l = Litros

L – Dopa = L - 3.4 - di hidroxifenil - alanina

LB = Caldo Luria Bertani

LPS = Lipopolisacáridos

M = Molar

min. = Minuto (s)

mM = Milimoles

NB = Caldo nutritivo

NBT = Nitro blue tetrazolium

No = Número

O_2 = Anión superóxido

OF = Oxidativo – fermentativo

PBS = Tampón sodio fosfato

PH = Potencial de hidrógeno

PMA = Phorbol 12 myristate 13 acetate

PO = Fenoloxidasa

ppm = Partes por millón

proPO = Profenoloxidasa

PSI = Sistema Internacional de presión

rpm. = Revoluciones por minuto

ROI_s = Reactivos intermediarios de oxígeno

S_2 = *V. vulnijicus*

TAE = Tris acido acético

Taq = Enzima polimerasa de *Termus acuaticus*

TCBS = Agar thiosulfato citrato sales biliares.

TM = Toneladas métricas

TSA = Agar triptico de soya

TSB = Caldo triptico de soya

Tween 20 = Polioxietilen sorbitano monolaurato

UPS = Unidades prácticas de salinidad

UV = Ultravioleta

v/v = Volumen / volumen

VP = Voges Proskauer

RESUMEN

Para identificar marcadores inmunitarios de resistencia a vibriosis es necesario contar con protocolos estandarizados de infecciones en animales juveniles en *Penaeus vannamei.* Para lo cual se utilizó el patógeno *Vibrio vulnificus*, causante del síndrome de Bolitas en larvas, en animales juveniles de 3 a 8 gramos por el método de inmersión, previa desinfección de los animales, con dos antibióticos: oxitetraciclina y cloranfenicol. La inoculación del patógeno se realizó a diferentes concentraciones 10^8, 10^7,10^6,10^5,10^4, y 10^3 bacterias/ml, en dos aplicaciones con un respectivo recambio intermedio. Se utilizaron métodos microbiológicos (para hepatopáncreas y corazón), histológicos, inmunológicos (Dot Blot) y moleculares (AP-PCR) para observar la colonización e invasión de los tejidos.

ESPOL
CIB ESPOL

INTRODUCCION

El cultivo de camarón *Penaeus vannamei* y su rápido crecimiento como industria a nivel mundial, ha sido afectado por conocidos y nuevos agentes infecciosos tales como virus, bacterias, hongos y protozoos (Lightner *et* al., 1992). Estos agentes no sólo han afectado al Ecuador, sino también a otros países productores de esta especie a nivel mundial.

El Ecuador desde 1970, ha logrado convertirse de un pequeño productor a uno de los principales productores dentro del sector acuícola, llegando en 1998 a producir 159. 878 TM de camarón, convirtiéndose en el primer exportador de camarón en cautiverio en el hemisferio Occidental, y segundo del mundo. (Cámara Nacional de Acuicultura, 1999).

ESP
CIB

Pero en este proceso, el país ha tenido que solventar y superar los estragos de muchos agentes infecciosos, experimentado reducciones en su producción, siendo incapaz de poder anticipar y prevenir los estragos de los mismos, por carecer de herramientas confiables con bases científicas y técnicas, motivando la necesidad de tener dicha información, misma que será la base para el mejoramiento de la productividad de la industria, evitando o reduciendo significativamente las pérdidas por problemas de procedencia patológica.

Son estos agentes y sus consecuencias, los que hacen necesario un diagnóstico y un tratamiento de las enfermedades, en conjunto con el conocimiento del proceso de infección de las mismas, un factor de importancia significativa.

Por ser, la comprensión de las bases fisiológicas y bioquímicas de las enfermedades infecciosas en el hombre, lo que ha logrado en la medicina influir en las medidas terapéuticas y preventivas , es necesario que sean estos principios los que imperen en el campo acuícola para solventar problemas de naturaleza patológica, principios que hasta

ahora han sido superados por el empirismo, pero que necesitan estudios profundos que ayuden al sector a prevenir o reducir las pérdidas por este origen.

Debido a que estas pérdidas, han afectado a productores, trabajadores y a la economía de países es necesario brindar al sector productor, herramientas de diagnóstico de infecciones bacterianas que permitan su prevención. Un área de creciente interés en ese sentido, es la selección genética de reproductores, según criterios de resistencia a infecciones bacterianas, en particular vibriosis. Para trabajar en esta línea, se hace necesario identificar marcadores inmunitarios, que permitan cumplir con este objetivo.

El presente estudio tuvo el objetivo de obtener un modelo de infección experimental en juveniles de *P. vannamei*, donde se pueda introducir bacterias recuperadas de animales enfermos, e introducir dichos microorganismos en animales sanos, para determinar si la presencia de estos microorganismos son causantes de daños o de mortalidades para esta especie recuperando la bacteria basándonos en los postulados de Koch, y estimulando su patogenicidad al someterla en un proceso de selectividad, antes de ser ingresada en el modelo experimental con camarones juveniles. Este estudio, será la base que permitirá identificar marcadores inmunitarios según criterios de resistencia a infecciones bacterianas, que permitan la selección genética de reproductores, y anticipar los efectos de los agentes infecciosos en los cultivos, facilitando la implementación de medios que faciliten el control de sus sistemas al sector reproductor.

1. ANTECEDENTES

1.1. ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR BACTERIAS EN EL CULTIVO DE CAMARÓN EN EL ECUADOR

1.1.1. Generalidades

Al igual que otros países productores de camarón en cautiverio, nuestro país ha experimentado en los últimos años reducciones en sus volúmenes exportables, a causa de fenómenos patológicos de orígenes diversos, sin poder anticiparlos o prevenirlos. Según Lightner et al. (1992) estas patologías son producidas por agentes infecciosos como bacterias, protozoos, virus, y hongos. Siendo identificadas las bacterias del género Vibrio, causantes de enfermedades y muchas patologías en *P. vannamei* (Mohney et *al.,* 1994).

En los peneidos, el género Vibrio ha sido encontrado en todos los estadios de crecimiento, infectando a nivel cuticular, entérica o sistemáticamente, produciendo altas mortalidades en larvas, y animales de engorde (Chen y Hanna, 1994; Song *et al.,* 1993; De la Peña *et al.,* 1993).

Para Lightner y Lewis (1975), los vibrios son patógenos oportunistas que toman ventaja de algunas condiciones, como deficiencias nutricionales, estrés, e infecciones virales. Produciendo pobre crecimiento, cutícula suave, daño hepatopancreático, y cromatóforos expandidos (Lightner *et al.,* 1997).

Estas enfermedades son consecuencia en muchos de los casos de los sistemas de cultivo empleados, intensivo, semi-intensivo y extensivo. La alta densidad de camarones es la posible causa para que exista proliferación bacteriana en estos cultivos, ya que permiten la adaptación y selección de cepas que normalmente se encuentra en el medio acuático o formando parte de la flora intestinal (Sindermann & Lightner, 1988). Entre las especies de vibrios, reportados como patógenos para muchos cultivos de camarón del mundo, se

puede distinguir al *Vibrio alginolyticus* (Lightner, 1983), *Vibrio damsela* (Song *et al.*, 1993), *Vibrio parahaemolyticus* (Mohney *et al.*, 1994), *Vibrio campbellii* (Hammed, 1995) *y Vibrio haweyi* (Morales, 1992). Lamentablemente, a pesar de conocer a estos agentes infecciosos, como los causantes de pérdidas económicas en la producción de camarón, se continúa manejando métodos de control empíricos que producen pocos resultados a largo plazo.

En el Ecuador entre las enfermedades bacterianas, que han afectado a los Peneidos podemos mencionar; el Síndrome de la Gaviota, Necrosis Hepatopancreática (NHP), Micobacteriosis, el Síndrome de bolitas y el Síndrome de la Zoea

1.1.2. Vibrios marinos asociados a enfermedades bacterianas en el camarón

Los agentes bacterianos que afectan al camarón según el Manual de Bergey (1994), han sido clasificados dentro de tres familias (Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, y Pseudomonaceae), siendo la famila Vibrionaceae la más representativa (Ligther *et al.*, 1992).

La Familia Vibrionaceae pertenece al grupo V en la clasificación de Bergey (1994). Los Vibrios se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, aeróbicos / anaerobios facultativos, de forma recta o curva; mótiles por medio de flagelos polares (excepto *Aeromonas salmonicida*). Además son quimiorganotróficos con metabolismo respiratorio-fermentativo. Teniendo tres géneros, Vibrios, Aeromonas y Photobacterium (Tabla 1.).

Tabla 1.- Características del género Vibrio y otros géneros morfológicamente iguales

Características	Vibrio	Photobacterium	Aeromonas	Plesiomas
Flagelo polar cubierto	+			
Acumulación de poly B hidroxybutyrate	-	+		
Requerimiento Na' para crecimiento	+	+		
Lipasa	(+)b	D	(+)	
Sensibilidad O/129	+	+		
Motilidad	+	+	(+) e	
Utilización de D- manito1	(+)c		(-)	

Donde: + Todas las especies son positivas, (+) Muchas especies son positivas, - Todas las especies son negativas, (-) Muchas especies son negativas, D Algunas especies son positivas, b Algunas especies son negativas, V. ***nereis,*** V. ***anguillarun biovar*** II, y V. ***costicola*** son negativos, c son negativos V. nereis, V. ***anguillarun biovar II, y V. marinus***, d hay ciertas excepciones, e excepto ***A. salmonicida.***

Las bacterias del género Vibrio se asocian con mayor frecuencia con las enfermedades del camarón (Mohney et al., 1994). Tienen forma de bacilos curvos o rectos, de 0.5 - 0.8 µm de ancho y 1.4 - 2.6 µm de largo. Presentando motilidad gracias a uno o más flagelos.

Están encerrados en una envoltura continua con la membrana externa de la pared celular (Singleton & Sainsbury, 1993). La pared de los vibrios es de estructura simple y son organismos anaerobios facultativos (Drlica, 1992), que no desnitrifican o fijan N_2.

Su crecimiento es estimulado por la presencia de iones de Na', siendo necesario este elemento en algunas especies, así el ***Vibrio*** *Pacini* es capaz de crecer en salinidades entre 5-700 milimolar (mM), ***y*** los ***Vibrio*** *cholerae* ***y Vibrio metschnikovii*** en 5-15 mM de sodio (Baumanm et al., 1980; *fide* Bergey,1994). Con el Síndrome de la Gaviota Lightner *et al* (1992), observaron al elevarse las salinidades de O-15 Unidades Prácticas de Salinidad (UPS) a 20- 30 UPS, un incremento y proliferación de bacterias del género Vibrio.

El hábitat de los miembros de este género corresponde a ambientes cálidos y alcalinos, creciendo en una variedad de medios con temperaturas oscilantes entre 20°C y 30°C, además son capaces de soportar temperaturas extremas de 4°C y 45°C, y un pH favorable de 10. Razón por lo cual (Colwell & Kaneko, 1974; *fide* Spira ***et al.***,1981), no encontraron al *V.* ***parahaemolyticus*** en muestras de agua tomadas en meses de invierno de la Bahía Chesapeake, aunque sí estaba en el sedimento muestreado, reapareciendo en la columna de agua al aumentar la temperatura y el número de organismos zooplantónicos.

ESPOL 1958 CIB · ESPOL

1.1.3. Características y Biología del *Vibrio vulnificus*

El *V. vulnificus* es una bacteria con características halófilas (Horre ***et al.,*** 1996) comúnmente encontrado en ambientes estuarinos, y cálidos. Austin & Austin (1987), detectaron en el ***Vibrio*** *vulnificus* (caracterizado por poder fermentar lactosa), un nuevo tipo, al que denominó Biotipo 2. Este nuevo tipo a más de tener las características bioquímicas del género, no presenta reacción en índol, manito1 y sorbitol, provocando hemorragias en el cuerpo y cola de peces enfermos.

El *V. vulnificus* es la causa de enfermedades reportadas desde 1964, en las costas de Estados Unidos (Austin & Austin, 1987), Japón y Taiwan (Horre ***et al.,*** 1996). En humanos este vibrio puede causar gastroenteritis y síndrome de septicemia primaria particularmente en pacientes con enfermedades hepáticas (Blake ***et al.,*** 1979; *fide* Colwell, 1984). Personas sanas por ingerir alimento marino contaminado con V. *vulnificus* pueden presentar, vómito, diarrea y dolor abdominal. Los signos clínicos de esta enfermedad han sido asociados con la ingestión de ostras. En personas enfermas del hígado, diabetes, cáncer o inmunodeprimidas, se han observado mortalidades por septicemia primaria, superior al 50% a pesar de los cuidados médicos y terapia antimicrobial (Bush ***et al.,*** 1997). Este vibrio junto con *el* ***Vibrio*** *cholerae, V. parahaemolyticus* ***y*** *V. alginolyticus*

han sido aislados de lesiones superficiales en humanos donde son colonizadores oportunistas (Baumann et al., 1973; *fide* Bergey 1994). En peces el V. *vulnificus* (Biotipo 2), puede y causa cambios patológicos a nivel del tracto gastrointestinal, branquias, corazón e hígado (Miyazakui ***et al.*** 1977; *fide* Austin & Austin, 1987).

La patogenicidad de este vibrio radica en la producción de una cápsula con una amplia variedad de carbohidratos ricos en amino-azúcares, esta cápsula provee una resistencia a la actividad bactericida y fagocitaria. Se ha observado que los niveles de hierro están vinculados con la patogenicidad del *V. vulnificus* (Wright ***et*** aZ.1981; *fide* Litwin ***et al.,*** 1996). Según Bergey (1994), *el V. vulnificus* se diferencia de otras especies de vibrios por tener 4-10 flagelos, rápido crecimiento en medios salinos, capacidad de crecer hasta 40°C, ser capaz de utilizar D-galactosa, celobiosa, D-gluconato, D-dihydrolasa, sin asimilación de sucrosa, L-serina, y putresina.

Solís (1996), mediante las pruebas bioquímicas miniaturizada en microplacas, determina las características metabólicas principales de este vibtio diferenciándolo del *Vibrio* ***haweyi*** por la luminiscencia del segundo.

Las características metabólicas del *V. vulnificus* y V. ***haweyi*** están descritas en la Tabla 2, mientras que la Tabla 3. resume las características bioquímicas encontradas en ***V. vulnificus*** aisladas y determinadas por Siavichay (1997).

Tabla 2. Diferencias bioquímicas del *V. vulnificus y V. harveyi (Tomado* Bergey, 1994)

Características Bioquímicas	*V. harveyi*	*V. vulnificus*
Lysina descarboxilasa	+	+
Voges -ProsKauer 24h	-	
Ornitina descarboxilasa	+	+
Inositol ácido	-	
Sucrosa ácido	d	-
3 - 12 flagelos polares	-	-
Flagelo lateral cuando crece en medio sólido	+	-
Forma bastón	+	-
Utilización de:		
L - arabinosa	d	
D - mannosa	+	+
D - galactosa	d	+
Sucrosa	d	+
Celobiosa	+	+
Lactosa	-f	df
D-gluconato	+	+
D-glucoronato	+	+
Citrato	+	+
D- manito1	+	d
L - arginina	d	+
L -ornitina		-
Arginina dihidrolasa	-	-
Gas de D- glucosa		
Oxidasa	+	+
Na+ para crecer	+	+
Luminiscencia	d	

+ = más del 90% de las capas son positivas

- = más del 90 % de las cepas son negativas

d = 11 -- 89 % de las cepas son positivas

_f = cepa incapaz de producir lactosa

Tabla 3. Características bioquímicas del *V. **vulnificus*** (Tomado de Siavichay, 1997)

Características	*V. vulnijkus*
0 %	
Oxidasa	+
Catalasa	+
OF	+
OF	+
Indol	+
VP	
Citrato	+
Ornitina	+
Arginina	
Arabinosa	
Celobiosa	+
Manosa	+
Manito1	+
Sucrosa	
Glucoronato	+
Gluconato	+
Galactosa	+

ESPOL
CIB ESPOL

La bacteria *V. **vulnificus*** conocida como S_2, produjo en larvas de *P. vannamei* altas mortalidades (Morales, 1992). Observándose presencia de células globulosas individualizadas en el hepatopáncreas e intestino, producto de la descarnación de las células epiteliales, razón por lo cual se la llamó "Síndrome de las bolitas". También se observó que los animales dejaban de alimentarse, ausencia de heces, y falta de movimientos contráctiles del tubo digestivo. Las mortalidades fueron mayores cuando se presentaba en estadios más jóvenes como zoea y mysis, pudiendo llegar a perderse el 90% de la población en 24 horas (San Miguel, 1996).

1.2. ANTIBIÓTICOS Y RESISTENCIA BACTERIANA

El descubrimiento y utilización de antibióticos, ha sido uno de los hechos más importantes para el tratamiento de infecciones bacterianas tanto en salud humana como en veterinaria. El buen manejo de los antibióticos es vital para el mantenimiento de una industria camaronera sostenible. Por lo tanto, la administración de estos fármacos debe ser cuidadosamente estudiada, a fin de evitar resistencias no deseadas que compliquen el tratamiento de enfermedades de etiología bacteriana. La utilización de antibióticos como estrategia de manejo rutinario, sin haber determinado el agente causal de los problemas, el tipo de antibiótico adecuado así como la dosis y el modo de administración que brindarán resultados más eficaces, conducirá con seguridad a la selección de bacterias resistentes a estos fármacos (Peeters & Rodríguez, 1999) de aquí la importancia de conocer la forma de acción de estos y aprovechar sus beneficios.

La palabra antibiótico etimológicamente es aquello que produce la destrucción de la vida. Definición errónea que involucra a cualquier agente mecánico, físico o químico capaz de matar. En realidad los antibióticos son componentes de bajo peso molecular, derivados o producidos por microorganismos especialmente *Streptomyces sp.* y hongos, que tienen la capacidad, de matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Algunas drogas quimioterápicas son generalmente bacteriostáticas en pequeñas dosis y bactericidas a dosis mayores, existiendo algunas con pequeñas diferencias entre la primera y la segunda acción Otras son predominantemente bactericidas como la penicilina, o bacteriostáticos como las sulfamidas. Los antibióticos son producto del metabolismo secundario, pero pueden ser sintetizados químicamente. Por su alta utilidad son producidos comercialmente a partir de hongos filamentosos y bacterias del grupo actinomicetos, así la clortetraciclina y la

demetilclortetraciclina se obtienen del *Streptomyces aureofaciens* y la oxitetraciclina del *Streptomyces rimoonus.*

Las condiciones de un antibiótico ideal, establecidas por Goodman y Gilaman, 1955; *fide* Norrell *et al.*,1997 son las que siguen:

1. Un antibiótico debe ser bactericida, más bien que bacteriostático, al ser así su acción curativa será más rápida.

2. Ha de ejercer su acción en presencia de los líquidos del organismo o exudados y no ser destruido por los enzimas tisulares.

3. No ha de perturbar las defensas del organismo y en las concentraciones necesarias para afectar al agente infeccioso, no debe dañar ni lesionar los tejidos del huésped. No ha de producir fenómenos de sensibilidad alérgica.

4. No debe provocar el desarrollo de resistencia de los organismos susceptibles.

5. La absorción, distribución, destino y excreción deben ser tales que sea fácil conseguir niveles rápidamente bactericidas.

6. Debe ser efectivo por todas las vías de administración oral y parenterales.

En pacientes con el sistema inmune intacto muchos tipos de antibióticos son efectivos porque éstos ayudan al sistema a atrapar y eliminar a la bacterias invasoras. En pacientes inmunodeprimidos los antibióticos bacteriostáticos pueden ser inefectivos.

1.2.1. Clasificación de los antibióticos de acuerdo a su actividad

Antibióticos β- lactámicos: Reciben este nombre por contener un sistema de anillo β-lactámicos, un sistema complejo de anillo heterocíclico. Estos actúan por inhibición de la síntesis de peptidoglicanos en las paredes celulares de las bacterias. Son altamente específicos y levemente tóxicos. El primer antibiótico β- lactámico descubierto fue la penicilina G, activo sobre todo contra las bacterias Gram-positivas, debido principalmente a que las bacterias Gram negativas son impermeables al antibiótico.

Antibióticos aminoglucósidos: Los aminoglucósidos son antibióticos que contienen aminoazúcares que se fijan por enlace glucosídico a otros derivados de carbohidratos. Entre ellos están la estreptomicina y sus compuestos relacionados kanamicina, gentamicina y neomicina. Estos antibióticos inhiben el complejo de iniciación de la transcripción y leen de manera errónea el ácido ribonucleico mensajero ARNm. Se utilizan clínicamente en especial contra bacterias Gram-negativas.

Antibióticos macrólidos: Estos antibióticos contienen grandes anillos de lactona , incluyen la olendomicina, la espiramicina y la tilosina. Usándose generalmente en caso de alergia en el hombre a la penicilina u otros antibióticos relacionados a fragmentos de azúcares, el más conocido es la eritromicina - lactámicos.

Tetraciclinas: Son un grupo de amplio uso médico. De amplio espectro al inhibir casi todas las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas además de rickettsias. Se derivan de un sistema anular formado por cuatro anillos. Así la clortetraciclina tiene un átomo de

cloro en posición 7, en tanto que la oxitetraciclina tiene un grupo oxhidrilo (OH) adicional en posición 5 y no tiene cloro.

El espectro antimicrobiano de las diferentes tetraciclinas es casi idéntico. Aunque son ampliamente activos contra cocos Gram positivos *y Escherichia coli.* Los gonococos, pseudomonas, *Brucella sp, V. cholerae, V. vulnificus y Mycobacterium murium* son sensibles. Para combatir clamideas y micoplasmas son fármacos de primera línea. Son bien absorbidos, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas entre l-3 horas después de su administración. La absorción se reduce con el calcio, magnesio, leche, tónicos que contienen hierro. En el hombre se distribuyen ampliamente en los líquidos corporales y son excretados por el riñón. Los intervalos de dosificación son de 8 horas para los de acción corta, de 12 horas para los de acción intermedia, y 12-24 horas para los de acción prolongada.

La resistencia mediada por plásmidos a este antibiótico se produce por la alteración de la penetración de la tetraciclina en la bacteria.

Cloranfenicol: es un antibiótico de amplio espectro producido por el *Streptomyces sp,* pero actualmente se prepara por síntesis. Químicamente, es singular por poseer un grupo aromático nitrobenceno, a dicho grupo se deben probablemente las acciones tóxicas en el hombre, además posee una cadena lateral halifática derivada del propanodiol que posee a su vez un grupo dicloroacetamida, debiéndose las propiedades antimicrobianas a dicha cadena lateral. Como antibiótico de amplio espectro se caracteriza por ser bacteriostático y aún en concentraciones bastante elevadas sólo detiene la multiplicación de las bacterias, pero el número viable de las mismas permanece estacionario y no se produce una disminución sensible como sucede con los antibióticos bactericidas. Se caracteriza por inhibir la síntesis proteica uniéndose reversiblemente a la subunidad 50 S del ribosoma e

Inhibición de la sfntesis de la pared celular de las bacterias: el antibiótico inhibe la formación del mucopéptido por inhibición de los sistemas enzimáticos, al fijarse en la pared celular y cuando se produce la división de la bacteria aparecen defectos en dicha pared, el microorganismo se hace osmóticamente sensible, penetra líquido en su interior, estalla y se lisa. Así, actúa la penicilina.

Lisis de la membrana celular

Inhibición de la síntesis proteica: bloquea los pasos necesarios para dicha sintesis, actuando sobre los ribosomas. De esta forma la vida de la bacteria es afectada. Esta es la acción del cloranfenicol, las tetraciclinas,estreptomicina y eritromicina

Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos.

í.2.4. Resistencia bacteriana a los antibióticos

En las bacterias existen ciertos genes de resistencia quienes por medio de enzimas degradan los antibióticos o los modifican químicamente inactivando las drogas. Alternativamente algunos causan alteraciones a las bacteria o reemplazan moléculas que normalmente son reconocidas por el antibiótico.

Las bacterias pueden adquirir genes de resistencia a través de pocas rutas, algunas por mutaciones genéticas o por toma de genes de resistencia de otras formas bacteriales vecinas.

La resistencia bacteriana a antibióticos puede ser inherente o adquirida, así la resistencia natura1 o inherente a antibióticos puede ser propia de una bacteria, por ejemplo la *Streptomyces sp*. tiene algunos genes responsable para la resistencia a su propio antibiótico, la estreptomicina o como las bacterias Gram - negativas, que poseen fuera de sus membranas una permeabilidad que permite la estabilidad y ser barrera contra los antibióticos o retardan el proceso de reconocimiento (así sucede con la penicilina).

Resistencia adctuirida

La resistencia adquirida, sucede en bacterias que son sensitivas pero cambian su genoma. La resistencia adquirida conlleva dos procesos genéticos en la bacteria: 1.- mutación y, 2.- cambios de genes entre cepas y especies.

Wolfon & Hooper (1989) sostienen que la resistencia cromosómica ocurre como resultado de una espontánea mutación en el gen. En la *E. coli* se han observado genes capaces de mutar a causa de quinolonas, produciendo un decrecimiento en la susceptibilidad a los microbicidas. Este decrecimiento se produce por la alteración exterior de la permeabilidad de la membrana, en el sistema de reconocimiento, y en la producción de enzimas.

Los tipos de resistencias pueden ser:

El tipo A: Cuando la resistencia es gradual por pasos sucesivos. Los pequeños grados de resistencia se deben por mutaciones en genes de baja potencia, cuando sucede en genes de igual potencia pero en sucesivas generaciones se produce una alta resistencia, este tipo se observa en la penicilina, tetraciclina y cloranfenicol.

El tipo B: La resistencia intensa o no, es de forma rápida debido a la mutación de genes de potencia variable. Esto es característico en la estreptomicina.

Elementos Genéticos Transnonibles

Son entidades genéticas discretas que forman parte de cromosomas y de plásmidos, capaces de moverse de un lugar a otro del genoma. Existen varias clases de mecanismos de transposición, pero muchas de ellas suponen la simultánea replicación del elemento, de modo que queda una copia en el sitio original y aparece una copia nueva en la nueva localización.

Los elementos genéticos móviles acarrean una serie de reorganizaciones en el genoma: inversiones de segmentos genéticos, delecciones, cointegraciones entre dos replicones, etc. Hay que resaltar que estos elementos no son replicones, es decir, no poseen la capacidad de replicación autónoma que hay en cromosoma y plásmido, sino que son partes integrantes del genoma de muchas bacterias, confiriendo plasticidad genética sobre la que pueden actuar mecanismos evolutivos. Esto hace que los genomas bacterianos, y sobre todo los plásmidos, sean relativamente dinámicos y maleables a escala evolutiva.
Existe una categoría de transposones llamados transposones conjugativos que presentan la propiedad de promover su diseminarse de una bacteria a otra por conjugación.

Transferencia de información bacteriana mediante nlásmidos

Los Plásmidos son macromoléculas circulares de ácido desoxirribonucleico de doble cadena (ADN) extracromosómicas, con capacidad para reproducirse independientemente del cromosoma bacteriano. Pueden ser transferibles (pasar de una célula a otra por conjugación) y no transferibles. Están presentes en bacterias Gram ▪ positivas y Gram ▪ negativas, existiendo en una misma célula varios tipos de plásmidos. Portan genes de resistencia a antibióticos, a metales pesados, a la luz ultravioleta. Además producen toxinas o enzimas producidos por ciertas bacterias que son letales para otras. Los plásmidos contienen una gran variedad de genes, tales como los que controlan la producción de toxinas que alteran las superficies de las células para evitar el contacto entré ellas, así como genes que ayudan al intercambio de ADN de una célula a otra. Suelen llevar genes de resistencia a los antibióticos y un solo plásmido puede conferir resistencia a múltiples antibióticos.

Actualmente las cepas con resistencias múltiples codificadas por plásmidos son muy abundantes en todo el mundo, lo que complica y a veces desaconseja la quimioterapia.

La principal amenaza al éxito de la quimioterapia está representada por la transmisión genética de plásmidos de resistencia a antibióticos (plásmidos R). En Japón hubo un espectacular aumento de pacientes con disentería bacilar resistentes al tratamiento con varios antibióticos. Las cepas de *Shigella dysenteriae* aisladas de estos pacientes poseían el fenotipo SuR, StrR, CmR, TetR, siendo los genes correspondientes a esas resistencias parte de un gran plásmido. Los plásmidos de este tipo se denominan plásmidos R. Pero aún más: Los mismos pacientes tenían en sus intestinos cepas de *E. coli* (que como sabemos, es un simple comensal que forma parte de nuestra flora endógena) que eran igualmente resistentes a esos antibióticos. Ello sugería que este tipo de plásmidos se podía transferir de unas especies a otras. La explicación estribaba en un fenómeno de intercambio dependiente de contactos célula-célula, llamado conjugación. En resumidas cuentas, se descubrió que existen plásmidos R capaces de diseminarse por conjugación, no sólo entre células de la misma especie, sino entre especies distintas, incluyendo bacterias patógenas.

En función de que los plásmidos sean o no transmisibles a otra por medio de contactos intercelulares, se pueden distinguir: plásmidos conjugativos (autotransmisibles), que se transfieren entre cepas por medio de fenómenos de conjugación. Algunos de estos plásmidos no sólo se transfieren entre cepas de la misma especie, sino que son capaces de hacerlo entre especies y géneros muy diversos, recibiendo el muy apropiado nombre de plásmidos promiscuos o de amplio espectro de hospedadores, permitiendo transferencia horizontal de información genética entre grupos bacterianos filogenéticamente alejados.

Aparte de los plásmidos R conjugativos existen otros no conjugativos, que sin embargo pueden ser transferidos entre distintas bacterias por otros medios: los plásmidos no conjugativos movilizables pueden ser transferidos por otro plásmido conjugativo

compatible residente en la misma célula por transducción (mediante bacteriófagos) o por transformación (ADN desnudo del plásmido puede ser captado por una bacteria sensible receptora).

Ventaias adantativas de los plásmidos R

Se definen como elementos genéticos extracromosómicos con capacidad de replicación autónoma (es decir, constituyen replicones propios). Todos los plásmidos bacterianos estudiados son de ADN de cadena doble. La inmensa mayoría son circulares cerrados covalentemente y superenrollados (aunque en Borrelia y algunos Actinomicetos existen plásmidos lineales). Algunos plásmidos poseen, además, la capacidad de integrarse reversiblemente en el cromosoma bacteriano: en esta situación se replican junto con el cromosoma (bajo el control de éste).

Los plásmidos R han evolucionado en respuesta a presiones selectivas ambientales (antibióticos usados por los humanos o inhibidores presentes en los medios naturales de las bacterias). Son capaces de conferir varias resistencias simultáneamente a las bacterias que los adquieran. Están constituidos por "módulos" móviles (transposones), de modo que tienen flexibilidad para adquirir nuevos módulos a partir de otras especies. No tienen efectos negativos sobre los demás caracteres de la bacteria.

í.2.5. Mecanismos bioquímicos implicados en la resistencia a antibióticos

Los principales mecanismos se pueden agrupar de la siguiente manera:
Disminución de la permeabilidad hacia el antibiótico.
Inactivación enzimática del antibiótico.

Disminución de la Permeabilidad hacia el antibiótico

Modificación de una barrera preexistente

Como ya sabemos, la membrana externa de las Gram-negativas supone una barrera natural que hace que muchas bacterias de este grupo sean insensibles a varios antibióticos (Ej.: la vancomicina y la bacitracina no pueden atravesar las porinas).

No todas las bacterias Gram-negativas son igualmente impermeables a los mismos antibióticos. Entre las menos impermeables están Haemophilus y Neisseria, que dejan pasar a numerosos B-lactámicos. Las 'Enterobacterias suelen ser intermedias. Las bacterias del género Pseudomonas son insensibles a la mayoría de antibióticos ß-lactámicos, porque no pueden pasar a través de la membrana externa. Se han aislado mutantes que se han vuelto resistentes a los B-lactámicos de última generación: el cambio ha afectado a una determinada porina que ahora no deja pasar a estos nuevos antibióticos.

En otros casos, la resistencia se debe a alteraciones en la cápsula: algunos neumococos resistentes a estreptomicina y eritromicina dependen de este tipo de mecanismo. Igualmente se conocen resistencias a sulfamidas dependientes de un mecanismo específico de impermeabilidad.

Mecanismo de extrusión activa del antibiótico

Como se sabe, el efecto inhibidor de las tetraciclinas depende de la acumulación activa de este antibiótico por parte de las bacterias. Pues bien, ciertos plásmidos R poseen transposones que codifican un sistema para "bombear" tetraciclina desde el interior bacteriano hacia el exterior, en contra del gradiente de concentración.

Alteración del mecanismo de transporte del antibiótico

Cuando el antibiótico accede al interior bacteriano por algún mecanismo de transporte específico, una mutación que afecte a dicho sistema de transporte supondrá una mayor resistencia al antibiótico Ej.: en *E. coli* la cicloserina entra aprovechando el sistema de transporte de la valina. Determinados mutantes incapaces de transportar estos aminoácidos son resistentes a la cicloserina.

Inactivación Enzimática del Antibiótico

Este tipo de mecanismo depende en muchos casos de plásmidos R. Los ejemplos típicos son las resistencias a B-lactámicos, la resistencia al cloranfenicol y las resistencias a aminoglucósidos.

Resistencia a B-lactámicos por acción de B-lactamasas

Ciertas bacterias producen penicilinasa (B-lactamasa), capaz de abrir el anillo B-lactámico de la penicilina dando origen al ácido peniciloico, que carece de actividad antibacteriana. Lo mismo ocurre con las cefalosporinas, donde la B-lactamasa (cefalosporinasa) genera un producto inestable inactivo que se descompone rápidamente. Sin embargo, la naturaleza de la cadena lateral (grupo acilo, R) influye notablemente en la susceptibilidad de rotura del anillo ß-lactámico por las lactamasas. La base de la resistencia en muchos casos es la siguiente: cuando se expone la bacteria al B-lactámico durante mucho tiempo, pueden seleccionarse determinadas mutaciones en genes cromosómicos que codifican por la β - lactamasa, de modo que adquieren un fuerte promotor que permite su expresión a alto nivel. Este tipo de B-lactamasa es excretada al medio, donde inactiva al antibiótico.

Resistencia al cloranfenicol

La resistencia al cloranfenicol suele deberse a un enzima inactivante de dicho antibiótico, denominado cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT), que normalmente está codificado por genes plasmídicos. Uno de los genes de CAT de Gram-negativas más estudiados forma parte del transposón Tn9.

El CAT convierte el cloranfenicol en su derivado 3-acetoxi, usando el acetil-CoA; a continuación una reacción química (no catalizada por enzima) y una segunda acetilación catalizada enzimáticamente, generan el producto final 1,3-diacetoxi-cloranfenicol. Los derivados mono o diacetilados del cloranfenicol son inactivos como antibióticos.

Resistencia a ciertos aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son un grupo amplio y abundante de antibióticos, por lo que no es sorprendente que las bacterias hayan evolucionado distintos mecanismos para inactivarlos. Estos mecanismos pueden agruparse en tres tipos: fosforilación, adenilación y acetilación. Las fosforilaciones y adenilaciones se dan sobre grupos -OH susceptibles, mientras que las acetilaciones recaen sobre determinados grupos (-NH2).
La modificación enzimática de los aminoglucósidos ocurre en el espacio periplásmico o en la membrana citoplásmica, donde el antibiótico modificado covalentemente ya no puede usar el mecanismo de transporte facilitado a través de la membrana; por lo tanto, accede en menor cantidad al citoplasma; el compuesto modificado ya no puede afectar al ribosoma, por lo que no ejecuta acción inhibitoria sobre el crecimiento de la bacteria.

ESPOL CIB ESPOL

Resistencia a la eritromicina

Ciertos plásmidos de cepas de ***Staphylococcus aureus y*** de ***Streptococcus sp.*** codifican una metilasa de ARN inducida por la presencia de eritromicina: este enzima modifica por metilación un determinado nucleótido del ARNr, de la subunidad grande del ribosoma 23S. Concretamente introduce dos metilos en el N de una determinada adenina, usando S-adenosilmetionina (SAM) como donador. Esto produce un cambio conformacional en el ribosoma que disminuye su afinidad hacia la eritromicina y hacia la lincomicina (resistencia cruzada a los dos antibióticos).

El mecanismo genético subyacente al carácter inducible de la metilasa es muy interesante; en lugar de un mecanismo a nivel transcripcional, como es habitual en las bacterias, se trata de un mecanismo de regulación traduccional: en las bacterias en ausencia de eritromicina el ARNm del enzima posee una estructura secundaria que evita su traducción por los ribosomas, pero en presencia de eritromicina este ARNm cambia de conformación y puede ser leído, produciéndose la metilasa que inactivará la diana del antibiótico.

1.3. SISTEMA INMUNITARIO DEL CAMARÓN Y SUS MECANISMOS DE DEFENSA

ESPOL CIB · ESPOL

Los artrópodos y especialmente los crustáceos no poseen un sistema inmunitario adaptativo basado en la especificidad y en la memoria, pero son capaces de reaccionar contra los patógenos invasores a través de sus mecanismos inmunitarios, celulares y humorales (Soderhall & Cerenius, 1992), los que mantienen la integridad del organismo. Este sistema de protección no reconoce la complementariedad antígeno-anticuerpo característica de los vertebrados, pero es capaz de destruir invasores de tipo microbial y agentes parasíticos (Christensen & Nappy, 1988).

En los artrópodos la respuesta inmune se presenta en dos fases, una fase inmediata no inducible, generalmente asociada a los efectores celulares (hemocitos), quienes son responsables, junto a otros fagocitos inmóviles, del proceso de fagocitosis y protagonizan los eventos de nodulación y encapsulación de invasores, ellos catalizan el proceso de coagulación y almacenan en su citoplasma los enzimas de la cascada profenoloxidasa (proPO), responsable de la melanización que acompaña la respuesta inflamatoria en todos los artrópodos. La segunda fase de la respuesta inmunitaria se caracteriza por la síntesis de varios efectores humorales, proteínas y péptidos con fuertes propiedades microbicidas, contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos. El éxito evolutivo alcanzado por los artrópodos es el mejor ejemplo para ilustrar le eficacia del sistema inmunitario de estos invertebrados.

1.3.1. Mecanismos de defensa a mediación celular: Hemocitos

Fagocitosis

En el proceso fagocitario al fijarse las partículas extrañas a la membrana del fagocito (hemocito), se da inicio a la etapa de ingestión, donde la membrana plasmática del fagocito es traccionada al punto de rodear la partícula en una vacuola, minúsculos componentes celulares los lisosomas se fusionan con el fagosoma formándose el fagolisosoma dando inicio a la destrucción de la partícula extraña por medio de varios productos microbicidas encerrados en los lisosomas.

El choque respiratorio es un proceso propio de las células fagocitarias maduras. La fijación de una partícula en la superficie celular cambia en pocos segundos la condición de la célula incrementando la actividad metabólica celular. Esta transición está asociada con una serie de cambios característicos, de los cuales el más importante es el incremento en el consumo de oxígeno y la generación de ROI_s (reactivos intermediarios de oxigeno). La producción de durante el choque respiratorio en la fagocitosis, puede ser medida por

técnicas como la reducción del nitroblue tetrazolium (NBT), evaluándose de esta manera la capacidad inmune de las células. En el camarón ***Penaeus japonicus*** se ha utilizado eficazmente la técnica de la quimioluminiscencia para estimar el choque respiratorio (Bachère ***et*** al., 1995). En el ***P. vannamei*** (Muñoz, ***com per)*** ha utilizado la técnica de reducción del NBT, para cuantificar la producción de anión superóxido. Estos productos microbicidas son producto del aumento de la actividad de hexosas monofosfato que genera NADPH, el mismo que es utilizado para reducir el oxígeno molecular, convirtiéndose este en anión superóxido (0,), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo (OH), y oxígeno molecular libre. Además al reducirse los iones de hidrógeno y aumentar el pH, algunas moléculas lesionan la membrana bacteriana, sea por la producción de proteinasas (catepsina G), o por aumento de la permeabilidad de la membrana del invasor a proteínas de alto peso molecular y de defensinas. Otros factores como el pH, lisozima, lactoferrina, que no dependen del oxígeno en unión a los radicales de oxígeno matan al microorganismo extraño, quien después de muerto, es expulsado.

Hemocitos del camarón tigre ***Penaeus monodon***, tuvieron similares producciones de radicales de oxígeno y sustancias microbicidas, pero en niveles más bajos a los observados en los monocitos y neutrófilos de humanos, debido probablemente a la diferencia en la estructura y número de receptores sobre las membrana de los hemocitos del camarón, de peces y de humanos (Song & Hsieh, 1993).

Encansulación

Este proceso al igual que la formación de nódulos, es producido como respuesta innata del sistema inmunitario. Al no ser posible la fagocitosis de partículas extrañas macroscópicas, la encapsulación de estas partículas por medio de los hemocitos, ayuda a matarlos por reducción del movimiento y crecimiento de los invasores al ser rodeados.

En teoría la muerte por encapsulación de los organismos es producto de la asfixia, y la acción química de quinonas precursores de (melanina). El enzima clave en la síntesis del

pigmento melanina es el fenoloxidasa (PO), la cual está presente en la sangre de los artrópodos (hemolinfa) como un proenzima inactivo, el profenoloxidasa (proPO). Este proenzima es activado por componentes de la pared celular microbial como los ß-1,3-glucanos de hongos, los LPS de bacterias Gram negativas o los peptidoglicanos de bacterias Gram positivas (Johansson & Soderhall, 1989).

ESPOL CIB · ESPOL

Formación de Nódulos

La formación de nódulos es un mecanismo intermedio entre la fagocitosis y la encapsulación. Estos son observables como masas de bacterias melanizadas formadas en el hemocele producto de aglutininas. Estos nódulos son pequeñas cápsulas que ayudan el proceso de limpieza de las bacterias,

Coagulación

ESPOL CIB · ESPOL

Siendo la cutícula una barrera estructural y química, el sistema interno de defensa del camarón debe evitar el ingreso de los microorganismos a la cavidad del cuerpo a través de las heridas o durante la muda, mediante el rápido sellado de las heridas. Este proceso depende de la coagulación del plasma, proceso que implica la reticulación de una proteína plasmática (Söderhäll & Cerenius, 1992). Existen en los crustáceos tres tipos de procesos de coagulación: agregación de hemocitos (tipo A), completa gelación del plasma (tipo C) y un intermediario entre estos dos tipos (tipo B).

En la agregación de hemocitos la hemolinfa se mantiene fluida y sólo los factores celulares se aglutinan sin coagulación del plasma, mientras que el tipo B relaciona la agregación celular con una limitada coagulación del plasma y en el tipo C la lisis de los corpúsculos explosivos causa coagulación del plasma con poca agregación celular (Martin, 1991; *fide* Cedeño, 1998). La gelación del plasma es producida por la polimerización y reticulación del factor de coagulación, proceso que depende de la acción de un enzima celular, que actúa como transglutaminasa, la misma que es activada por cambios hemostáticos (Bruner-

Lorand et ***al,*** 1996; *fide* Muñoz, 1996) requiriéndose para esto de la presencia de iones de calcio (Ca++) (Durliat y Vrankx, 1976; Kopacek ***et al,*** 1993; *fide* Muñoz, 1996).

1.3.2. Mecanismos de defensa humoral

La actividad antibacteriana en la hemolinfa de los crustáceos ha sido estudiada en especies económicamente importantes como; camarones (Adams, 1991, *fide* in Chisholm & Smith, 1995), la jaiba azul *Callinectes* ***sapidus*** (McCumbre & Clem, 1977, *fide* in Chisholm & Smith, 1992), los cangrejos de ***río*** *Pacifastacus leniusculus* (Nyhlén & Unestam, 1980, *fide* Chisholm & Smith, 1992), *Panulirus* ***argus,*** *Panulirus* ***interruptus,*** ***Homarus americanus y*** el cangrejo de playa ***Carcinus maenas*** (Chisholm & Smith, 1992).

Destoumieux et ***al.,*** (1997) encontró una nueva familia de péptidos antimicrobiales aislados de ***P. vannamei.*** Estos péptidos(penaedinas) tienen actividad antimicrobial a hongos, bacteria sobre todo en bacteria Gram positivas.

En ***Penaeus*** *stylirostris* Le Moullac ***et al.,*** (1997) observa la actividad fenoloxidasa y la relación con los ciclos de muda como medio de protección a vibriosis, encontrando que el estadio de muda está directamente relacionado con el tipo hemocitario y la actividad fenoloxidasa, así una baja en la actividad fenoloxidasa en pre - muda significa una probable inmunodeficiencia durante este estadio. La resistencia a vibriosis la correlacionó con la actividad fenoloxidasa pero no con el conteo total de hemocitos durante el ciclo de muda, ya que un alto conteo de hemocitos no fue capaz de proteger a la acción de Vibrio AM23. Siendo el cambio de estadio de muda en camarones un medio facilitario a las infecciones por vibrios.

1.4. PATOGENICIDAD BACTERIANA Y SUS MECANISMOS

El término *patogenicidad* es definido como la habilidad de las bacterias para causar una enfermedad. La patogenicidad bacteriana está directamente vinculada con las características estructurales y mecanismos bioquímicos de los microorganismos. Estos mecanismos pueden ser: presencia de cápsulas, lipopolisacáridos u otros componentes de la pared celular; capacidad de adherencia, secreción de sustancias extracelulares e intracelulares (toxinas) que permiten dañar a los tejidos del huésped. Entendiéndose como huésped a todo organismo que sirve de hábitat a otro.

Los mecanismos de patogenicidad o factores de virulencia pueden ser clasificados por la capacidad de: 1.- Permitir la colonización e invasión de los tejidos del huésped y 2.- Dañar los tejidos y enfermar al huésped. En la tabla 4, se describen los principales factores de virulencia que promueven la colonización y sobrevivencia de las bacterias infecciosas,

Tabla 4. Factores de virulencia que promueven la colonización y supervivencia de las bacterias.

Factores de virulencia	Función
Pili	Adherencia a la superficie de las mucosas
Adhesinas no fibrilares	Unión firme a las células del huésped
Motilidad y quimiotaxis	Ayuda en la fijación de la superficie de las mucosas en áreas de fluido rápido
Sideroforas	Permiten la adquisición de hierro
Cápsulas (polisacáridos)	Eluden la fagocitosis, reduciendo la activación del complemento.
Proteínas tóxicas	Protegen de la muerte por fagocitosis, reducen la intensidad del choque oxidativo.
Variabilidad en la superficie del antígeno	Permiten evadir la respuesta de anticuerpos.

En el desarrollo de una enfermedad intervienen tres factores: huésped, agente infeccioso y ambiente, cuando uno de los tres tiene un comportamiento inesperado, todo el sistema se desequilibra y en ese momento surge la enfermedad (Néder,1989; *fide* San Miguel, 1996).

Al ingresar un patógeno capaz de causar daño en un huésped se inicia el proceso de infección, el cual comprende las etapas de colonización, multiplicación, y persistencia. En ocasiones el huésped tolera la etapa de colonización por un patógeno restringiéndolo a regiones donde no cause daño, pero si este patógeno llega a progresar del punto de infección original y evade las defensas, puede producir daños significativos sobre el organismo propiciando una enfermedad (Salyers & Whitt, 1994).

La colonización es la habilidad de una bacteria para invadir el tejido del huésped. La colonización es el primer estado de infección. En los humanos estos lugares corresponden a las mucosas del tejido urogenital, tejido digestivo, tejido respiratorio y el conjuntivo.

La colonización implica los mecanismos de adherencia, multiplicación inicial, habilidad para evadir el sistema de defensa, la producción de sustancias extracelulares que facilitan el proceso de invasión, causando daños y efectos tóxicos. El grado de interacción entre un huésped y un parásito siempre depende de propiedades específicas inherentes a ambos.

Adherencia

La colonización de una bacteria a las superficies del huésped está relacionada directamente con el proceso de adherencia. La adherencia es importante en áreas como la boca, intestino, y otras superficies lavadas por fluidos, donde sólo la bacteria que puede adherirse es capaz de establecerse. Por otra parte la adherencia está vinculada con la especificidad de algunas bacterias a cierto tipo de tejidos, por ejemplo el *Streptococcus*

mutans es abundante en la placa dental pero no sobre la superficie epitelial de la lengua, mientras que el ***Streptococcus salivarius*** se encuentra en grandes cantidades en las células epiteliales de la lengua siendo ausente en la placa dental. Otras bacterias son específicas de ciertas especies, infectando sólo a determinados organismos o etapas de desarrollo de estos; e.j: ***Neisseria gonorrhoeae*** infecta sólo a los humanos, el *Echerichia coli* ***K-88*** infecta sólo a los cerdos, el *E. coli* CFA 1 y *E. coli* CFA II a humanos, y el *E. coli* ***K-99 al*** ganado (Todar, 1997).

Mecanismos de adherencia:

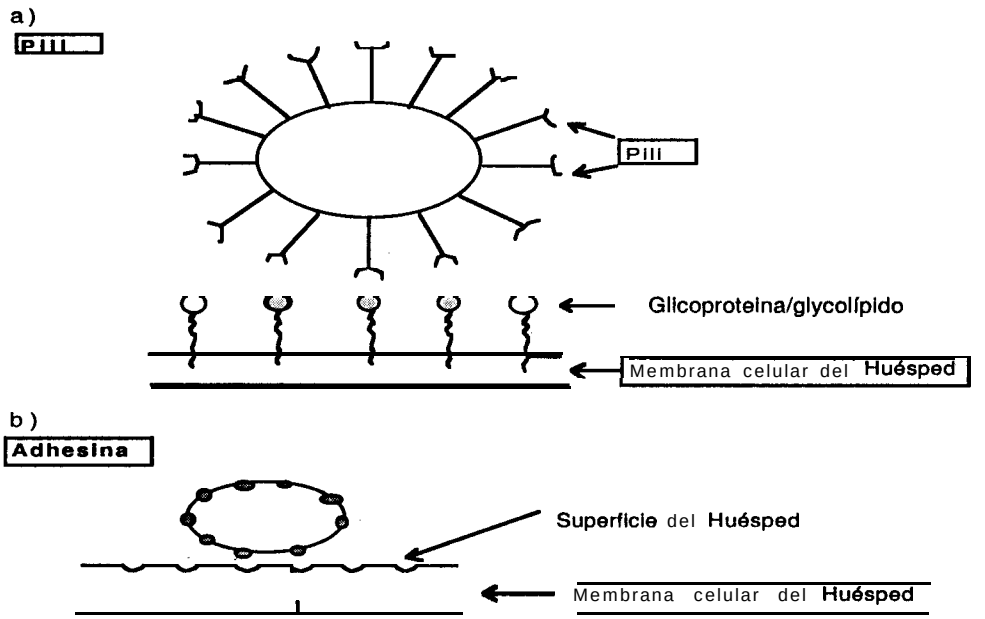


Figura 1. Mecanismos de adherencia bacteriales. (Después de Salyers & Whitt, 1994) a.- Reconocimiento de la superficie de la bacteria por su mecanismo Pili a las moléculas superficiales del huésped usualmente carbohidratos. b.- Adhesinas, proteínas superficiales de la bacteria.

ESPOL CIB ESPOL

- Pili

Las bacterias patógenas tienen varias vías para adherirse firmemente a las paredes del huésped como el pili y las adhesinas (Figura 1). El mecanismo de adherencia ***pili,*** es una estructura proteica a manera de varilla larga y flexible que se extiende fuera de la superficie bacteria1 estableciendo contacto entre la bacteria y las células del huésped. El pili puede estar colocado sobre o en una parte preferencial de la superficie de la bacteria, son más cortos y rectos que los flagelos. El pili es constantemente producido por la bacteria durante su crecimiento por perderse o romperse debido a su fragilidad. La bacteria *E. coli* es capaz de expresar diversos tipos de pili, esta diversidad genética le permite adaptarse a cambios ambientales y explotar las oportunidades que presenten las diferentes superficies del huésped.

ESPOL CIB ESPOL

Adhesinas

En las bacterias Gram positivas se cree que las ***adhesinas,*** al igual que el pili en la bacterias Gram negativas, cumple el papel de acercamiento entre la bacteria y la superficie celular del huésped. Así el ***Estreptococos*** *pyogenes* tiene una adhesina no fibrilar (proteína F) que se fija a la proteína fibronectina de las células del huésped permitiendo la adherencia, (Figura 1)

Motilidad

La motilidad es un mecanismo que permite a las bacterias colonizar superficies bañadas por fluidos (mucosas) con movimientos rápidos y constantes. Las bacterias mótiles pueden presentar sistemas que les permiten detectar y encontrar con mayor rapidez sitios

ricos en aminoácidos y azúcares. Se ha observado reducción de la virulencia en mutantes de *V. cholerae* que han perdido este mecanismo.

Adquisición de Hierro

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de las bacterias. En el cuerpo humano las bacterias tienen algunos mecanismos para adquirirlo, como el uso de *sideroforos*. Los siderofores son moléculas de bajo peso molecular que quelan el hierro con alta afinidad. Otra forma de sustraer hierro por parte de las bacterias, es mediante la producción de exotoxinas cuando los niveles de este mineral son muy bajos. Las exotoxinas matan a las células huésped, y permiten que la bacteria obtenga de estas el hierro necesario para crecer. La adquisición de hierro basada en este mecanismo contribuye a la virulencia de algunas bacterias patógenas capacitándolas a tomar formas particuladas de hierro como lactoferrin y transferrin.
(Wright 1981 *fide* Litwin et *al* 1996), correlacionó la virulencia del *Vibrio vulnificus* con la disponibilidad de hierro en ratones, observando reducción de la dosis letal (LD_{50}) en un 50% al inyectarles este elemento. Además encontró cepas no virulentas incapaces de producir siderofore o utilizar el hierro en forma de transferrina. Estos resultados surgieren que el siderofore capacita a aislados virulentos a adquirir este elemento.

'Toxicidad Bacteriana

Bacterias como ***Pseudomona sp., Neisseria sp. y Vibrios sp.*** pueden poseer ciertas proteinas fibrilares que contienen N-metilfenilalanina, encontrándose este compuesto en bacterias virulentas productoras de proteínas tóxicas de la actividad adenyl cyclasa. Así, el componente de la toxina anthrax, el Factor Edema (FE) es una adenyl cyclasa que actúa sobre la células, incrementa los niveles de monofosfato de adenosin (AMP) intracelular y

destruye la permeabilidad de las mismas (Todar, 1997). Otra bacteria como *Clostridium perfringens*, produce las toxinas fosfolipasas (toxina) que hidrolizan los fosfolipidos destruyendo las membranas celulares. Toxinas del *Vibrio cholera* activan el enzima en la células de la membrana intestinal, incrementando los niveles intracelulares AMPc (monofosfato de adenosin cíclico), y la secreción de agua, Na^+, K^+, Cl^-,y HCO_3^-en el lumen del intestino delgado (Levinson & Jawetz, 1998).

ESPOL CIB · ESPOL

Exotoxina

Las exotoxinas son proteínas bacterianas que pueden actuar en lugares remotos (sectores distantes del crecimiento bacterial). Se diferencian de las endotoxinas lipopolisacáridos (LPS) por ser estos últimos, constituyentes de la membrana de las bacterias Gram negativas. Las exotoxinas son secretadas por las bacterias Gram positivas o Gram negativas durante la fase exponencial. Constan de dos subunidades que permiten: 1.- fijación a la membrana plasmática y entrada a la célula, 2.- actividad tóxica. La producción de proteínas tóxicas es generalmente específica de una especie particular ej: *Clostridium tetani* produce la toxina tetanus, *V. cholerae* la toxina cholerae, y el *Corynebacterium diphtheriae* la toxina diphteria.

ESPOL CIB · ESPOL

Las bacterias heterotróficas producen una amplia variedad de enzimas extracelulares como proteasas, lipasas, nucleasas, etc., que ayudan al metabolismo y nutrición bacterial. Estos enzimas actúan sobre la membrana celular animal realizando la inserción o formación de un poro que resulta en la lisis celular o destruyendo los fosfolípidos que estabilizan la membrana.

Existen ciertas bacterias que tienen toxinas que no son normalmente secretadas, pero que están localizada en el citoplasma o en el periplasma de las bacterias y son liberadas durante la lisis bacterial.

Endotoxinas

Las bacterias Gram negativas contienen en la pared una capa externa constituida por (LPS) también llamados endotoxinas. Esta capa es una segunda capa lipídica, que además de fosfolípidos contiene polisacáridos y proteínas. El lípido y el polisacárido están unidos formando estructuras de ***LPS.*** Una propiedad biológica importante de la capa externa de las bacterias Gram negativas, es su toxicidad para los animales, así son tóxicos para el hombre y otros mamíferos los LPS de los géneros de Salmonella, Shigella, y Escherichia. Los LPS son menos potentes y específicos en su acción que las exotoxinas, no se degradan al calor, pero pierden o reducen su actividad oxidante. Siendo componentes de la membrana celular de las bacterias Gram negativas, tienen una diversidad estructural y adherencia específica y probablemente cumplen la función de servir a la bacteria como una estructura superficial o macromolécula de conexión. En la Tabla 5 se enumeran las diferencias de las toxinas.

Tabla 5. Características de las endotoxinas y exotoxinas clásicas de las bacterias. (Tomado de Levinson & Jawetz, 1998)

Propiedad	**Endotoxina**	**Exotoxina**
Naturaleza química	Lipopolisacárido mW=10kDa	Polipéptido. mw=50-1000kDa
Origen celular	Pared celular de las bacterias Gram negativas	Bacterias Gram negativas y Gram positivas
Degradación al calor	No	Usualmente
Antigénica	Si	Si
Potencia	Relativamente baja (>100µg)	Relativamente alta (1µg)
Especificidad	Bajo grado	Alto grado
Actividad Enzimática	No	Usualmente
Piiogenicidad	Si	Ocasionalmente
Secretada por células	No	Si
Ubicación de genes	Cromosoma bacteriano	Plásmido o bacteriófago

Los LPS juegan un papel muy importante en el desarrollo y crecimiento de la bacteria, sobre todo en la interrelación huésped/patógeno, porque éstos son la barrera permeable y selectiva, que impide la destrucción de la bacteria sea por los componentes del suero o por la acción de las células fagocitarias. En la figura 2 se puede observar las tres unidades que componen la estructura de los LPS:

La parte compuesta por un fosfolípido (A), que es tóxico.

Una parte central formada por polisacáridos de cinco azúcares unido a la parte A.

Una parte externa constituida por 25 unidades repetidas de tres y cinco carbonos. Este polímero es el antígeno 0 que sirve para el reconocimiento de algunas bacterias (Levinson & Jawetz, 1998)

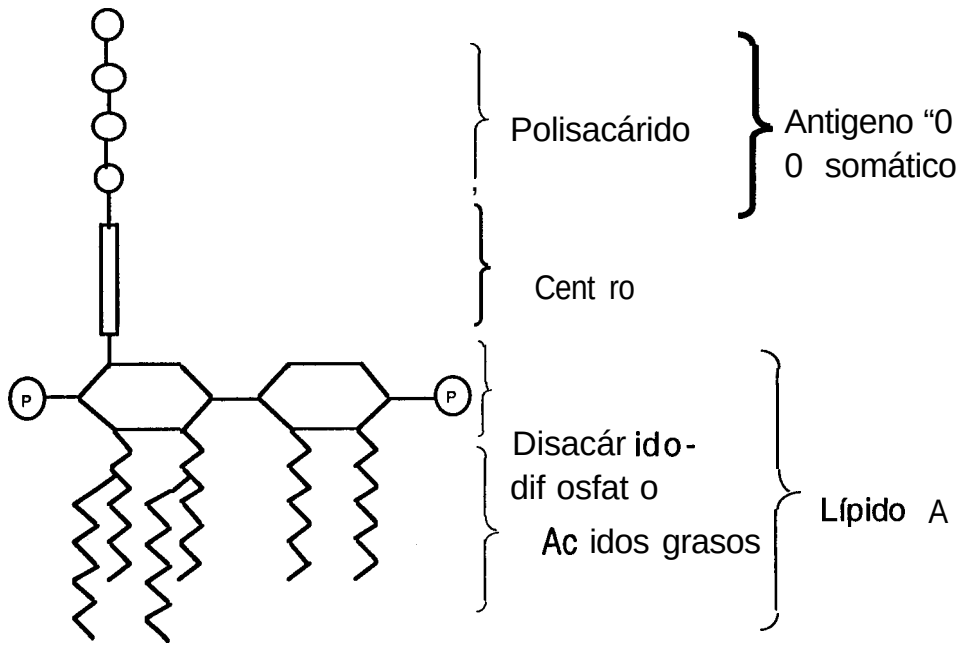


Figura 2 Estructura de Endotoxina. El antígeno polisacárido 0 está expuesto en el exterior de la célula en tanto que el lípido está en el interior. (Tomado de Levinson & Jawetz, 1998).

Cápsulas

Una cápsula es una estructura de polímeros que cubren la superficie de una bacteria, siendo los polisacáridos los principales o mayores constituyentes, pero las cápsulas también están compuestas de proteínas o mezclas de carbohidrato-proteina. El rol de las cápsulas dentro de la virulencia bacteria1 es proteger la bacteria de la respuesta inflamatoria del huésped (muerte por fagocitosis). Esta cápsula gelatinosa permite determinar el tipo serológico dentro de una especie, ej: hay 84 tipos serológicos diferentes de ***Streptococcus pneumoniae***, siendo reconocibles estos, sólo por sus azúcares.

La importancia de la cápsula está determinada por tres aspectos:

Limita la capacidad de la fagocitosis del huésped aumentando la capacidad patogénica de la bacteria.

Permite identificar específicamente a microorganismos.

Es posible que intervenga en la adherencia de bacterias, paso importante para causar infección.

Formas virulentas de bacterias escapan a la fagocitosis, ya que la síntesis de una cápsula externa protege contra la adhesión de las células fagocitarias, así un ratón puede morir con 10 neumococos encapsulados, pero sin este mecanismo se necesitan 10.000 bacterias para causar la muerte.

Invasión de superficies

La invasión de un huésped por un patógeno puede darse por la producción de sustancias bacterianas extracelulares que eliminen las defensas primarias y secundarias del cuerpo, entre esas sustancias se encuentran las invasinas. Las invasinas son enzimas que dañan las defensas del huésped ayudando a un inmediato crecimiento y generalización del patógeno como parte de la patología de una enfermedad infecciosa.

La invasión de las células por bacterias depende de la relación de las invasinas y de receptores celulares específicos. El movimiento de las bacterias al interior de las células es una función de microfilamentos de actina. Una vez dentro de las células pueden permanecer ahí o desplazarse a las células subyacentes a través de túneles formados de actina este proceso de invasión permite evadir las defensas del huésped.

1 .5. INFECCIONES EXPERIMENTALES REALIZADAS EN PENEIDOS

í.5.1. Interacción huésped-patógeno

La manera en que una bacteria patógena es responsable de una enfermedad particular está explicada en los postulados de Koch: (1800 *fide* Salyers & Whitt, 1994).

1. La bacteria y sus productos, pueden ser encontrados en toda las personas con la enfermedad, siendo todas las partes del cuerpo afectado por dicha enfermedad.

2. La bacteria puede ser aislada de lesiones de una persona infectada y mantenida en cultivo puro.

3. El cultivo puro inoculado, es susceptible a la voluntad humana o a la experimentación en animales donde se podrán reproducir los síntomas de la enfermedad.

4. La misma bacteria puede ser aislada de cultivo puro o a partir de animales o humanos intencionalmente infectados.

El estudio de las interacciones huésped-patógeno, implica la cuestionabilidad de estos postulados. El primer postulado de Koch sostiene que la cepa virulenta es enteramente

independiente del huésped, reduciendo la importancia de este. El segundo y tercer postulado asume que todos los miembros de cepas de bacterias son igualmente virulentos y que sólo una simple muestra de esta especie puede ser causa de enfermedad, no considerando la variabilidad de virulencia o los efectos sobre un huésped de diferentes cepas de la misma especie, o que una enfermedad puede ser causada por dos o más bacterias (Salyers & Whitt, 1994). Otra implicación no observada en este postulado tiene que ver con la perdida de los factores virulentos de la bacteria en medios de cultivo.

Lightner, (1988) en estudios con vibrios observó que los postulados de Koch con bacterias aisladas de camarones enfermos no han sido cumplidos o si se han cumplido, ha sido mediante la administración de altas dosis de bacterias, dando soporte al argumento además de que las infecciones bacteriales pueden darse por patógenos oportunistas que son parte de la flora normal del animal.

Los intentos por entender y controlar los procesos infecciosos por bacterias en animales acuáticos poiquilotérmicos deben tener en consideración: la distribución de los patógenos, la respuesta inmune del huésped, la flora interna y su susceptibilidad, la producción de toxinas por el patógeno, y el estrés Amborski & Glorioso, (1974). La patogenicidad de las bacterias no sólo dependerá de la bacteria, también influyen la concentración del número de bacterias presentes, el período de exposición animal-bacteria la especie y edad del camarón (Hameed, 1995).

La especificidad del huésped a las bacterias fue demostrado por Prayitno *et al.*,(1995) al encontrar que el V. *harvey*i BP04 causó mortalidades significativas en larvas de *P. monodon y Penaeus indicus* a bajas concentraciones, pero no provocó mortalidades en nauplios de *Macrobrachium rosenbergi* expuestos a concentraciones superiores de la misma bacteria. Mientras que Roque *et* al., (1998), observando la relación entre la bacteria

y la patogenicidad de ***Vibrio sp*** en ***P. vannamei*** en infecciones experimentales mediante baños, determinaron que el 50 % de mortalidad encontrada puede estar influenciada por diferentes parámetros del agua. Otros autores como Liu P. ***et al.,*** (1996) sugieren que las proteasas, fosfolipasas, hemolisinas o exotoxinas también tienen un rol en la patogenicidad de cepas de *V.* ***haweyi*** en el camarón tigre (*P.monodon*) y posiblemente en el ***P. japonicus.***

1.5.2. Modelos de infecciones experimentales

De la Peña ***et al.***,(1995), por medio de la técnica de inmunofluorescencia observaron en camarones ***P.*** *japonicus* el establecimiento, distribución, eliminación, multiplicación secundaria y una sistemática infección dentro de los tejidos del huésped al administrar ***Vibrio sp.*** por vía oral.

Respuesta inrnunitaria a infecciones bacterianas en camarones

Los resultados de varios autores muestran que las infecciones influyen sobre el comportamiento del sistema de defensa del huésped. Martin ***et al.***,(1993) relacionaron el decremento de hemocitos totales con el ingreso por inyección de bacterias *Bacillus cereus*, ***B. subtilis y Pseudomonas*** *fluorecens* en ***Sicyonia ingentis,*** restableciéndose los pre-niveles al ser estas eliminadas. Sung & Song, (1996) por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta en ***P.*** *monodon* infectados por inmersión determinaron que ***el*** V. *vulnificus* es eliminado 14 días después al ingreso por absorción del sistema circulatorio y digestivo.

A nivel de cuantificación hemocitaria Aono ***et al.,*** (1992) observaron la disminución del número de hemocitos de la langosta de mar *Panulirus* ***japonicus*** al añadirse diferentes

concentraciones de bacterias debido a que el aglutinamiento de las mismas, disminuían drásticamente el número de hemocitos.

Esto sugiere que el factor de coagulación juega un rol importante en la prevención de la difusión de la bacteria en el huésped. Observaciones similares hizo Martin *et al.*,(1993) con la introducción de la bacterias inyectadas en la hemolinfa de camarón, donde fueron eliminadas rápidamente de la misma, situación que se acompañó de un decremento en el conteo de hemocitos totales posterior a la inyección, alcanzando un mínimo a las 24 horas. Los niveles normales de hemocitos retornaron a las 96 horas al reducir el número de bacterias.

Las técnicas para reproducir signos de enfermedad en camarones por bacterias, han variado desde el sujeto de investigación (densidad, etapa de desarrollo); tipos y concentración de bacterias, el tiempo y formas de exposición de los animales a los patógenos y la observación de la enfermedad (técnicas de reconocimientos de la infección y su incidencia en los animales). Todas ellas con el objetivo de asegurar la virulencia de aislados bacterianos y/o analizar el proceso de infección para determinar el tratamiento o prevención de las enfermedades.

Roque *et al.*,(1998) estandarizaron tres técnicas para infecciones experimentales con *Vibrio sp* en *P. vannamei,* estas comprendían: inyección, baño, y vía oral. El sistema experimental de inyección estuvo formado por 16 tanques de vidrio de 15 litros con aireación individual, utilizando tres clases de vibrios, y la recuperación de bacterias fue por medio de agar "Thiosulfate Citrate Bile Salts Agar" (TCBS) y "Tryptic Soy Agar" (TSA). La prueba por baño fue mantenido con un sistema estático en tanques de vidrio con un volumen de 10 litros. Las bacterias aisladas de camarones enfermos fueron introducida por heridas causadas a nivel del tercer segmento abdominal de 2 mm de longitud. La infección oral usó los nauplios de *Artemia franciscana* alimentadas con bacterias. Comparando ventajas, beneficios y posibles usos de las tres técnicas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1, INTERACCION PATOGENO - HUESPED

2.1.1. Protocolo para preparar bacterina

1. Se cultivó toda la noche las bacterias *V.vulnificus* y *V. alginolyticus* en 20 ml de medio liquido Luria Bertani (LB).
2. Se centrifugó a 7000 rpm. durante 10 minutos.
3. El precipitado se resuspendió en solución salina al 2% conteniendo 0,2% de azide de sodio.
4. Se pesó los microtubos y traspasó a ellos la suspensión de bacterias.
5. Se centrifugó a 7000 rpm. durante 10 minutos, se pesó nuevamente los tubos y se calculó el peso del precipitado.
6. Se resuspendió el precipitado en la solución salina, conteniendo en concentración final, Na azide al 0,02% y 1,5 % de formaldehido, a razón del 10% peso total/volumen. Se incubó a temperatura ambiente durante 90 minutos en agitación constante.
7. Se centrifugó a 7000 rpm. durante 10 minutos, eliminando el sobrenadante.
8. Se resuspendió el precipitado en solución salina al 2 % y se congeló a -80 “C.

❖ La preparación es estable por un año.

2.1.2. Protocolo para preparar periplasma

1. Se cultivó toda la noche las bacterias en medio LB
2. Se centrifugó a 4000 rpm. durante 10 minutos a 4ºC.
3. Se resuspendió el precipitado en solución salina al 2%.
4. Se centrifugó a 4000 rpm. durante 10 minutos a 4ºC, eliminando el sobrenadante.
5. Se resuspendió el precipitado en 200 ml de Tris HCL 30 mM, 20% de sucrosa pH 8 (80 ml por gramo de precipitado, se añadió 0,4 ml de EDTA a 0,5M pH 8 y se incubó 5 -10 minutos a temperatura ambiente en movimiento constante.
6. Se centrifugó a 7000 rpm. durante 10 minutos a 4°C.

7. Se resuspendió el precipitado en 200 ml de $MgSO_4$ frío, y se agitó 10 minutos en baño frío, 4°C.
8. Se centrifugó a 7000 rpm. durante 10 minutos a 4°C.
9. Se recuperó el sobrenadante y se añadió 4 ml de PBS, pH 7,2.
10. Se congeló a -80 "C.

2.1.3. Producción de Anión Superóxido (O^-_2)

Se siguió el protocolo de reducción NBT estandarizado por Muñoz ,1996.

1. Se cultivó las bacterias (V. *vulnificus* y V. *alginolyticus*)toda la noche, en LB agar (2 % con NaCl).
2. Se repicó una colonia en 5 ml de medio líquido LB (2 % de NaCl) en agitación constante a temperatura ambiente por 8 horas, volviendo a repicar 100 µl de bacteria por 10 ml de medio nuevo, incubando por dos horas con agitación constante, para mantener las bacterias en crecimiento exponencial.
1. Se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm. eliminándose el sobrenadante,
2. Se midió la concentración de la bacteria usando como blanco el medio de cultivo estéril.
3. Se resuspendió la bacteria en medio Hank's 3X (26mM de Cloruro de Magnesio y 12 mM de Cloruro de calcio). En un volumen adecuado para obtener una concentración final de 20 bacterias / hemocito.
4. Se llenó la caja microelisa con 50µl de un "pool" o mezcla de hemolinfa de diferentes camarones. Con un número de 200 000 hemocitos/hoyo.
5. Se colocó 50 µl de Solución Hank's 3X, y se incubó por 30 minutos.
6. El sobrenadante fue retirado con cuidado antes de añadir nuevamente 50 µl de Solución Hank' 2X (12 mM de Cloruro de magnesio y 6 mM de Cloruro de calcio) a todos las muestras.
7. Se añadió a los pozos de actividad de base 50 µl de solución Hank's 3X. Y se destinó dos pozos para cada estimulante ensayado. Los estimulantes usados fueron:

50 µl de PMA a una concentración 30 mg/ml.

50 µl de las bacterias vivas, diluidas en Hank's 3X, a una concentración de 20 bacterias/ hemocito.

50 µl de las bacterias muertas, diluidas en Hank's 3X, a una concentración de 20 bacterias/ hemocito.

50 µl de laminarina 2 mg/ml de Hank's 3X.

A cada estimulante bacteriano también se añadió periplasmas (dos pozos por tipo de periplasma) a una concentración de 90 bacterias /hemocitos.

8. Se colocó 50 µl de NBT 0,24% en Hank's 1X, y se incubó la placa por 2 horas en la oscuridad.
9. Se lavó y fijo la placa con metano1 al 100% por 2 minutos y dos lavados con metanol al 70%, de 2 minuto cada uno.
10. Se solubilizó con 120 µl de KOH 2M, y 140 µl de Dimetil Sulfóxido (DMSO).
11. Se realizó la lectura en el lector de microplacas Elisa Multiskan BICHROMATIC, a una longitud de onda de 620 nm.

2.1.4. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO)

Se usó el protocolo estandarizado por Echeverría, (1998).

1. La muestra de hemolinfa fue centrifugada a 3000 rpm. durante 12 min., o hasta obtener un precipitado de hemocitos. Los hemocitos se resuspendieron cuidadosamente en Acido cacodílico 10 mM (tampón Cac), utilizando un volumen equivalente al inicial de hemolinfa.
2. Los hemocitos fueron centrifugados a 13 000 rpm. por 1 min. Se recuperó el sobrenadante y se descartó el precipitado conteniendo los restos celulares.
3. Se llenó la placa con 50 µl de muestra correspondiente a una concentración de 200.000 hemocitos/hoyo diluidos en Cac 10 mM.
4. Se colocó dos pozos los estimulantes a ser ensayados: bacterina del V. *vulnificus* y *V. alginolyticus* (20 bacterias/ hemocito), laminarina (2 mg/ml). Además en dos pozos

diferentes de estimulante se añadió periplasma (de cada estimulante) a una concentración de 90 000 bacterias/ml). Los estimulantes con y sin periplasma fueron diluidos en tampón Cac 10 mM conteniendo 20 mM de calcio.

5. Se incubó por 70 min. en oscuridad., luego se añadió 50 µl de L-Dopa (L - 3.4 - Dihydroxyphenyl - Alanine ,3mg/ ml) disuelto en Cac 10 M. Se incubó en oscuridad por 10 minutos más.
6. Se leyó en el lector de microplacas a una longitud de onda de 490 nm.

2.1.5. Actividad Antibacteriana

Según el protocolo estandarizado por Tapia, 1996.

1. Se cultivó las bacterias *V. vulnificus*, *V. alginolyticus y Escherichia coli* en medio líquido LB toda la noche.
2. Se repicó 200µl de la bacteria cultivada en 20 ml de medio líquido LB. fresco en agitación constante y temperatura ambiente por 4 horas.
3. Se llenó la placa microelisa con 10 µl de muestra por pozo.
4. Se colocó las bacteria a una concentración de 40E+06 b/ml para *Escherichia coli y* 0,16E+06 para *V. vulnificus y V. alginolyticus* .
5. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente, y se efectuó la primera lectura.
6. Se leyó 8 horas posteriores a la incubación a 37°C para *E. coli y 30* °C para los otros dos vibrios, en el lector de microplacas a una D.O. 540 nm.

2.2. INFECCIONES

2.2.1. Aumento de la virulencia bacteriana

La cepa utilizada fue el *V. vulnificus*, aislado de larvas enfermas y congelado a -80°C. Esta bacteria fue manipulada con la finalidad de aumentar la virulencia perdida por cultivos sucesivos en medios de cultivo comerciales, enfrentándola al sistema inmune del camarón. Se seleccionó las colonias que mejor pasaron esta prueba. Posteriormente se cultivó la cepa en agar hepatopáncreas (Calero, 1998) y se seleccionó las colonias que mejor crecieron en este medio.

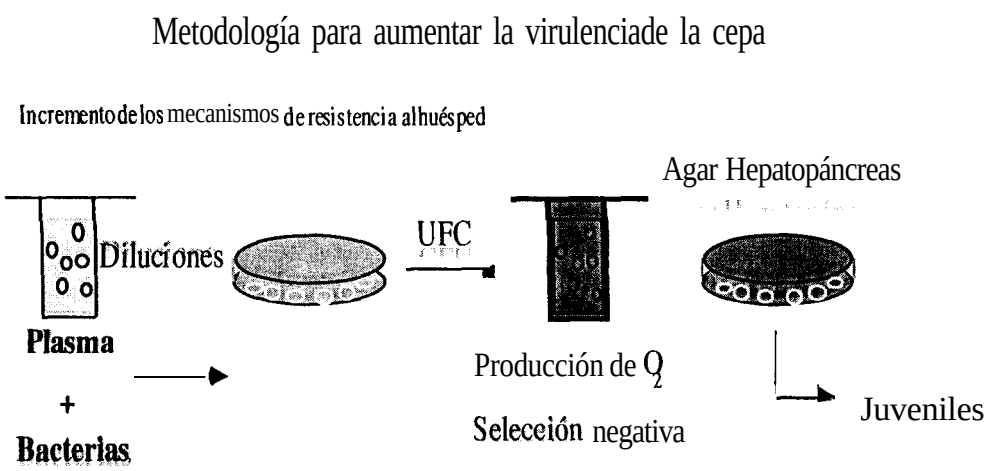


Figura 3. Aumento de la Virulencia en la Cepa S_2

2.2.1.1. Confrontación con el Sistema inmune del camarón

Selección de bacterias capaces de crecer en plasma de camarón.

1. La cepa congelada fue cultivada toda la noche en agar LB (2% de NaCl, 2% de agar agar), y repicada en medio líquido LB (2% de cloruro de sodio) por 2 horas con agitación constante a temperatura ambiente.
2. La densidad óptica fue leída en el espectrofotómetro, en una longitud de onda de 550 nm.
3. La bacteria fue diluida en medio líquido LB (2% de NaCl) a una concentración de 6E+05 bacterias/ml, antes de ser incubada en plasma.
4. Cuatro muestras de plasma de camarón con Citrato de sodio al 10% (v/v) fueron utilizadas como medios de inhibición del crecimiento de la bacteria. Estas muestras se denominaron M1, M2, M3 y M4.

5. Se incubó a 4ºC por 30 minutos, las muestras de plasma (10µl) y bacteria (10 µl).
6. Después de la incubación, se diluyó 10 veces cada muestra en medio líquido LB, y se sembró 20 µl por barrido en agar LB, e incubándolo entre 27 - 28 º C por 24 horas, antes de realizar el conteo de colonias.

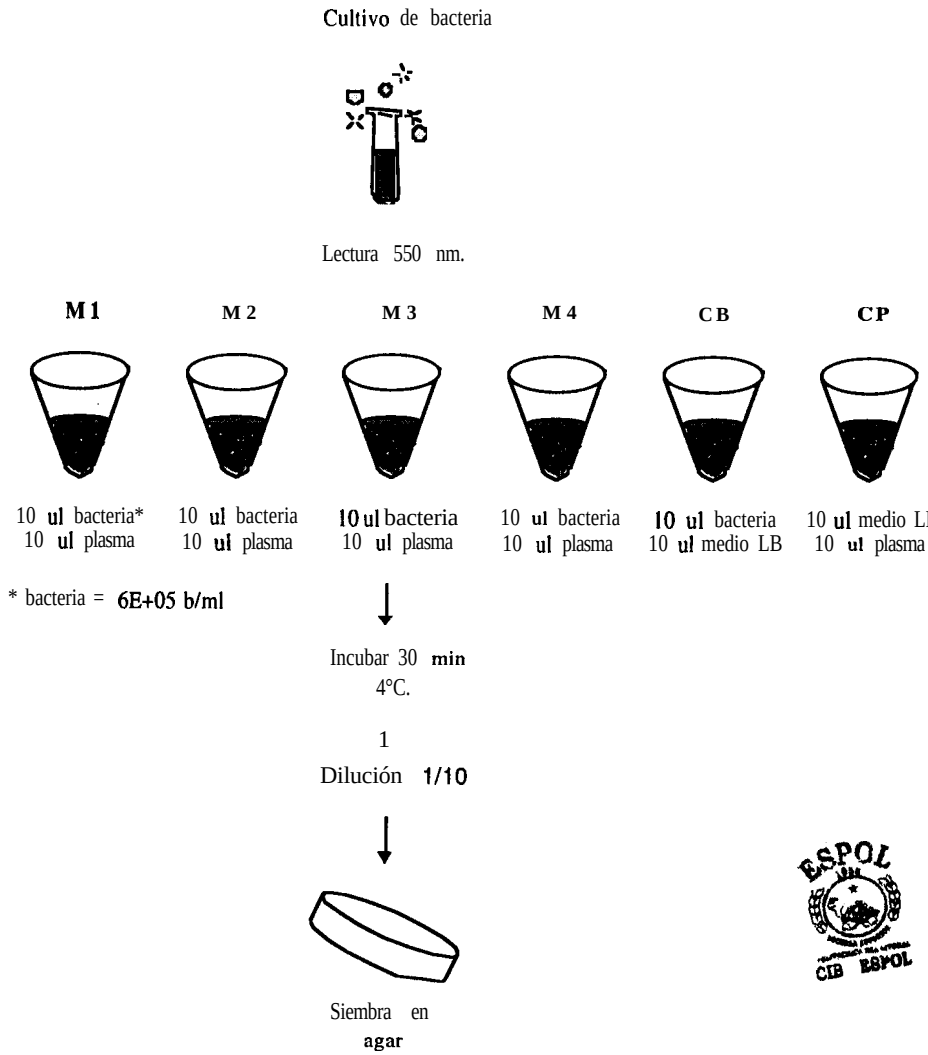


Figura 4. Selección de bacterias por su capacidad de crecimiento en plasma de camarón con elevada actividad antibacteriana.

Se seleccionó las muestras MI, y M4. La primera muestra presentó poca inhibición al crecimiento de la bacteria, mientras la muestra M4 presentó mayor inhibición al crecimiento bacteriano.

Las colonias de bacterias que crecieron en la M4, fueron escogidas como las bacterias que mejor resistieron la actividad antibacteriana del plasma, congelándose estas colonias en LB líquido con glicerol al 15%.

El procedimiento anteriormente descrito fue practicado en repeticiones sucesivas con esta bacteria y la muestra de plasma M4.

Selección de bacterias que inhiben el choque respiratorio.

Para confrontar a las bacterias con el choque respiratorio se utilizó el protocolo de (Muñoz, 1996) para inducir el metabolismo oxidativo de los hemocitos.

1. Se cultivó la bacteria ya sometida a la actividad antibacteriana, toda la noche en LB agar (2 % con NaCl).
2. Se repicó en 5 ml. de medio LB B (2 % de NaCl) en agitación constante a temperatura ambiente, por 4 horas.
3. Se tomó 1 ml de la bacteria cultivada y se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm. Eliminándose el sobrenadante, para resuspender el precipitado en medio Hank's 3X. Se mantuvo en refrigeración (4°C) el cultivo a fin de evitar cambios de densidad óptica.
4. Se midió la concentración de bacteria usando como blanco el Hank's 3X.
5. Se llenó la caja microelisa con 50µl de un "pool" de hemolinfa de camarones igualada volumen/volumen con Citrato de Na al 10%. EL número de hemocitos fue de 500.000 hemocitos/hoyo.
6. Se colocó 50 µl de Solución Hank's 3X, y se incubó por 30 minutos.
7. El sobrenadante fue retirado con cuidado antes de añadir nuevamente 50 µl de Solución Hank's 2X a todos las muestras.

8. Se añadió a los pozos de actividad base 50 µl de solución Hank's 3X. En los pozos estimulados se añadió.

   PMA 50 µl a una concentración de 30 mg/ml

   Bacteria suspendida en 50 µl a una concentración de (15 bacterias/ hemocitos).

1. Posteriormente se colocó 50 µl de NBT 0,24% en Hank's 1X, y se incubó la placa por 2 horas en la oscuridad.
2. Se lavó y fijó la placa con un baño de metano1 al 100% por 2 minutos, y dos baños de metano1 al 70% de 2 minutos cada uno, secando todo el excedente de los mismos.
3. El formazán se solubilizó con 120 µl de KOH 2M, y 140 µl de Dimetil Sulfóxido (DMSO).
4. Se realizó la lectura en el lector de microplacas, a una longitud de onda de 620 nm.

2.2.1.2 Selección por crecimiento en medio selectivo

Con el objetivo de determinar que medio de cultivo era el más recomendable para trabajar la cepa, se utilizaron varios tipos de medios de cultivo como:

Agar marino y agar LB, en dos concentraciones de NaCl (1 y 2%).

Luego de la observación de la actividad fagocitaria de los hemocitos de camarón, y su comportamiento en medios con diferente concentración de cloruro de sodio, la cepa fue sembrada en agar hepatopáncreas (Calero, 1998). Las colonias que crecieron en este medio fueron congeladas para ser usada en las infecciones.

Congelación de la cepa modificada in vitro

La cepa de trabajo fue conservada en tubos de congelación a -80°C, en una solución de glicerol al 15% preparada en medio de cultivo líquido LB (2% de cloruro de sodio). La manipulación de la bacteria fue realizada en la cámara de flujo laminar sin permitir la descongelación de los tubos.

2.2.2. Desinfección de camarones

Camarones

Los animales de la especie *Penaeus vannamei* utilizados en la primera y segunda, desinfección fueron obtenidos de las camaroneras FUENTES y OPUMAR.S.A., ubicadas en la zona de Palmar, provincia del Guayas. El peso de los animales utilizados en la primera y segunda desinfección estuvo comprendido entre 6,04 g y 5,24 g como promedio respectivamente. Antes de ser utilizados en los ensayos estos animales fueron aclimatados por quince días, en tanques de fibra de vidrio ovalados de 2 toneladas métricas (TM) y fondo plano, con flujo continuo de agua y aireación constante. La alimentación diaria correspondió al 5% del peso seco de su biomasa en dos raciones diarias, utilizando balanceado comercial (50% de proteína), el mismo que fue administrado por la mañana y en la noche.

Los animales utilizados en la tercera y cuarta desinfección se obtuvieron de la camaronera CRISMAR ubicada en la zona de Palmar, provincia del Guayas y fueron mantenidos por 15 días antes de su ser utilizados en la tercera desinfección en tanques exteriores de fibra de vidrio ovalados de 2 TM y fondo plano, con flujo continuo de agua y aireación constante. El peso de los animales fue 5,7g como promedio. La alimentación diaria correspondió al 6% de su biomasa, administrada en dos raciones diarias, utilizando balanceado comercial (con 50% de protefna), por la mañana y en la noche.

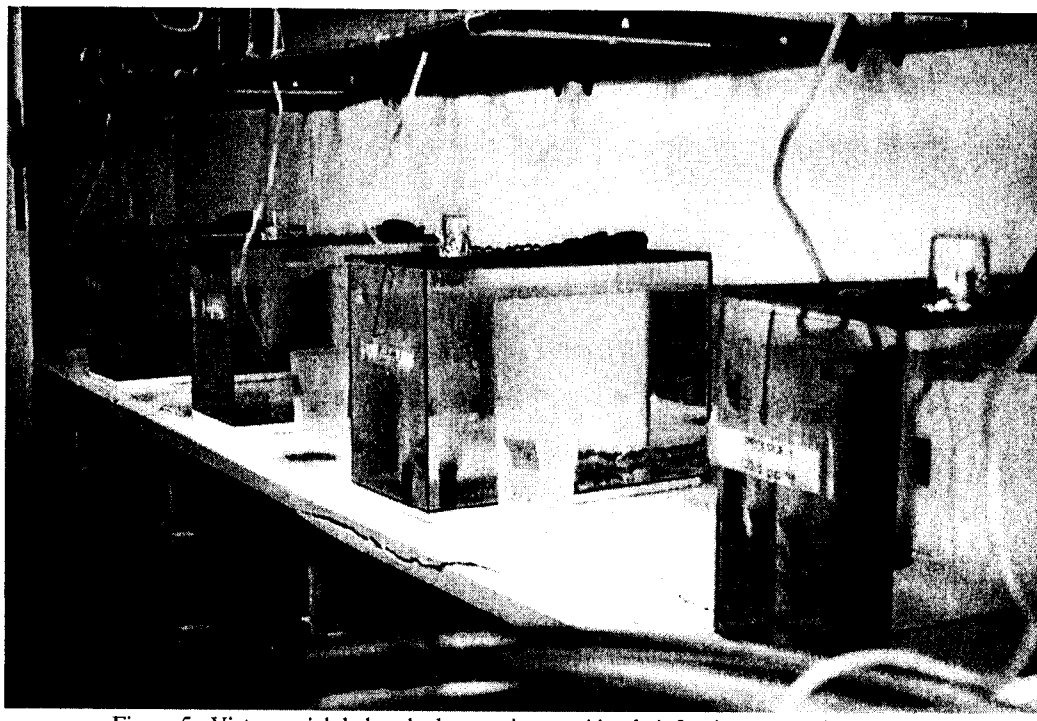


Figura 5. Vista parcial de la sala de experimentación de infecciones experimentales

2.2.2.1 Metodología de desinfección

Primera y Segunda desinfección

Los camarones juveniles al llegar a la sala de experimentación del CENAIM fueron colocados en un tanque cónico de 500 l.

Las peceras de vidrio fueron llenadas hasta 60 litros con agua de mar. El agua utilizada para los experimentos fue filtrada por cartuchos de piola (filtros de 5, 1, 0.5 μ) y esterilizada por tratamiento ultravioleta. Los materiales utilizados como mangueras, difusores, algodón, pipetas, envases etc. fueron lavados con jabón neutro y agua dulce, seguida de su respectiva esterilización en el autoclave por un tiempo mínimo de 15 minutos a 15 PSI y 121 "C. La aireación se administró por mangueras estériles conectadas a tomas de aire (previamente abiertas por 15 minutos antes de iniciar el ensayo), para eliminar acumulaciones de aire condensado.

Los antibióticos utilizados en estos ensayos fueron: oxitetraciclina y cloranfenicol, ambos de tipo comercial, en una concentración de 20 ppm, 30ppm, y 40 ppm. aplicados ambos antibióticos de manera conjunta. Siendo el cloranfenicol disuelto en 20 ml de etanol.

La siembra en las peceras fue a una densidad de 15 juveniles por pecera (1 animal/ 4 litros), colocados aleatoriamente luego de ser pesados. Estos animales fueron alimentados 8 horas después de su introducción al sistema, con un 5% del peso seco de la biomasa de cada pecera. El alimento que fue esterilizado por 15 minutos, 121°C a 15 libras de presión (PSI).

Antes de iniciar el ensayo los tratamientos fueron sorteados, en conjunto con las peceras y los animales.

Se suministró los antibióticos diluidos en agua de mar de la misma pecera. Los análisis de tipo microbiológico e histológico se realizaron en los tiempos: 0, 4, 8, 12, y 24 horas, que correspondían al tiempo de exposición de los animales a los antibióticos. Entendiéndose como tiempo cero al momento antes de exponer a los animales a los antibióticos. Se llevó también un control sin antibiótico.

Tercera desinfección

Los juveniles llegaron a la sala de experimentación del CENAIM y fueron colocados en un tanque de 500 1 con agua de mar filtrada. Las peceras fueron llenados hasta 60 litros. El agua y aireación tuvieron las condiciones descritas en las otras desinfecciones.

La siembra en las peceras fue a una densidad de 10 juveniles por pecera (1 animal/ 6 litros), colocados aleatoriamente. Estos animales fueron alimentados 9 horas después de su introducción al sistema, a un 6 % del peso seco de la biomasa/pecera. El alimento fue administrado una vez por día, el mismo que fue esterilizado por 15 minutos, 121 ºC a 15 PSI, administrado con 24 horas máximo de anticipación, para evitar posible contaminación en el sistema. Los muestreos de tipo microbiológico e histológico se realizaron en los

tiempos 0, 12, 24 y 48 horas. Seis animales de cada tratamiento y de las dos respectivas réplicas fueron tomados. Se utilizaron tres camarones para microbiología y tres para histología.

Luego de 24 horas se realizó un recambio del 80% en todas las peceras antes de añadir nuevamente los antibióticos ya mencionados. Y 24 horas posterior al primer muestreo, se volvió a muestrear todas las peceras (denominándose a este muestreo 48 horas).

Cuarta desinfección

La siembra en las peceras fue a una densidad de 10 juveniles por pecera (1 animal/ 6 1) colocados aleatoriamente luego de ser pesados. Estos animales fueron alimentados 6 horas después de su introducción al sistema, a un 6 % de la biomasa/pecera.

La administración de agua, alimento, y aire fue semejante a las anteriores desinfecciones.

Este experimento fue realizado para verificar los resultados del anterior experimento y observar el comportamiento de los tratamientos por individuos y por grupo. Los tratamientos fueron (30 ppm, 40 ppm, 30 "pool", 40 "pool" y un control), llamándose tratamiento "pool" al macerado grupa1 de cinco individuos de cada tratamiento.

Los muestreos de tipo microbiológico e histológico se realizaron en los tiempos: 0 y 12 horas de contacto de los animales con los antibióticos, tomándose 5 animales por tratamiento para cada análisis.

2.2.2.2 Técnicas bacteriológicas

Medios de cultivos

Medios Sólidos

Agar Marino: este agar es un medio para bacterias marinas, en el cual pueden crecer distintas especies, no necesita la adición de cloruro de sodio. Tiene la característica de no

ser muy firme al solidificarse, por lo que es usual elevar la concentración de agar Agar al 2%. Para su preparación se disuelven 55 g de Agar Marino en un litro de agua destilada, y se esteriliza por autoclave durante 15 minutos, 121°C y 15 PSI.

.Agar TCBS *"Thiosulfate Citrate Bile Salts Agar":* Es un medio selectivo para vibrios, este medio no debe ser autoclavado, por lo tanto, es importante trabajar con materiales completamente estériles. Para su preparación se diluyen 89 g/l de agar en un litro de agua destilada, ajustando la concentración de cloruro de sodio al 2%.

Agar TSA *"Tryptic Soy Agar":* Es un medio universal que permite el crecimiento de distintas especies bacterianas y es recomendado para el aislamiento purificación e identificación de bacterias patógenas a partir de aguas marinas y estuarinas. Para su preparación se suspende 40 g del medio en 1 1 de agua destilada, modificando la salinidad al 2% con cloruro de sodio y agar agar al 2%.

LB agar: usado en laboratorios como medio de facilidad para el crecimiento de microorganismos. Se preparó disolviendo 32 gramos de agar en agua destilada, y esterilizado por autoclave. Elevándose la concentración de cloruro de sodio al 2%.

Medios líquidos

Agua de Peptona: este medio líquido se emplea para el enriquecimiento y previo cultivo de especies de vibrios patógenos, además de usárselo como medio de dilución. Se caracteriza por ser fuente de nitrógeno, el cual es un requerimiento necesario para el desarrollo de bacterias. Se prepara disolviendo 10 g de peptona en 1 litro de agua destilada. Se modifica la salinidad al 2%, y el pH a 7,2 para favorecer el crecimiento de bacterias marinas, y vibrios en general.

"Tryptic Soy Broth" (TS B): medio versátil y altamente nutritivo recomendado para usos generales de laboratorio. Debido a la inclusión de peptona y peptona de soya, el medio es favorable para el crecimiento de muchos organismos patógenos. Con una adición de 15% de glicerol, este medio es recomendable para el mantenimiento de cepas bacterianas en

congelación durante largos períodos.

LB Broth Base: medio de cultivo utilizado en biología molecular por su capacidad de permitir el crecimiento de microorganismos. Está constituido por levadura de cerveza, bacto triptona, y cloruro de sodio. Al igual que el medio sólido, la concentración de cloruro de sodio fue del 2 %.

Caldo nutritivo: medio líquido de múltiples aplicaciones para el cultivo de microorganismos no exigentes en sustancias nutritivas. Se preparó disolviendo 8 gramos por litro de agua destilada, con un pH de 7,2 seguido de su esterilización por autoclave.

Análisis microbiológico

Primera y segunda desinfección

Los animales fueron sacados de las peceras a recipientes estériles con agua de mar filtrada, luego fueron lavados en solución salina estéril al (2% de cloruro de sodio), dentro de la cámara de flujo laminar (Air Tech Japan, Ltd. mod. BCM-1002 W). En seguida se procedió a extraer los órganos internos de los camarones asépticamente. El hepatopáncreas fue tomado para la primera desinfección, en tanto que el corazón' y el hepatopáncreas se tomaron en la segunda desinfección.

Los corazones fueron macerados en forma individual en microtubos de 1.5 ml estériles y diluidos en 500 µl agua de peptona para hacer dos diluciones sucesivas (1/10) con una réplica por dilución. El crecimiento bacteriano fue leído en el espectrofotómetro DR 2000 marca HACH a una longitud de onda de 550 nm., después de 24 horas de incubación, a 27 °C, usándose como medio de cultivo agua de peptona.

Los hepatopáncreas fueron macerados individualmente en maceradores de vidrio con capacidad de 10 ml previamente esterilizados por una hora en el esterilizador marca ISUZU modelo 2-2097. Luego de hacer las respectivas diluciones 1/10 en solución salina al 2%, y continuar con el sembrado por barrido de estas en un volumen de 100 µl. en agar

Marino como en agar TCBS donde cada dilución tenía su réplica. Las placas sembradas fueron incubadas entre 25 y 27°C, durante 24 horas .

Las diluciones utilizadas para la siembra en la primera desinfección fueron de 10^{-4} y 10“ en agar marino, 10^{-3} y 10^{-4} para TCBS y para la segunda desinfección fue de 10^{-3} y 10^{-4} en agar marino y 10^{-4} y 10^{-5} en TCBS.

Tercera Desinfección

Los animales fueron sacados de los tratamientos a recipientes estériles conteniendo agua de mar filtrada, para luego ser lavados en solución salina al 2% estéril, dentro de la cámara de flujo laminar. El hepatopáncreas y el corazón fueron extraídos asépticamente e individualmente y fueron procesados con la metodología anteriormente descrita. Las diluciones utilizadas para la siembra fue de 10^{-2} y 10^{-3} en Agar Marino, 10^{-1} y 10^{-2} para TCBS. Luego de 24 horas de incubación, las colonias fueron contadas y las bacterias aisladas por agotamiento en agar TSA.

Las bacterias aisladas fueron identificadas bioquímicamente por la técnica miniaturizada descrita por Solís (1996). El principio de esta metodología consiste en la utilización de medios de cultivo específicos para la identificación de una característica metabólica. Cabe indicar que para realizar estas pruebas se debe tener un cultivo bacteriano cuidadosamente purificado y fresco de 24 horas de incubación. Por el contrario, si el cultivo no es puro y se encuentra mezclado con otras bacterias, el resultado de la identificación bioquímica es erróneo.

Pruebas Bioquímicas (Solís, 1996)

Tinción de Gram: Se colocó 1 gota de solución de Na(OH) al 3% en un porta objeto estéril. Con un asa estéril se tomó una pequeña parte de una colonia bien diferenciada y se la mezcló con la gota de Na (OH). Al producirse una especie de masa elástica en el inoculo, la bacteria es identificada como Gram negativa, caso contrario es Gram positiva.

Motilidad: se utilizó la lamina excavada de Koch por la técnica de gota pendiente. El inóculo fue una suspensión preparada con solución salina y una pequeña cantidad de bacterias de un cultivo no superior a 24 horas.

Catalasa: Algunas bacterias tienen la capacidad de producir la reacción de catálisis del peróxido de hidrógeno. Esto se observó al poner en contacto un inóculo bacteriano con una gota de peróxido de hidrógeno, se producen burbujas, que es oxígeno liberado. Esta prueba se debe hacer con asa de nicrón-cromada o con palillos de madera estéril, puesto que el asa de platino produce una respuesta falsa positiva.

Oxidasa: Con esta prueba se detectó la presencia de la enzima citocromo-oxidasa. Al contrario de la prueba anterior, se recomienda el asa de platino debido a que el asa de nicrón-cromada da un resultado falso positivo.

El resto de las pruebas seleccionadas se las hizo en microplacas de titulación de 96 pozos, incubadas a 28°C. Las lecturas se hicieron a las 24, 48 y 72 horas de cultivo.

Las suspensiones bacterianas fueron preparadas en tubos de ensayo, colocando una colonia bacteriana en agua destilada estéril para la prueba de crecimiento al 0% de NaCl y en solución salina al 2% de NaCl para el resto de las pruebas.

Crecimiento al 0% NaCl.

A 150 µl del medio NB (caldo nutritivo), se inocularon 20 µl de la suspensión bacteriana en agua destilada. La formación de turbidez en el medio debe indicar un resultado positivo, mientras que si permanece igual será negativo.

Metabolismo OF

En dos pozos de la microplaca se determinó el metabolismo oxidativo y fermentativo (usándose el medio de oxidación – fermentación de los microorganismos) basado en el metabolismo de los carbohidratos de bacilos Gram negativos. Para el primer metabolismo se usó 150 µl de medio OF y en el otro se utilizó 100 µl. de dicho medio. Se inocularon 20 µl de suspensión bacteriana en ambos pozos y al segundo se le añadió 40 µl de aceite mineral estéril, para garantizar una condición anaerobia.

La acidificación del medio con viraje del indicador de pH a amarillo solo en el pozo

abierto debería indicar un resultado positivo para la utilización oxidativa de la glucosa, mientras que la acidificación del medio en el pozo cubierto deber-fa indicar un resultado positivo para la utilización fermentativa de la glucosa, de los pozos significa que la bacteria no utiliza la glucosa de ninguna forma.

Producción de indol.

A 150 µl de triptona al 1% se inocularon 20 µl de la suspensión bacteriana, después de 1-3 días de incubación (cuando se note crecimiento) se adicionaron 20 µl del reactivo de Kovac mezclándolo directamente con la micropipeta. La aparición de un halo de color rosado o rojo en la superficie debe indicar una respuesta positiva.

Voges Proskauer.

A 100 µl del medio MR-VP se adicionaron 20 µl de la suspensión bacteriana, después de l-3 días de incubación (cuando se note crecimiento) se adicionaron 20 µl de la solución 1 (alpha naftol) y 20 µl de la solución 2 (Hidróxido de potasio al 1%), mezclando después de añadir cada solución. La aparición de un color rojo debería indicar que la prueba es positiva, esto ocurre inmediatamente o después de 5 minutos de haber añadido el segundo reactivo. Sin embargo, sería preferible leer los resultados después de 4 horas a fin de garantizar la veracidad de la reacción.

Citrato de Simmons

A 150 µl del medio citrato de Simmons se añadieron 20 µl de la suspensión bacteriana. Una reacción positiva debería ser indicada por el cambio de color del medio de verde a azul, mientras que el resultado es negativo si no hay cambio de color.

Ornitina descarboxilasa

A 150 µl del medio "bacto decarboxylase" base Moeller con el aminoácido omitina, se adicionaron 20 µl de suspensión bacteriana y 40 µl de aceite mineral estéril. El desarrollo de una coloración violeta fuerte o débil indicó un resultado positivo, una coloración amarilla, negativo.

Arginina dihidrolasa

A 150 µl del medio "bacto decarboxylase" base Moeller el aminoácido arginina, se

adicionaron 20 µl de la suspensión bacteriana y 40 µl de aceite mineral estéril. El desarrollo de una coloración violeta fuerte o débil deberá indicar un resultado positivo, una coloración amarilla, negativo.

Carbohidratos

Para determinar la asimilación de carbohidratos se utilizó los siguientes: L-Arabinosa, Celobiosa, D-Mannosa, D-Manito], Sucrosa, D-Glucuronato, D-Gluconato y Galactosa. La forma de preparación están en el anexo 1.

2.3.1.3 Inmunoensayos

Diferentes inmunoensayos, son empleados en salud humana y veterinaria, basados en las reacciones específicas antígeno-anticuerpo con diferentes mamadores. Los inmunoensayos son especialmente adecuados para detectar antígenos en estudios epidemiológicos de enfermedades bacterianas, particularmente a través de las técnicas de "Colony blot" y "Dot blot" (San Miguel, 1996).

Colony blot

Esta técnica se utilizó para la identificación específica de colonias bacterianas de una misma cepa. Es un método sensible, específico y rápido que permite conocer el porcentaje de bacterias que han crecido en una placa de agar, a que reaccionan con el anticuerpo específico para una determinada especie bacteriana (Donoso, 1996).

Luego de 6 a 8 horas de cultivo en agar TCBS, las colonias bacterianas que crecen en el agar a partir de una son transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente son incubadas con una solución bloqueadora para reducir la capacidad de fijación no específica de los anticuerpos en la membrana. Al añadir el anticuerpo específicos epítopes del antígeno reaccionarán con los anticuerpos monoclonales y se producirá el complejo antígeno - anticuerpo. Un segundo anticuerpo conjugado a un enzima va a reconocer al

primer anticuerpo del complejo. Al añadir el sustrato correspondiente se activara el enzima originando un precipitado coloreado sobre las improntas de las colonias positivas.

Protocolo detallado del Colony Blot

1. Se realizó un cultivo bacteriano en agar TCBS incubado entre 6 a 8 horas máximo a 28°C
2. Se colocó las membranas de nitrocelulosa (82,5 mm de diámetro, con poros de 0.45 μm) en la superficie del agar donde se han desarrollado las bacterias y dejar por 5 minutos.
3. Se colocó la membrana en una caja petri vacía, asegurándose que las bacterias estén en la parte superior de la membrana y secar 30 min. la membrana, antes de realizar el test.
4. Se incubó con "tampón fosfatasa alcalina" (PBS)-leche descremada 5% (peso/volumen) en una caja petri agitando suavemente por 60 min. a temperatura ambiente.
5. Se realizó 3 lavados de 3 mm. c/u con PBS-Tween 20 (0,1%)
6. Se depositó el anticuerpo (fluido ascítico a la dilución adecuada en PBS-Tween 0,1%-leche 0,5% ó sobrenadante de cultivo sin diluir) e incubar por 60 min. a temperatura ambiente.
7. Se realizó 3 lavados de 3 min. con PBS-Tween 20 (O,l%).
8. Se depositó el anticuerpo conjugado fosfatasa alcalina e incubar por 45 min. Dilución empleada del anticuerpo 1/10.000 en PBS-Tween-O,l%-Leche 0.5 %.
9. Se realizó 3 lavados de 3 min. con PBS-Tween 20 (0,1%).
10. Se incubó hasta la aparición de la manchas violetas de reconocimiento positivo, con la solución substrato recientemente preparada:

BCIP (25 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolylfosfato en 0.5 ml de dimethyl-formamida) 33 μl.

NBT (25 mg de Nitro Blue Tetrazolium en 1 ml de agua deionizada). 66 μl.

Tampón a la fosfatasa alcalina (Na Cl 5.84g/l, Mg Cl, 0.5 g/l, Tris base 12.11 g/l, pH 9.5). 10 ml.

ESPOL CIB · ESPOL

Dot-blot

La técnica de Dot-blot también se utilizo para el diagnóstico por medio de la reacción antígeno-anticuerpo. El procedimiento a seguir es similar al colony-blot, con la diferencia de que la fijación del antígeno en la membrana se hace a partir de una suspensión bacteriana preparada en buffer líquido.

ESPOL CIB · ESPOL

Protocolo Dot. Blot.

1. Se depositó 2 microlitros de la suspensión de bacterias (1 colonia de bacteria en 500 µl de PBS 800 mosM) en una membrana de nitrocelulosa.
2. Se secó la membrana a la temperatura ambiente por 30 minutos.
3. Los siguientes pasos son similares a los descritos en la técnica de Colony Blot.

ESPOL CIB · ESPOL

2.2.2.4 Técnicas de Biología Molecular

AP PCR

POL CIB · ESPOL

Extracción de ADN.

Esta técnica fue utilizada para extraer el ADN de la bacteria y analizar mediante electroforesis en gel de agarosa.

1. Bacterias aisladas en agar TSA, una colonia fue transferida en 300 µl de buffer de electroforesis (TAE) 1X . (Anexo 1).
2. Se calentó por 10 min. a 100°C, para romper la pared celular de las bacterias.
3. Se enfrió los tubos en hielo.
4. Se centrifugó por 10 min. a 13.000 rpm.
5. Se recuperó el sobrenadante que contiene ADN.

*Protocolo para la **amplificación** de ADN por medio de la AP PCR*

1. Se tomó 5 µl. de ADN y se colocó en un micro tubo (0.5 ml.).

2. Se agregó 5 µl. de agua destilada estéril.

3. Se agregó 40 µl. de solución mezcla.

La solución mezcla se compone de:

H_2O	25.8 µl.
Tampón para la Taq polimerasa10X.	.5.0 µl.
dNTPs	4.0 µl.
Cl_2Mg.	.4.0 µl.
Primer 1	1.0 µl.
Taq	0.2 µl.

4. Se agregó 50 µl. de aceite mineral estéril para evitar que la muestra se evapore al ponerla en el termociclador (Gene-Tech, Apparatus SPCR-1) para obtener la amplificación del ADN.

Electroforesis de los productos de amplificación

Preparación del gel.

1. En 1960 ml de agua destilada se agregó 40 ml de solución TAE 50X y homogenizó.

2. Se tomó en una fiola 350 ml. de la solución TAE 1X. Pesar 5.25 g. de agarosa y agregársela a la fiola. Y calentó en baño maría hasta que la agarosa se disuelva por

completo. Una vez fría se añadió 17.5 µl. de Bromuro de Etidio (1 µl. de bromuro por cada 20 ml de solución) y depositó en el molde de electroforesis.

Preparación de la muestra

1. Se tomó 20 µl. de ADN amplificado y añadió 4 µl. de Azul de bromo fenol y glicerol.
2. Se depositó los 24 µl. de muestra en cada pozo del gel.
3. Se realizó la electroforesis a 75 voltios por espacio de 3 horas.

2.2.2.5 Técnicas de Histología

El método utilizado para muestrear camarones para histología fue descrito por Lightner (1988). Los tejidos fueron fijados en solución Davidson (anexo 1) durante 24 horas como máximo y transferidos a alcohol al 70 % para su almacenamiento. Debe tenerse la precaución de no mantener largos tiempos las muestras en Davidson porque los tejidos empezaran a disolverse, afectando el buen procesamiento de la muestra para su examen. El alcohol permite el almacenamiento de las muestras por largos períodos de tiempo antes de su procesamiento.

Al tener los camarones un peso superior a los 3 g, debieron ser inyectados con el fijador, en el cefalotórax, el abdomen y cola, usándose una jeringa de 1cc. El número de puntos de inyección y el volumen varió dependiendo del tamaño del camarón. Se verificó que todos los tejidos fueran expuestos al fijador.

Ya en alcohol las muestras fueron cortadas, separándose la cola de la cabeza, esta última sufrió un corte longitudinal. Si existió alguna lesión, estas fueron mantenidas para su observación, de otra forma todo lo que se necesitó fue el cefalotórax y una sección del abdomen con todos los apéndices removidos. Cada muestra fue rotulada con lápiz en papel, incluido en el recipiente para su identificación.

Deshidratación: posterior a la fijación de las muestras estas fueron deshidratadas en varios baños de etanol (Tabla 6).

Tabla 6 . Mecanismo y tiempos de deshidratación

Bano	Tiempo
Etanol al 70%	1 hora
Etanol al 80%	l hora
Etanol al 90%	1 hora
Etanol al 95%	1 hora
Etanol al 100% (I, Il, III)	1 hora
Xilol (1 y II)	l hora

Posteriormente a la deshidratación las muestras fueron incluidas en tres baños de parafina sucesivos a una temperatura de 67 ºC, por una hora cada baño.

Después de la inclusión en parafina, se cortó con un micrótomo ERMA INC. los bloques parafinados. Estos cortes se des parafinaron e hidrataron antes de ser sometidos a tinción. Figura 7.

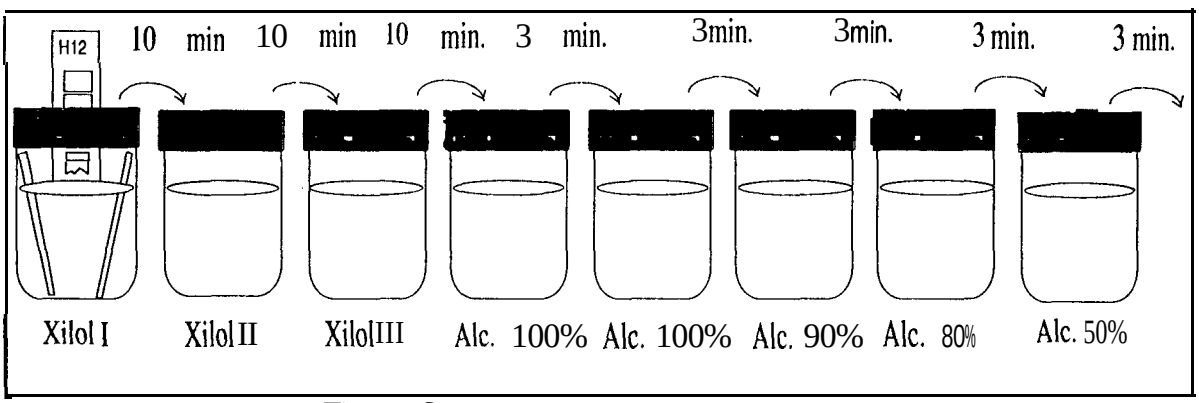


Figura 6. Tiempos de desparafinado e hidratación

Los baños sucesivos de desparafinado, hidratación y tinción son detallados a continuación.

Tiempos para la tinción (Hematoxilina - Eosina)

Xilol (3 veces)	10 min.
Etanol al 100%	3 min.

Etanol al 90%	3 min.
Etanol al 80%	3 min.
Etanol al 50%	3 min.
Agua Destilada	3 min.
Hematoxilina (Anexo 1)	5 - 10 min.
Agua de la llave	5 min.
Eosina-Floxina (Anexo 1)	1-3min.
Agua destilada	2 - 3 inmersiones
Etanol al 70%	1 min.
Etanol al 90%	1 min.
Etanol al 100% (dos veces)	1 min.
Xi101 1 y II	5 min.

El montaje de las placas se realizó con una gota de solución Permount®. Las muestras teñidas y montadas fueron observadas en el microscopio marca Olympus modelo BH-2 en un objetivo de inmersión 100 X, mientras que placas no teñidas fueron mantenidas a temperatura ambiente.

Para estudiar los resultados de las desinfecciones e infecciones las lecturas fueron transformadas a índices de histología (I.H.). (Bayot, com personal), cuantificándose y sumándose los principales efectos patológicos de los animales. Para lo cual se tomó en cuenta varias ponderaciones de importancia como son: importancia de la patología y comparación con otras patologías. Se consideró el criterio de afectación (ponderación 1), dentro de cada patología, donde se evalúa el grado de lesión de los animales (ponderación 2), y el nivel de la enfermedad en términos de daños y lesiones(ponderación 3).

Tabla 7. Ponderación 1, para calificación por el nivel de significancia de la patología (Bayot, com. personal)

Patología	Calificación	
Vibriosis intestino	1	bacterias intestino
Vibriosis (encapsulations hemocíticas hepatopáncreas)	2	bacterias hepatopáncreas= encapsulations hemocíticas= infiltraciones hemocíticas
Vibriosis (necrosis hepatopáncreas o túbulos necrosados	3	
Gregarinas	1	
Gregarinas estómago	1	
Gregarinas intestino	1	
IHHNV cordon nervioso	2	
IHHNV epitelio cuticular	2	
IHHNV glándula antena1	2	
IHHNV tejido conectivo (estómago)	2	
Melanización branquias	1	
Zoothamium apéndices	1	
Zoothamium branquias	1	
Bacterias cuticulares	1	
Bacterias filamentosas, apéndices	1	
Bacterias filamentosas, branquias	1	
Bacterias filamentosas, cutículas	1	
Bacterias filamentosas, periópodos	1	
Bacterias apéndices	1	
Necrosis intestino	1	
Necrosis órgano linfoide	1	
Encapsulations hemocíticas, tejido conectivo	1	
Baculovirus hepatopáncreas	1	
Infiltración hemocítica tejido conectivo	1	
Protozoarios cutícula	1	
Protozoarios en apéndices	1	
Protozoarios en branquias	1	
Protozoarios periópodos	1	

Donde: 1 patología poco importante, 2 patología medianamente importante, 3 patología muy importante.

Tabla 8. Ponderación 3, calificación dada según el nivel de infección de la patología, ***com pers.*** (Panchana, 2000).

Nivel de infección	Calificación
Muy leve	1
Leve	2
Moderado	3
Severo	4

Siendo el Indice de histología igual a la suma de todas las lesiones encontradas en una fecha determinada, dividida para el número de camarones en la muestras, multiplicadas por la ponderación 1, 2 y 3.

2.2.3. Infecciones Experimentales de camarones

2.2.3.1. Primer experimento de infección

Esta infección tuvo el objetivo de evaluar el mejor método de aplicación del inóculo bacteriano. La bacteria fue administrada por baño y inyección.

Cepa bacteriana y métodos de aplicación

La bacteria utilizada fue el *V. vulnificus* (S,), diluido en solución salina al 0.85%, para la aplicación por inyección al hepatopáncreas (50 μl), mientras que la concentración 10^8 se usó en el método por inmersión o baño. El inóculo se aplicó 24 horas después de la infección, 12 horas después se realizó una segunda aplicación.

Animales

Los animales utilizados procedieron de los tanques externos de CENAIM, con un peso promedio de 5,75 g,. El número de peceras fue de 5(1 control, 1 control inyectado, 1 para inyección, 2 por baño). El volumen de las peceras, la concentración 40ppm, el tiempo de aplicación de los antibióticos de 12 horas.

Análisis microbiológico

Pasadas 12 horas de la segunda re- inoculación los animales fueron muestreados a nivel microbiológico. Se sembró macerados de hepatopáncreas en agar TCBS en las diluciones de 10^{0},10^{-1} analizándose 5 animales individuales por tratamiento, y dos pools de cada tratamiento, consistiendo cada uno de 5 animales. Las bacterias luego de ser aisladas fueron identificadas genéticamente, bioquímicamente e inmunitariamente con anticuerpos específicos para la cepa de *V. vulnificus*.

2.2.3.2. Segundo experimento de infección

Material Biológico

Tratamiento de la cepa

1. La cepa procesada de V. *vulnificus*, fue sembrada por el método de agotamiento en LB agar (2 % de NaCl, 2 % de agar Agar), , e incubada por 8 horas. Con un asa de platino se repicó en 50 ml de LB B pH 7,2. Se permitió el crecimiento de la bacteria en agitación constante por 4 a 5 horas, para pasar a un último repique en 450 ml de LB e incubación por un tiempo de 8-10 horas con movimiento y aireación.
2. Para reducir los volúmenes de medio/bacteria a administrarse en las peceras, el material biológico infeccioso fue centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm., y resuspendido en solución salina al 2 % en un volumen no inferior a 50 ml.
3. Para leer la densidad óptica la muestra fue diluida 5 veces en solución salina al 2%. Se realizó los cálculos correspondientes a la concentración de bacteria, asumiendo que el factor de crecimiento en 1 D.O. es igual a 1,2E+09 bacterias/ml.

Animales

La siembra en las peceras fue aleatoria a una densidad de 10 juveniles por pecera (1 animal/4 1.) cuyo peso promedio fue de 6,43 g. Estos animales fueron alimentados 8 horas después de su introducción al sistema, a un 5% del peso seco de la biomasa de cada

pecera, el alimento fue esterilizado por 15 minutos, 12 1°C a 15 PSI, con el fin de reducir la contaminación por el alimento. El número de peceras utilizadas fue de 3 peceras por tratamiento y 2 peceras por control.

Exposición a las bacterias.

La concentración de bacterias en el agua de las peceras fue de 10^7 bacterias / ml y 10^8 bacterias/ml, en exposición prolongada de los animales en el inoculo (15 cm de profundidad de agua). Se administró dos veces la bacteria a los tratamientos, previo a un recambio de 100% del agua antes de la colocación de la bacteria.

Antibióticos

Los antibióticos utilizados en este ensayos fueron: oxitetraciclina a 40 ppm y cloranfenicol a 40 ppm. Manteniéndose las consideraciones de la última desinfección y el tiempo de exposición de 12 horas, antes de inocular la bacteria.

Protocolo seguido de desinfección e infección

1. Después del2 horas de la desinfección con los antibióticos, se realizó un 100% de recambio del agua, para posteriormente subir el nivel a 15 litros, antes de introducir la bacteria a la concentración por mililitro deseada.

2. Se reinoculó 24 horas después de la infección una segunda dosis de la bacteria, con el objetivo de asegurar su presencia. Se muestreo 12 horas después de la segunda infección el agua y los animales. Después de este muestreo las peceras, fueron recambiadas en un 100 %.

3. Siete días después de la infección, se tomaron muestras de animales para realizar observaciones en fresco y para histología.

Tabla 9. Se observa los intervalos de tiempo entre la desinfección y aplicación de la bacteria.

Tiempo de duración	Actividad.
12h	Desinfección con oxitetraciclina y cloranfenicol (40 ppm).
24 h	Primera administración de bacteria a la pecera.
36 h	Segunda administración de bacteria.

Muestras de agua fueron tomadas 12 horas después de la primera infección, con el objetivo de comprobar si la bacteria no fue eliminada por residuos de antibiótico.
A las 48 horas los animales fueron muestreados para microbiología e histología.

Análisis microbiológico: Para los análisis microbiológico, se preparó diluciones de hepatopáncreas en Agar Marino 10^{-2},10^{-3} y Agar TCBS 10^{0} ,10^{-1}. El número de muestras tomadas fue de 10 animales por tratamiento. Los análisis fueron procesados de manera individual.

Una vez incubadas las muestras, fueron contadas las placas en las que crecieron colonias en número inferior a 300 y superiores a 30 colonias.
Se tomó bacterias tanto de agar marino y agar TCBS, para ser aisladas en agar TSA (2% de cloruro de sodio suplementado con agar Agar), para la caracterización bioquímica de las mismas. Posteriormente se realizó las inmunopruebas.

2.2.3.3. Tercer exnerimento de infección

La tercera infección tuvo el objetivo de encontrar la concentración de bacterias con capacidad de introducirse, produciendo síntomas en los organismos. Como tratamiento se aplicaron 4 concentraciones de bacterias por el método de inmersión prolongada (baño) con la bacteria el *V. vulnificus*.

Animales

Los animales provinieron de la camaronera FINCACUA, tuvieron un peso promedio de 5,5 g al inicio del ensayo. La metodología de desinfección fue igual a la aplicada en las infecciones anteriores. Se tomaron 10 animales por tratamiento para microbiología, y 10 animales para histología.

Tratamientos

Las concentraciones utilizadas fueron 10^3, 10^4, 10^5 y 10^6 bacterias/ ml, a más de los controles con animales no desinfectados (Cl) y animales desinfectados (C2). El número de peceras utilizadas fue de 3 peceras por tratamiento y 3 peceras por control, a una densidad de 10 animales/pecera.

Análisis microbiológico e histológicos

En los análisis microbiológico individuales, diluciones de macerado de hepatopáncreas en solución salina (2% de NaCl) fueron sembradas en un volumen de 100 μl por placa. Las diluciones empleadas en Agar Marino fueron 10^{-2} ,10^{-3} para todos los tratamientos y 10^{-1}, 10^2 para los controles no desinfectados, mientras que en Agar TCBS la dilución 10^{-1} fue aplicada a todos los tratamientos.

Para el examen histológico se tomaron cinco animales de cada tratamiento y fueron fijados, con la metodología ya descrita.

2.2.3.4. Cuarto exoerimento de infección

En esta infección, se repitió el experimento anterior aumentando la concentración de bacteria, a fin de observar si existía repetibilidad en el ingreso de la bacteria en camarones juveniles. Los tratamientos consistieron en la aplicación de bacteria V. ***vulnificus*** (S_2) a las concentraciones de 10^4, 10^5, 10^6, y 10^7 bacterias/ml, control no desinfectado (Cl) y

otro desinfectado (C2), cada tratamiento tuvo tres réplicas.

Diseño experimental

Las características estructurales de la sala del bioensayo fueron mantenidas como en la anterior infección, la procedencia del material biológico (animales) fue de la camaronera CRISMAR.

El número de peceras utilizadas fueron 3 por tratamiento, y 3 por control, a una densidad de 10 animales/pecera, el peso promedio de los animales al inicio del ensayo fue de 6,35g. La metodología de desinfección fue igual a la de los anteriores ensayos, al igual que la aplicación de la bacteria. Posteriormente a las 36 horas de infección 10 animales/ tratamiento fueron muestreados para análisis microbiológico, y 10 animales para el histológico.

Análisis microbiológico

El análisis microbiológico de los animales fue de forma individual, empleándose las diluciones en Agar Marino 10^{2} ,10^{-3}, para todos los tratamientos y 10^{-1}, 10^{-2} para los controles no desinfectados; y en Agar TCBS 10^{-1} para todos los tratamientos.

Técnica de identificación

Las bacterias aisladas fueron identificadas por métodos bioquímicos, e inmunológicos (Dot blot). Ver en materiales y métodos (2.2.2.2 y 2.2.2.3).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. INTERACCION PATOGENO- HUESPED

En razón a los postulados de Koch, en un proceso infeccioso, son los microorganismos como bacterias, virus y otros, los agentes causales de problemas patológicos. Pero, si consideramos, no sólo a los microorganismo como causales, sino también al huésped y a sus mecanismos de defensa como factores importantes que influyen en la respuesta de los posibles patógenos, será necesario considerar también las interacciones del patógeno y su huésped en los procesos infecciosos.

Por este motivo en este estudio en el que se ha utilizado al V. *vulnificus*, agente causal del sfndrome de las bolitas en larvas de camarón (Morales, 1992) y a juveniles de *P. vannamei* como huésped, se consideró necesario evaluar a nivel experimental las interacciones camarón – bacteria, para lo cual se estudió *in vitro* la respuesta inmunitaria de juveniles frente al patógeno, midiendo la producción de radicales libres de oxigeno (O-J, la actividad fenoloxidasa (PO), y la actividad antibacteriana del plasma. Haciendo uso de la bacteria *V. alginolyticus* como control.

En los ensayos se utilizó las bacterias tanto en estado vivo como muerto (bacterina). Por otra parte se empleó periplasma de ambas bacterias. El periplasma es en general rico en (toxinas) exocitables. Por parte del huésped se utilizaron mezclas de hemolinfas, con la finalidad de contar con el volumen suficiente de muestras que, permitan realizar varias replicas por ensayo.

Los datos fueron analizados por análisis de varianza ANOVA con un 95% de nivel de confianza.

3.1.1. Producción de Anión Superóxido (O^-_2), por los hemocitos el camarón *vs. V. vulnificus*

En esta prueba se cuantificó la producción de (O^-_2), por los hemocitos de *P. vannamei* utilizando como estimulantes: el agente de estudio *Vibrio* ***vulnificus***, *y* el probiótico control *Vibrio alginolyticus,* a más de PMA (estimulante establecido en el protocolo estandarizado de cuantificación(O^-_2). Se utilizó también en las pruebas periplasmas de las dos bacterias (toxinas) para observar si estos antígenos bacterianos tenían la capacidad de estimular o inhibir la producción de O^-_2 .

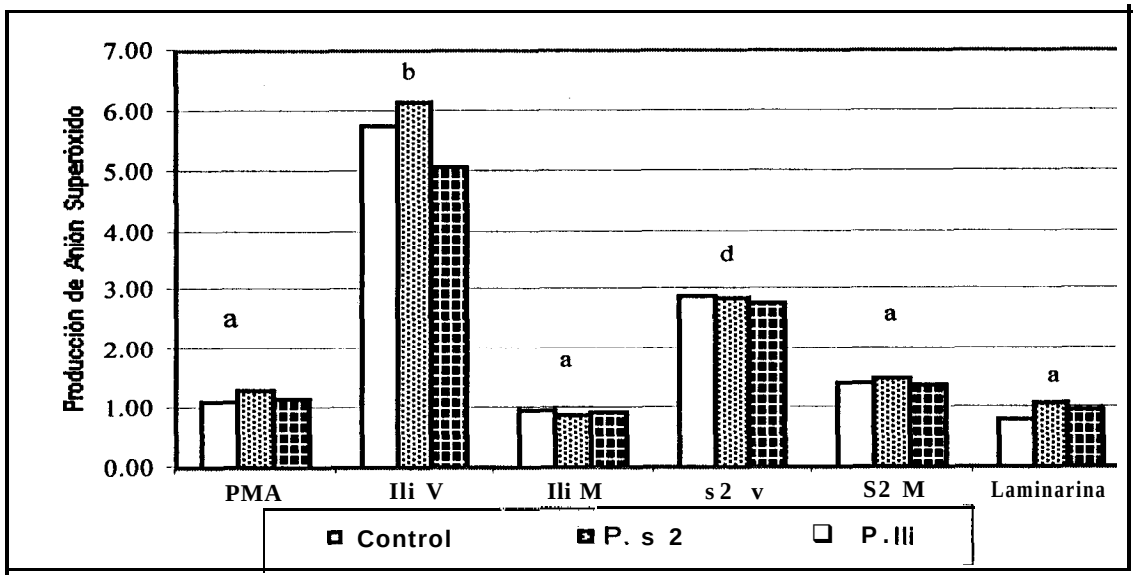


Figura 7. Producción de Anión Superóxido, usándose varios tipos de estimulantes: Ili V= V. alginolyticus vivo, Ili M = ***V. alginolyticus*** muer b ***V =V. vulnificus*** vivo, ***S 2 M = V. vulnificus*** muerto, y PMA y Laminarina. Bajo tres condiciones: control (sin periplasmas), con periplasma de ***V. alginolyticus*** (P.Ili), con periplasma de ***V. vulnificus*** (P. S,). Letras iguales nivel de significancia (p=0.05).

En la figura 7 podemos observar las tasas de estimulación producidas por los hemocitos de la misma muestra con los distintos estimulantes. Se observó alta e: a Ilación provocadas por *V. alginolyticus* con respecto al otro vibrio, esto debido posiblemente a las cualidades probióticas del primero y patógenas del segundo (San Miguel, 1996).

Una fuerte estimulación en la producción de anión superóxido, causada por el *Vibrio alginolyticus* en comparación a otros estimulantes, fue también observada por Muñoz,(in press).

Debe recordarse que entre los caracteres de virulencia de la bacterias patógenas, está la capacidad de resistir a los componentes bactericidas del huésped. Por otra parte el V. *vulnificus* presenta en su superficie una cápsula polisacárida (Bush *et al.*,1997). Horré *et al.*(1996) consideró a las cápsulas de *V. vulnificus* como posible causal de la evasión a la fagocitosis, cuando encontró dos tipos encapsulados de esta bacteria altamente virulentos.

Las aplicaciones de periplasmas no provocaron ningún efecto. Esta aplicación se realizó considerando que toxinas secretadas pudieran estar también implicadas en la menor estimulación provocada por *V. vulnificus*.

Por los resultados se observó que la estimulación observada con *V. vulnificus* puede ser provocada por la parte externa de la bacteria viva, encontrándose diferencias de estimulación entre bacterias vivas y muertas. A pesar de las precauciones tomadas en la preparación de la bacterina, no se puede descartar que el proceso de producción no haya estropeado antígenos necesarios al reconocimiento, posiblemente algún componente LPS presente en la bacteria viva se estropea al ser, estas expuestas a *60* ºC, por lo cual la estimulación fue muy baja cuando se utilizó bacterias muertas.

3.1.2. Estimulación del PO uor parte del V. *vulnificus*

La estimulación de la PO por hemocitos de camarón se realizó usándose como estimulantes, bacterina de *V. vulnificus y V. alginolyticus*, laminarina, también se estudio el efecto del periplasma. Debido a que el tampón utilizado en el ensayo es hipotónico y tóxico, no fue posible realizar la estimulación con bacterias vivas.

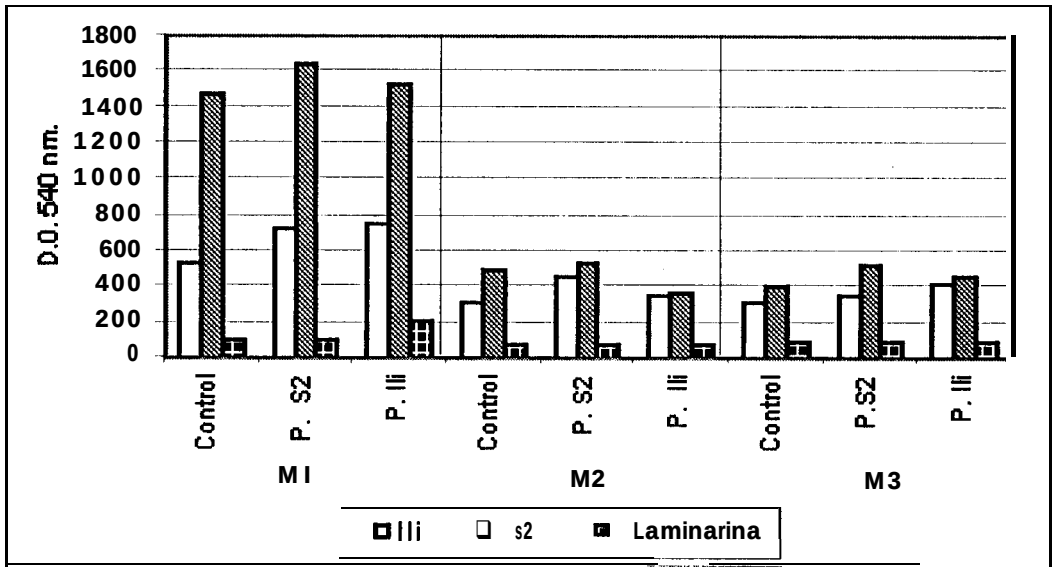


Figura 8. Densidad óptica relacionada con la estimulación de actividad fenoloxidasa producida en tres experimentos, utilizando en cada uno, una mezcla de hemocitos de varios camarones. Donde: Ili = *V. alginolyticus,* S_2 = *V. vulnificus*, M1 = muestreo 1, M2 = muestreo 2, M3 = muestreo 3. Bajo tres condiciones, control sin periplasmas, periplasma de *V. alginolyticus* (P. Ili), periplasma de *V. vulnificus*.(P. S_2).

En el primer ensayo la bacteria S_2 indujo una respuesta estimuladora superior a los otros estimulantes. No se encontró diferencias significativas entre los estimulantes Ili y S_2 en el segundo y tercer ensayo (M2 y M3), aunque si se observó una tendencia a que la actividad inducida por V. *vulnificus* sea mayor. Se observó diferencias de estimulación entre los dos vibrios y la laminarina en los tres ensayos, por lo que podemos apreciar que los estimulantes como los vibrios tienen la capacidad de activar con fuerza el sistema proPO, factor favorable en la detección de procesos de vibriosis en formación.

Por otra parte a pesar de que en general las paredes de los microorganismos pueden inducir la exocitosis del sistema proPO, los resultados muestran que el origen del antígeno es importante para activar el sistema proPO en mayor y menor grado. Estos resultados concuerdan con los reportados por Perazzolo y Barraco (1997), quienes al investigar el enzima proPO en ***Penaeus paulensis y*** su relación con el sistema

inmunitario, encontraron que este proenzima es activado por componentes de las paredes celulares de microorganismos tales como LPS y ß- 1,3 glucanos, encontrando que los LPS provocan la activación del sistema más que los ß- 1,3 glucanos. Semejanza de resultados encontró Sung *et al.*,1998 en *P. monodon* al estimular los hemocitos de esta especie con paredes celulares de *Vibrio vulnificus*, ß- 1,3 glucanos y laminarina.

Los resultados alcanzados con *Vibrio vulnificus* dejan suponer que este vibrio debe resistir la alta activación de la PO por el provocada, obteniendo posiblemente ventajas de una situación de inflamación.

3.1.3. Actividad Antibacteriana

El ensayo de actividad antibacteriana realizado siguiendo el protocolo de Tapia (1996), tuvo el objetivo de observar el comportamiento de *V. vulnificus*, frente a la actividad antibacteriana de varias muestras de plasmas. *V. alginolyticus se* utilizó como control en tanto que *Escherichia coli* es la bacteria utilizada en este test. Se tomó como referencia las concentraciones dadas por Tapia (1996), la figura 9 enseña el porcentaje de inhibición de quince muestras de plasmas con estas bacterias

Se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el porcentaje de inhibición a *E. coli* con respecto a las otras bacterias. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Tapia (1996), quien demostró que la bacteria S_2 e Ili desarrollaban niveles bajos de inhibición de la actividad antibacteriana del plasma de camarón.

La baja capacidad de inhibir el crecimiento de los vibrios por el plasma, puede ser producto del rápido crecimiento de estos vibrios quienes tal vez utilizan el plasma como fuente de nutrientes para crecer, siendo insensibles a las moléculas microbicidas del mismo. Esto no ocurre con la *Escherichiu coli*, bacteria cuyo crecimiento si es inhibido por el plasma de camarón. Es necesario anotar sin embargo que la cepa utilizada *Escherichia coli* D3 1, no sólo es ajena al entorno del camarón sino que también se trata

de una cepa especial con deficiencias en la pared celular, siendo particularmente sensible a moléculas microbicidas.

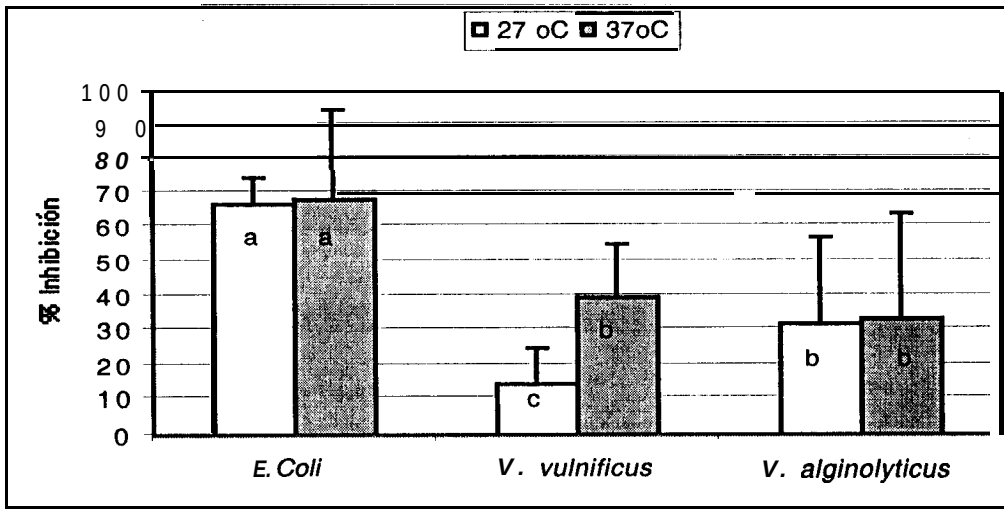


Figura 9. Porcentaje de inhibición de crecimiento de tres tipos de bacterias por la actividad antibacteriana del plasma. Donde E. coli = *V. Escheria coli.* Letras diferentes existió diferencias significativas ($p<0.05$).

Curiosamente se encontró además que la temperatura puede influir en la capacidad de la bacteria para resistir la actividad antibacteriana del huésped, obsérvese en la figura 9, que el *V. vulnificus* tiende a alterar su sensibilidad con la temperatura, siendo más sensible a 27°C, probablemente altas temperaturas como 37°C afectan la capacidad de esta bacteria de eludir la acción de moléculas antibacterianas, o en su defecto que a la temperatura de 27 °C, los vibrios sean más activos, por lo cual pueden crecer mejor y no ser afectados por la acción antibacteriana del huésped.

Observando globalmente los resultados obtenidos se puede asumir que el V. *vulnificus* sería también una bacteria patógena de camarones juveniles, siendo uno de sus factores de virulencia la evasión o neutralización de la respuesta inmune del huésped (actividad antibacteriana O^{-}_{2}), pudiendo por lo tanto ser utilizada en un modelo de infección experimental en camarones juveniles. Sin embargo se debe anotar que ella es capaz de activar con fuerza el sistema proPO, si esto constituye una ventaja 0 un perjuicio para el

huésped no ha sido elucidado en este estudio, cabe anotar que algunas bacterias patógenas son capaces de provocar fuerte reacciones inflamatorias que dañan los tejidos del huésped, provocando de esta manera la liberación de nutrientes indispensables a su crecimiento, siendo insensibles a la inflamación de la cual se protegen a través de cápsulas, cubierta protectora presente en la bacteria de estudio.

3.2. OPTIMIZACION DE UN PROTOCOLO DE INFECCION EN JUVENILES

Aumento de la virulencia bacteriana

Morales (1992) recuperó en tanques de cultivos de larvas donde existían mortalidades superiores al 80% a una bacteria del género Vibrio la misma que fue codificada como S_2. Posteriormente esta bacteria fue identificada como V. *vulnificus* por Solís (1996). Sin embargo San Miguel(1996), en ensayos realizados con las cepa patógena V. *vulnificus* S_2 observó una disminución de la virulencia de la cepa al exponerla a larvas de camarón, atribuyendo esta pérdida de patogenicidad a cultivos sucesivos en medios comerciales y a congelaciones y descongelaciones repetidas. Por ese motivo en el presente estudio se consideró reactivar la patogenicidad de la cepa antes de iniciar los ensayos de infección.

Los factores de virulencia que se consideró necesario incrementar fueron, resistencia al sistema inmunitario del huésped y capacidad de crecimiento de la bacteria en los tejidos del huésped.

3.2.1.1. Confrontación con el sistema inmune del camarón

Selección de bacterias capaces de crecer en plasma de camarón.

En ensayos *in vitro* se sometió en ocasiones sucesivas a la bacteria ***V. vulnificus*** a la actividad antibacteriana del plasma.

Siguiendo el protocolo de Tapia (1996), la bacteria fue expuesta a la actividad de cuatro muestras de plasma, las mismas que mostraron diferencias entre ellas en el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano. Para los desafíos posteriores se seleccionaron dos muestras (M4) y (MI), por ser la primera altamente inhibitoria, mientras que la segunda mostró tener poca capacidad de inhibición.

Se sometió a la bacteria S_2 al plasma M4 en varias exposiciones repetidas, con la finalidad de observar una reducción de la actividad antibacteriana de este plasma. Indicador del aumento de la capacidad de crecimiento de esta bacteria en el plasma del camarón.

Según los resultados observado en la figura 10, la bacteria tiende a aumentar el número de UFC al pasar por la muestras de plasmas, observándose una reducción en la capacidad de inhibición de la muestra M4. Se consideró esto como un signo de mayor resistencia a los componentes bactericidas del plasma de camarón y de incremento de la virulencia.

Cabe indicar que las muestras de plasmas fueron divididas en sub - muestras antes de empezar los análisis, por lo cual se descarta a la vez contaminación de las muestras de plasma y reducción de la actividad antibacteriana por descongelaciones sucesivas.

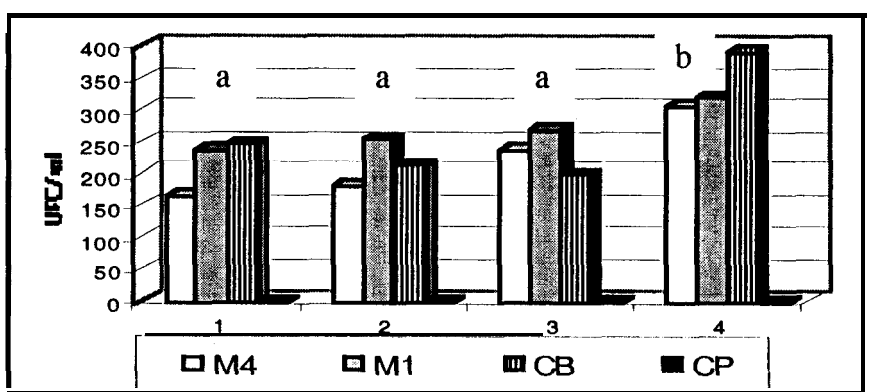


Figura 10. Crecimiento en UFC/ml de *V. vulnificus* en dos muestras de plasmas, M4 = altamente inhibitoria, M1 = poca inhibición, CB = control bacteria, CP = control plasma, por cuatro exposiciones sucesivas. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p<0.05$).

Selección de bacterias con inhibición incrementada al choque respiratorio.

La bacteria sometida a cuatro exposiciones de plasma fue utilizada para inhibir el choque respiratorio de hemocitos de camarón. En este ensayo a más del *V. vulnificus* pasado por plasma cuatro veces, otra cepa del mismo vibrio fue sometida al plasma en dos ocasiones.

Se observó que el *V. vulnificus* pasado cuatro veces por plasma, tuvo una respuesta estimuladora igual al estimulante PMA.

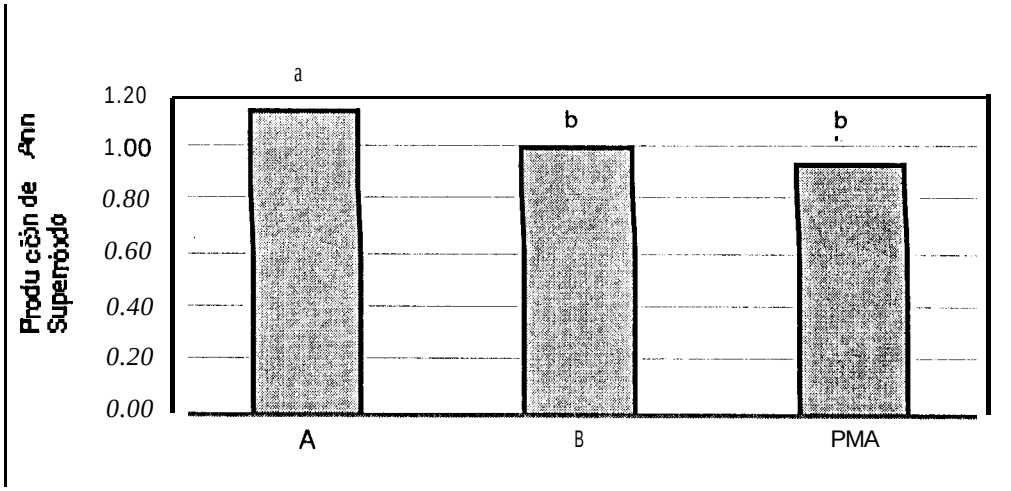


Figura ll. Producción de Anión superóxido por dos cepas de *V. vulnificus* sometidas a plasma de camrón. Donde A = bacteria sometida dos veces a plasma M4, B = bacteria sometida a plasma M4 cuatro veces, y PMA estimulante base del protocolo. Letras iguales con nivel de significancia (p=0.05).

Existió mayor estimulación en la cepa sometida por menos ocasiones a exposiciones de plasma, en comparación a la otra cepa. La poca actividad de la cepa B influyó para considerarla adecuada para infecciones experimentales en camarones juveniles.

Selección por crecimiento en medio de cultivo

Para la estandarización del manejo de la bacteria en un medio hipotónico; considerando que la hemolinfa de camarón es hipotónica con respecto al agua de mar, se expuso la

bacteria antes de empezar los ensayos, a un crecimiento en dos concentraciones de cloruro de sodio, fin de determinar cual concentración era más propicia para la bacteria. Utilizándose a la vez las cuatro muestras de plasmas antes mencionadas, a fin de observar el comportamiento del vibrio en los plasmas y en las dos concentraciones de cloruro de sodio.

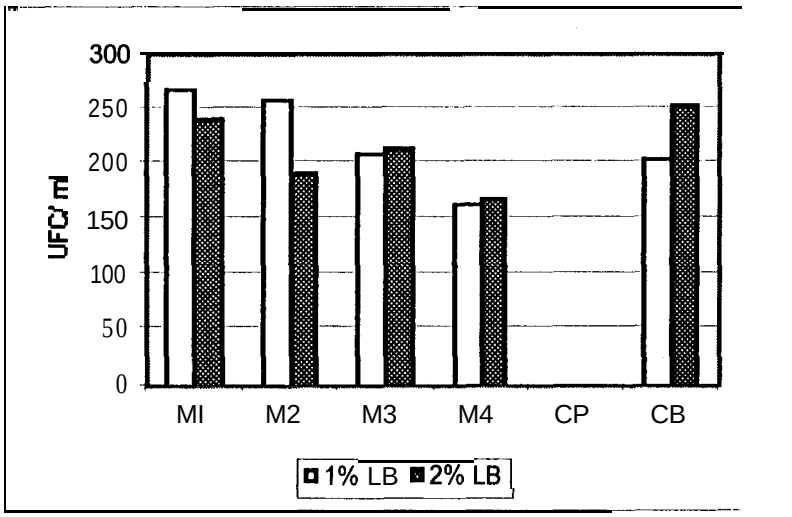


Figura 12. Unidades formadoras de colonia/ml de V. *vulnificus* obtenidas de este vibrio en cuatro muestras de plasmas, con dos concentraciones de cloruro de sodio en agar LB. Donde M1, M2 y M3 = plasmas pocos inhibitorios, M4 = plasma altamente inhibitorio, CB = control bacteria y CP = control plasma.

No se encontró diferencias significativas en el crecimiento de la bacteria en las dos concentraciones de cloruro de sodio en las cuatro muestras de plasmas, en cambio si observamos que a mayor concentración de cloruro de sodio el crecimiento en el control bacteria (CB), fue mayor, siendo esto normal por ser este un vibrio halófilo.

La concentración del 2% con cloruro de sodio fue seleccionada tomándose en consideración los resultados obtenidos por Tapia (1996), donde el *Vibrio haweyi* creció mejor a mayores concentraciones de iones de sodio.

Posteriormente a la selección de la cepa bacteriana con buen crecimiento en el plasma de camarón y con producción negativa de anión superóxido, la bacteria fue sometida a

la acción agresiva del hepatopáncreas del camarón, para lo cual se la sembró en agar hepatopáncreas (Calero,1998), antes de congelarla con los procedimientos ya descritos en la metodología (2.2.1.2).

3.2.2. Desinfecciones

A fin de asegurar el ingreso de la bacteria seleccionada para las infecciones, antes de iniciar la fase experimental se procedió a determinar una concentración de antibiótico capaz de eliminar la carga bacteriana propia de los animales, incrementando los sitios de adhesión y colonización de la bacteria patógena. En base a la información obtenida en ensayos realizados en larvas (San Miguel, 1996; Serrano, 1996), y en nauplios por Intriago (1998), se utilizó dos antibióticos en forma conjunta, la oxitetraciclina y el cloranfenicol,

Los análisis estadísticos de las pruebas fueron realizados por el método no paramétrico Wilcoxon Matched Pairs Test con un nivel de confianza del 95% .

3.2.2.1. Primer exnerimento de desinfección

En el primer experimento se usó la oxitetraciclina y el cloranfenicol a varias concentraciones: 20, 30 y 40 ppm, realizándose muestreos a los intervalos de 4, 8,12,24 y 48 horas. En este experimento la recuperación de bacterias contables no pudo realizarse, debido a que las diluciones usadas estaban fuera de los límites de detección (menor de 30 UFC) por lo cual los análisis histológicos determinaron el grado de limpieza debido a la acción de los antibióticos. Se observó también el estado de órganos como hepatopáncreas, estómago, intestino, y branquias.

En la tabla 10 se puede observar los resultados de histología expresados en índices.

Estos índices se obtuvieron en base a los resultados histológicos, considerando varias ponderaciones de importancia como son: la importancia de la enfermedad y su influencia en los sistemas de producción (ponderación 1), el número de animales infectados observados en los tratamientos (ponderación 2), y el grado de daño de los tejidos (ponderación 3). Ver materiales y métodos (2.2.2.5). También se indican el número de bacterias observadas y cualificadas por histología. Siendo + pocas bacterias, (1 - 5), ++ bacterias en cantidades moderadas (10-50 bacterias), +++ bacterias en altas cantidades (mayor a 100 bacterias), con acumulación. El objetivo fue estimar el nivel de desinfección logrado con los antibióticos, a través de los índices de histologfa y de calificación cualitativa del número de bacterias observadas.

Tabla 10. Indice de histologfa (I.H.) y número de bacterias observadas por histologfa, en animales expuestos a varias concentraciones de antibióticos.

Tratamiento	Tiempo (horas)	I.H.	No. bacterias
Control	0	2,0	+++
Control	8	4,50	+++
Control	12	14,0	++++
Control	24	6,0	+++
Control	48	7,6	+++
20 ppm	4	5,0	+++
20 ppm	8	1,50	+
20 ppm	12	8,0	++
20 ppm	24	2,0	tt
20 ppm	48	10,0	+
30 ppm	4	0,0	+t
30 ppm	8	0,0	t
30 ppm	12	6,0	t+
30 ppm	24	3,0	tt
30 ppm	48	8,5	+
40 ppm	4	4,6	tt
40 ppm	8	6,0	t
40 ppm	12	1,0	+
40 ppm	24	12,0	tt
40 ppm	48	5,0	+

Donde I.H. = Indice de Histología (grado de daño histológicos encontrado en los tratamientos después de la aplicación de los antibióticos en los tiempos 0,4,8,12,24 y 48 horas).

De las observaciones de los índices histológicos se determinó que la concentración de 20 ppm logró desinfectar a las 8 horas, pero a medida que transcurrió el tiempo el índice aumentó, lo que indicaría que el grado de desinfección por el antibiótico va disminuyendo conforme pasa el tiempo. Con la concentración 30 ppm el índice de histología tuvo el valor de 0 a las 4 y 8 horas, al tiempo 12 horas comenzó a aumentar en relación al tiempo, lo que indicaría que esta concentración fue efectiva en las primeras horas. La concentración de 40 ppm tuvo un índice de histología alto al inicio, pero a las 12 horas este índice disminuye considerablemente con respecto a los demás tratamientos, pero también al aumentar el tiempo esta concentración se comportó como los demás tratamientos.

En cuanto al número de bacterias observadas en los órganos, a las 8 horas de exposición en todas las concentraciones de antibióticos, se observó pocas bacterias (+), sobre todo a nivel del estómago y hepatopáncreas del animal, pero al pasar las 12 horas de exposición a los antibióticos, el número de bacterias tendió a aumentar, sobre todo en los tratamientos 20 ppm y 30 ppm. (Figura 13).

En base a los resultados de histología (III/ número de bacterias) consideramos que entre 8 y 12 horas fue un periodo apropiado de exposición a los antibióticos.

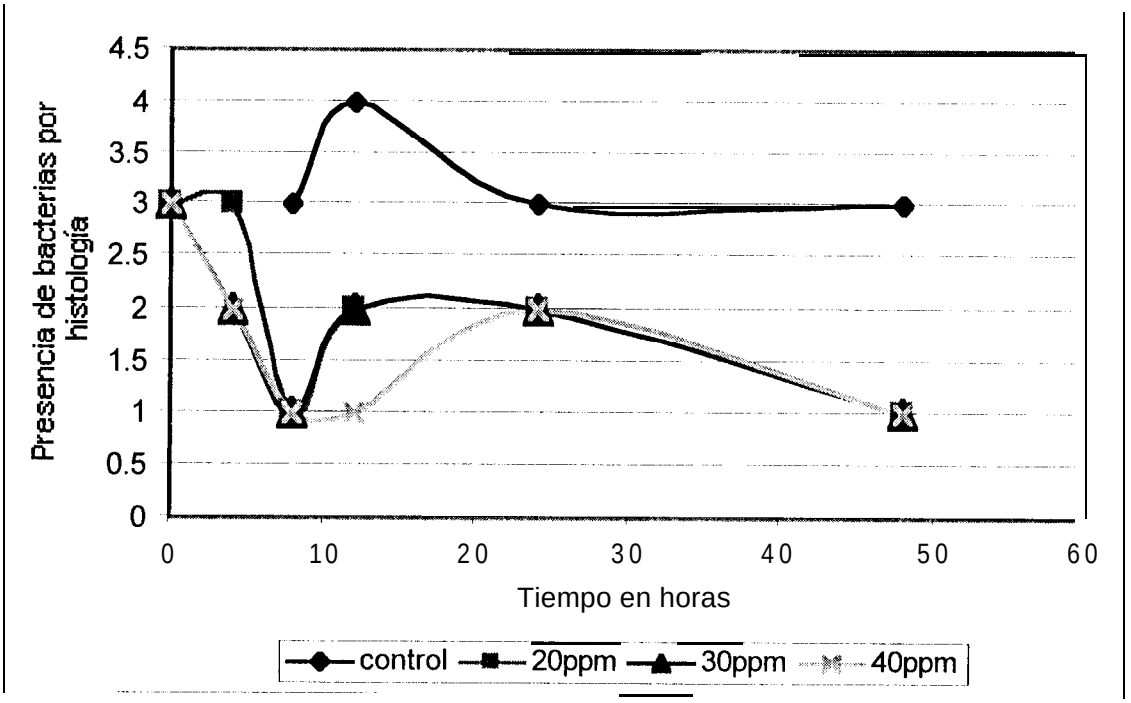


Figura 13. Presencia de bacterias observadas por histología, en animales sometidos a desinfección con varias concentraciones de antibióticos. Donde el control = sin antibiótico, 1 = pocas bacterias (1-5), 2=bacterias en cantidades moderadas (10 - 50), y 3= bacterias en altas cantidades(superior a 100).

Figura 14. Observación histológica de túbulos normales, levemente lisados de animal desinfectado con el tratamiento 40ppm. Aumento 40X

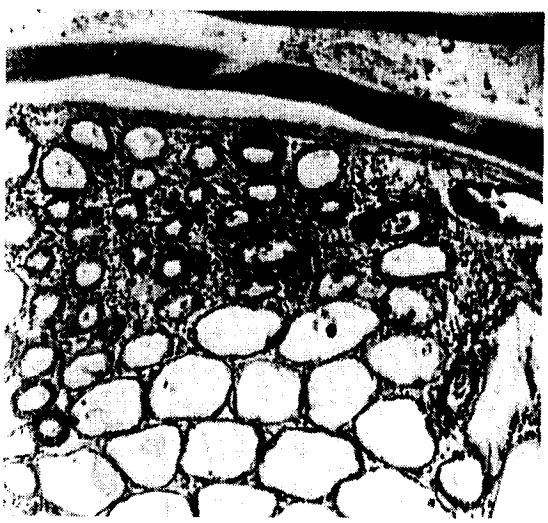


Figura 15. Observación histológica de una cápsula hemocítica y lisis de túbulos de animal no desinfectado. Aumento 40X

2.2. Segundo exuerimento de desinfección

Este segundo experimento de desinfección tuvo el objetivo de contar con datos microbiológicos a más de los datos histológicos, para lo cual se repitió el ensayo de desinfección, utilizando la misma metodología del primer experimento. Se observó por turbidez el crecimiento bacteriano en macerados de corazón en medio líquido y se realizó microbiología del hepatopáncreas. Al igual que en el primer ensayo los tiempos de muestreo fueron 4, 8, 12 y 24 horas de exposición de los animales a los antibióticos.

En lo que concierne a la microbiología del hepatopáncreas, a pesar de haber disminuido las concentraciones de dilución de siembra, no fue posible la recuperación de bacterias contables y las UFC estuvieron fuera de los límites permitidos de conteo.(menos 30 colonias por placa).

Por las observaciones de los índices histológicos (Tabla ll), se pudo encontrar que la concentración de 20 ppm presentó los menores índices en los tiempos 4 y 24 horas. La concentración 30 ppm tuvo un índice histológico menor a las 4 y 8 horas, que indujo a pensar que fue en estos tiempos, donde se pudo reducir en mayor medida el número de bacterias. La concentración de 40 ppm presentó un índice menor sólo en el tiempo de 12 horas. Comparando el índice de histología con el número de bacterias observado por histología, se puede asumir que las concentraciones de antibióticos tienden a disminuir la carga bacteriana entre las 8 y 12 horas.

Tabla ll. Indice de histologia (I.H.) y número de bacterias observadas por histologia, en animales expuestos a varias concentraciones de antibióticos.

Tratamientos	Tiempo (horas)	I.H.	No. de bacterias
Control	0	4,00	+++
Control	8	4,60	+++
Control	12	14,00	+++
Control	24	7,00	++
20 ppm	4	5,00	+++
20 ppm	8	1,70	+
20 ppm	12	8,00	+
20 ppm	24	2,00	++
30 ppm	4	1,00	++
30 ppm	8	2,00	+
30 ppm	12	6,00	++
30 ppm	24	4,00	++
40 ppm	4	5,46	++
40 ppm	8	7,00	+
40 ppm	12	3,00	+
40 ppm	24	10,00	++

Al observar la acción de los tratamientos en los macerados de corazón las diferencias de absorvancia fueron notorias en los tratamientos con antibióticos respecto al control. Las concentraciones de 30 y 40 ppm de antibióticos reducen considerablemente la presencia de bacterias al tiempo 8 horas, manteniéndose poco crecimiento al aumentar el periodo de exposición ($p = 0,05$), pero no es así con el tratamiento 20 ppm donde a partir de las

10 horas la recuperación del número de bacterias es reflejado por el aumento de turbidez. La rápida recuperación de bacterias en la menor concentración de antibióticos puede deberse a una pérdida mayor o más rápida de la acción del antibiótico, o a aquellas bacterias sobrevivientes o resistentes que empezaron a multiplicarse aprovechando la disponibilidad de espacio dejado por las bacterias sensibles.

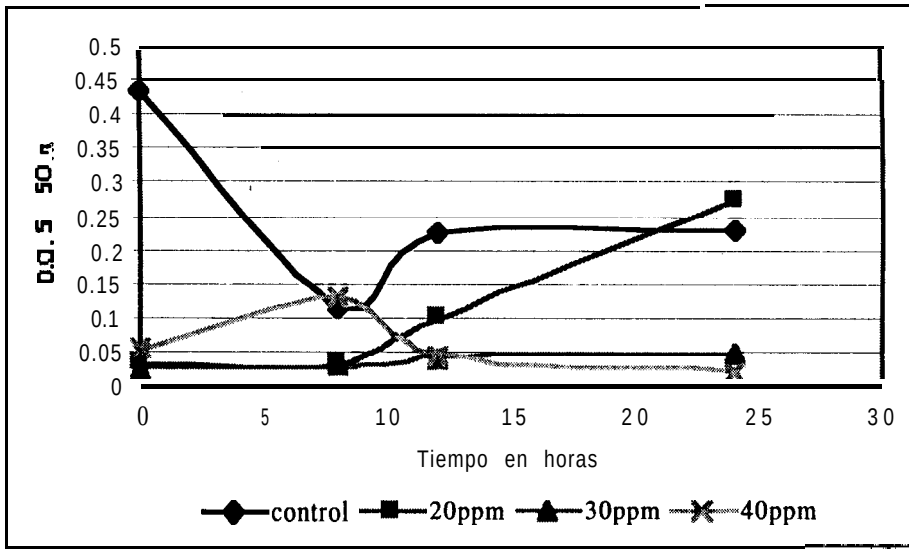


Figura 16. Densidad óptica de crecimiento de bacterias, medida en macerados de corazón de animales desinfectados con oxitetraciclina y cloranfenicol en diferentes concentraciones. Siendo el control = sin antibiótico.

3.2.2.3. Tercer experimento de desinfección

En base a los resultados histológicos y de microbiología del segundo experimento de desinfección, se decidió tomar dos concentraciones de antibióticos (30 y 40 ppm) y dos tiempos de muestreos (12 y 24 horas) para el tercer ensayo de desinfección.

En este experimento se añadió una segunda dosis de antibióticos a las 24 horas después de la primera aplicación, con el objetivo de mantener bajos los niveles de bacterias en los órganos (hepatopáncreas, estómago). Se realizó un recambio del 80 % de agua, antes de la segunda aplicación de antibióticos.

Se observó una reducción marcada de las UFC a las 12 horas de exposición a los

antibióticos. La segunda aplicación de antibióticos resultó en un efecto multiplicador recuperándose un elevado número de UFC a las 48 horas en los dos tratamientos (Figura 17). 24 horàs después de la segunda aplicación la carga bacteriana había recuperado la mitad del número original de UFC al tiempo que se observó un incremento de la turbidez en los macerados de corazón (Figura 18).

Se encontró diferencias significativas (p=0,02) entre el control (tiempo 0) y el tratamiento 30 ppm a las 12,24 y 48 horas, mientras que con el tratamiento de 40 ppm la diferencia sólo existió en el tiempo 12 horas. Estadísticamente no existió diferencias entre los tratamientos con antibiótico al tiempo 12 horas.

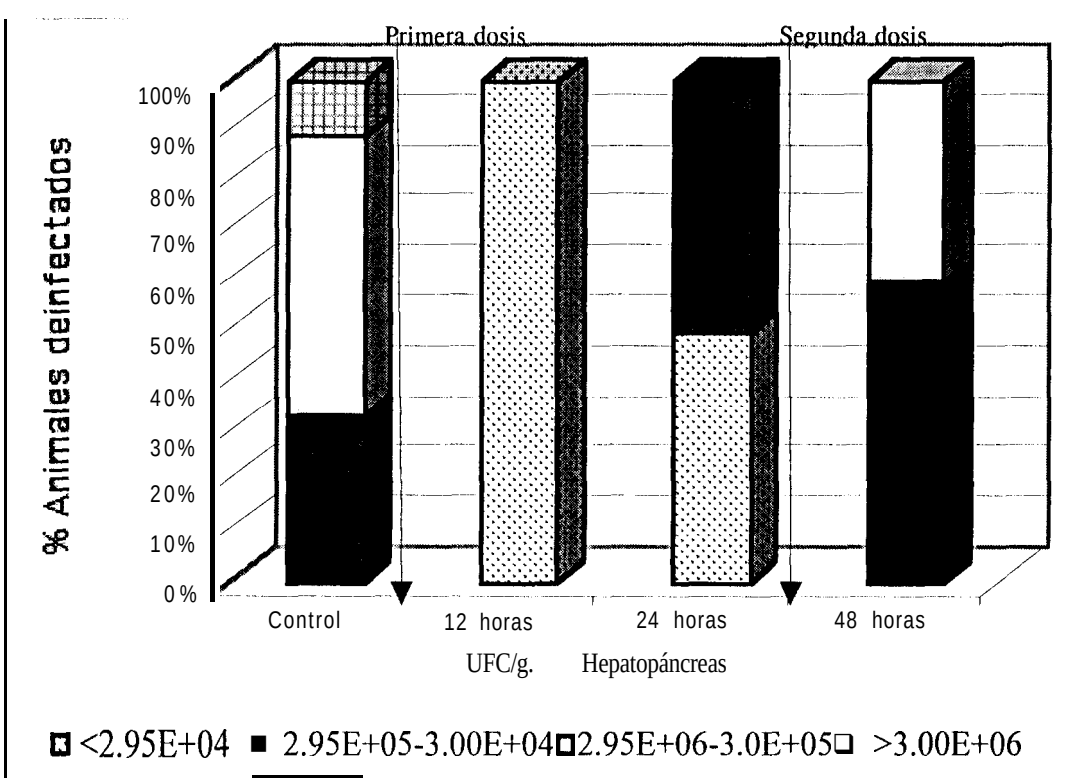


Figura 17. Porcentaje de animales desinfectados y UFC/g. de hepatopáncreas recuperadas, al aplicarse 40 ppm de oxitetraciclina y 40 ppm de cloranfenicol. Donde el control = sin antibiótico. Aplicación de los antibióticos. ↓

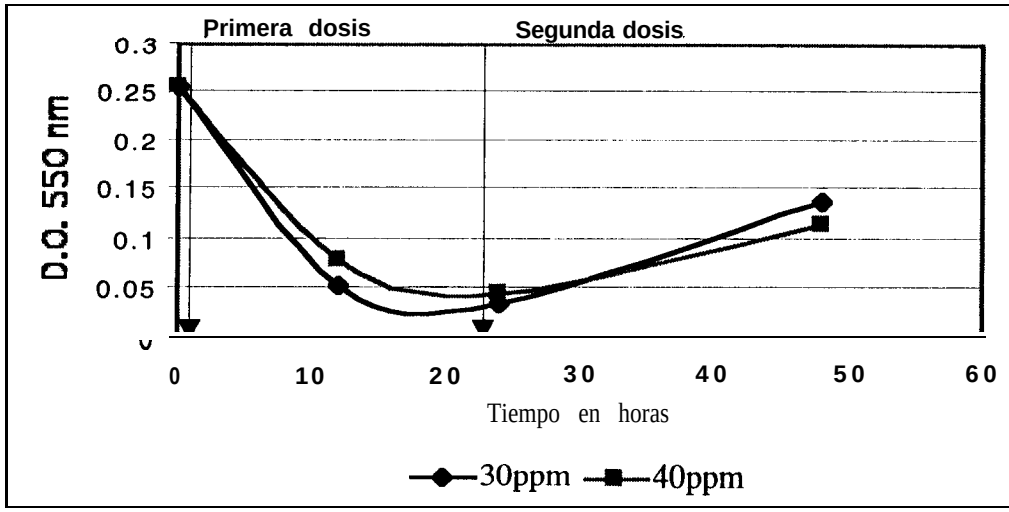


Figura 18. Densidad óptica de crecimiento bacteriano en macerados de corazón, luego de la aplicación de dos concentraciones (30 ppm y 40 ppm) de oxitetraciclina y cloranfenicol. ↓Momentos en los que se aplicó los antibióticos.

Se consideró que el crecimiento de bacterias observado luego de la segunda aplicación de antibiótico se debió a una alta proliferación de bacterias resistentes, las cuales aprovecharon los sitios libres de colonización dejados por las bacterias sensibles durante casi 48 horas seguidas de tratamiento antibiótico.

3.2.2.4. Cuarto exnerimento de desinfección

Esta desinfección fue realizada con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos y observar con más detalle las características de desinfección a las 12 horas de aplicación de los dos antibióticos antes nombrados. Además del análisis microbiológico del hepatopáncreas y microbiológico de individuos, se realizó macerados de hepatopáncreas formando "mezclas o pools" con el objetivo de saber si estos podian ser utilizados en futuras pruebas facilitando, de esta manera, el muestreo. También se realizó macerados de corazón en forma individual (Tabla 12).

Tabla 12. Densidad óptica de macerados de corazón (550 nm) de dos tratamientos de desinfección con antibióticos (oxitetraciclina y cloranfenicol) y un control sin antibiótico.

Tratamiento	Tiempo horas	D.O.
Control	0	0,257
30 ppm	12	0,054
40 ppm	12	0,080

El número de UFC fue significativamente menor (p=0.015) entre los animales tratados con antibióticos y los del control. No existió diferencias significativas (p=0,138) entre los dos tratamientos con antibióticos al tiempo 12 horas, al igual que el anterior experimento. Habiendo la misma tendencia de tener menores cantidades de UFC con el tratamiento 40 ppm (Figura 20). Utilizando los pools no se encontró diferencias en la capacidad de desinfección de los tratamientos (datos no mostrados) debido posiblemente a la existencia de animales con mayor resistencia a la desinfección, los mismos que elevaron la cantidad de UFC del pool o mezcla.

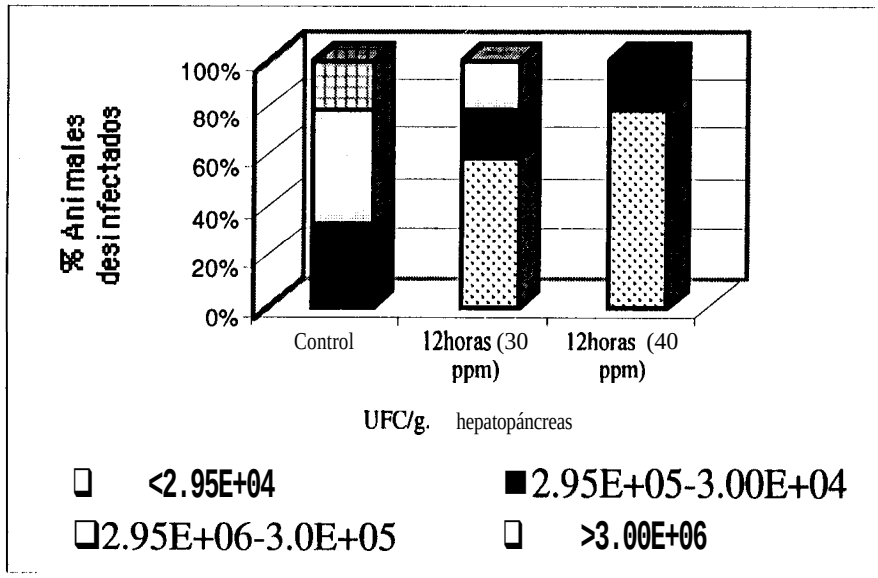


Figura 19. Porcentaje de animales desinfectados y UFC/g. de hepatopáncreas al tiempo 12 horas, aplicando 30 ppm de oxitetraciclina- cloranfenicol y 40 ppm de oxitetraciclina y cloranfenicol. Donde las UFC/g. de hepatopáncreas (inferiores a 2.9E+04) son recuperado en un 80% de los animales desinfectados con 40 ppm de oxitetraciclina y cloranfenicol.

Considerando los resultados obtenidos, se concluyó que 40 ppm de oxitetraciclina y 40 ppm de cloranfenicol, fueron las mejores dosis para obtener un mayor porcentaje de animales desinfectados en 8 horas de exposición y en una sola aplicación. Siendo por lo tanto recomendable inocular las bacterias entre las 8 y 12 horas, después de un recambio de agua para eliminar los antibióticos del medio. Cabe recalcar además que los resultados sugieren que las mejores técnicas para evaluar la desinfección son, macerados individuales de hepatopáncreas, macerados de corazón y observación cualitativa de bacterias por histología. Los macerados en pools de hepatopáncreas dieron resultados confusos y poco explotables. Por otra parte el índice de histologfa mostró que los animales vienen con daños en los tejidos desde la camaronera y que la desinfección con antibióticos puede eliminar las bacterias, pero esta eliminación no se acompaña siempre de la recuperación de los tejidos.

ESPOL CIB · ESPOL

3.2.3. Infecciones

Una vez encontrada la concentración de antibióticos capaz de liberar sitios de adhesión, facilitando el ingreso y la colonización a nuevas bacterias en los animales, el paso siguiente fue encontrar la concentración de inóculo bacteriano capaz de ingresar, multiplicarse y provocar daños en los tejidos del huésped. Para realizar esto se utilizó la cepa de *V. vulnificus* que fue expuesta *in vitro* al sistema inmunitario del camarón, con la finalidad de volverla más virulenta. .

ESPOL CIB · ESPOL

3.2.3.1. Primer exnerimento de infección

Por medio del primer experimento de infección se exploró dos vías de ingreso de las bacterias en el animal, con la finalidad de encontrar la técnica que permitiera que el mayor número de animales sean infectados. Se usó la concentración 10^8 bacterias/ml y los métodos de aplicación fueron, baño e inyección del inóculo. Se tomó como referencia las infecciones experimentales realizadas por Roque *et al.*, 1998. El ingreso fue evaluado contabilizando las UFC/g de hepatopáncreas en agar TCBS, agar utilizado por sus características selectivas para vibrios. Los animales fueron desinfectados por 12 horas con 40ppm de oxitetraciclina y 40 ppm de cloranfenicol antes de la infección.

Los animales infectados por el método de inmersión presentaron mayor número de UFC/ g. de hepatopáncreas, que aquellos donde la bacteria fue ingresada por inyección (Tabla, 13). Las bacterias recuperadas de los dos tratamientos fueron identificadas como *V. vulnificus* mediante bioquímica, AP-PCR y Dot blot con anticuerpo monoclonales (Figura 20 a,b)

Tabla 13. Unidades formadoras de colonia/g de hepatopáncreas recuperadas en agar TCBS de animales infectados con dos métodos de infección.

Tratamiento	Bacteria amarillas	Bacterias verdes
*Control Inyectado	90 ± 27 [a]	2 ± 1
Control sin Inyectar	84 ± 42"	10 ± 5
Inmersión	24 ± 2 [b]	514 ± 38
Inyección	65 ± 20"	25 ± 17

*Animales inyectados con solución salina estéril. Letras iguales no existió diferencias significativas (p=0.05).

a) b)

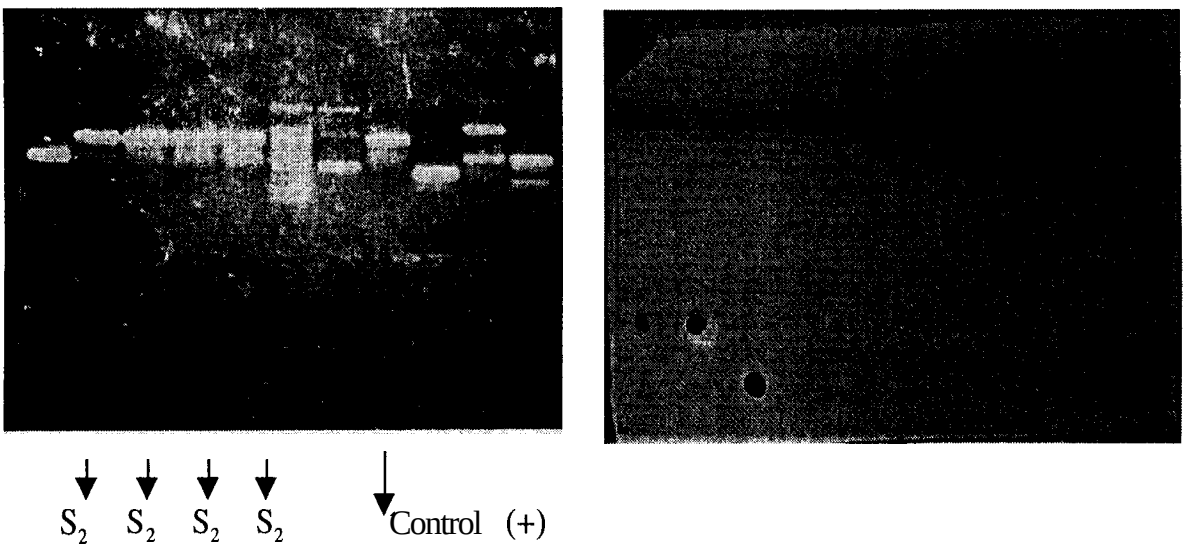


Figura 20. Reconocimiento del *V. vulnificus*. a) Fotografía RAPD, positiva para *V. vulnificus y* b) Dot blot con anticuerpo específico para S_2.

En base a estos resultados se tomó la decisión de aplicar el método de inmersión como el más apropiado en ensayos de infección, sobre todo para objetivos de análisis inmunitarios, ya que el método de inyección, además de no ser eficaz, implicaría el riesgo del ingreso de bacterias no deseadas, así como también la aparición de posibles patologías no asociadas al vibrio de interés y/o daños asociados al trauma de la inyección y no a forzosamente a la bacteria introducida.

3.2.3.1. Segundo experimento de infección

Antes de realizar esta infección, los animales fueron desinfectados por 12 horas con 40 ppm de oxitetraciclina y 40 ppm de cloranfenicol.

En este experimento se eligió dos concentraciones de bacterias para la inmersión, tomando de referencia el trabajo realizado por San Miguel (1996), donde la concentración 10^7 bacterias/ml en larvas permitió mayor recuperación de UFC/g a partir de macerados de hepatopáncreas. Las concentraciones usadas fueron 10^7 y 10^8 bacterias/ml, aplicadas en inmersión prolongada de 36 horas. A las 24 horas de exposición se hizo recambio y se re - inoculó las bacterias dejándolas por12 horas más. Se realizaron análisis microbiológicos e histológicos de los animales muestreados a las 36 horas.

En la figura 21 podemos observar que a las 36 horas de infección los animales tratados con V. ***vulnificus*** presentaron significativamente mayor UFC/g de hepatopáncreas que los del control (p=0.020). Por otra parte las observaciones histológicas de los animales inoculados con 10^7 mostraron alteraciones internas, en órganos como el hepatopáncreas y estómago (Indice histológico mayor del control) con la concentración 10 ^{7} b/ml (Figura 21, Figura 22).

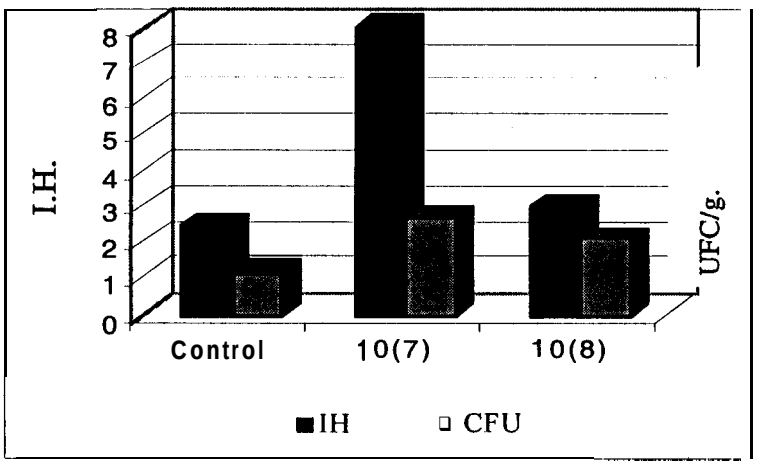


Figura 21. Indice histológico y UFC/g. de hepatopáncreas (E+06) de animales infectados con dos concentraciones de *V. **vulnificus***. Siendo el control = tratamiento desinfectado con 40 ppm de oxitetraciclina y 40ppm de cloranfenicol.

Figura 22. Observación histológica de hepatopáncreas y estómago de animal infectado con 10' b/ml de *V. vulnificus*. Aumento 20X.

Las bacterias recuperadas del análisis microbiológico de hepatopáncreas de los dos tratamientos de infección, fueron identificadas como *V. vulnificus* con anticuerpos específicos para este vibro a más de la identificación bioquímica. La figura 23, presenta el porcentaje de animales infectados con *V. vulnificus* y UFC/g de hepatopáncreas en agar marino. Como se puede observar las dos concentraciones utilizadas fueron eficaces para permitir el ingreso del *V. vulnificus*.

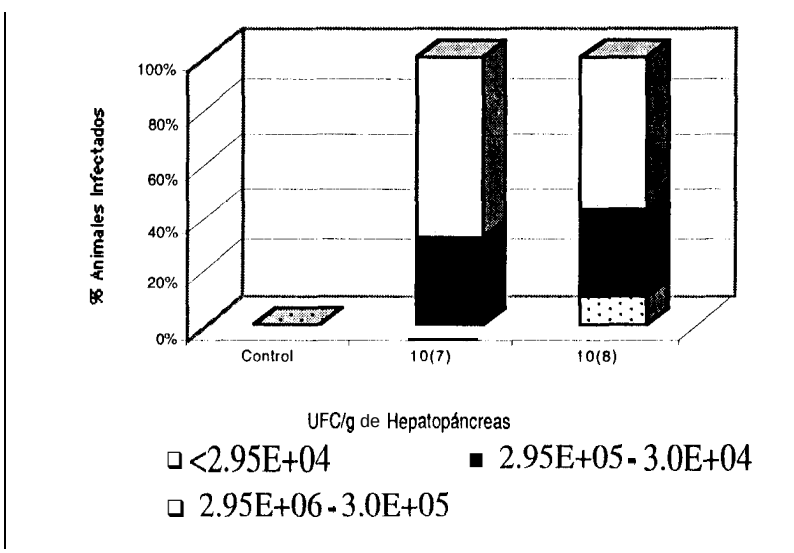


Figura 23. Porcentaje de animales infectados con *V. vulnificus* (S,) y recuperación de UFC/g. de hepatopáncreas, aplicando dos concentraciones de V. *vulnificus* en animales previamente desinfectados con 40 ppm de antibióticos. Control = tratamiento desinfectado .

A pesar de la recuperación de *V. vulnificus* a partir de animales infectados y de los daños histológicos presentes, no se observó signos externos, ni se presentaron mortalidades, pudiendo esto atribuirse a la corta exposición de las bacterias o a la edad de los animales, en efecto San Miguel (1996) observó mortalidades en dosis de 1E+04 y 1 E+06 UFC/ml por inmersión en larvas, más no en post larvas con la misma bacteria. Estos resultados estuvieron en concordancia con los obtenidos en infecciones experimentales en nauplios, mysis l-2, y larvas por Li *et al* (1996), donde por inmersión inoculó bacterias en dosis de 10^3 y 10' UFC/ml por 24 horas, observando mortalidades dependientes de la dosis, periodo de exposición y edad del camarón, habiendo resistencia a los vibrios en los estadios superiores.

3.2.3.3 Tercer experimento de infección

En este ensayo de infección se buscó encontrar la concentración de bacteria adecuada que desplazara la flora bacteriana remanente después de la desinfección permitiendo además infectar el 50% de los animales. Se descartó la DL50 (dosis letal para el 50% de los animales), por determinarse que esta bacteria sola, no es capaz de causar daños visibles ni la mortalidad en juveniles.

En la figura 24 se ilustra los resultados microbiológicos (UFC/g de hepatopáncreas) y el índice histológico. Como se puede observar la carga bacteriana fue superior en los animales infectados con las diluciones 10^4, 10^5 y 10^6. Los resultados histológicos revelaron patologías en los animales antes de ensayo, sin embargo este índice se incrementó, en los animales infectados con las diluciones 10^5 y 10^6.

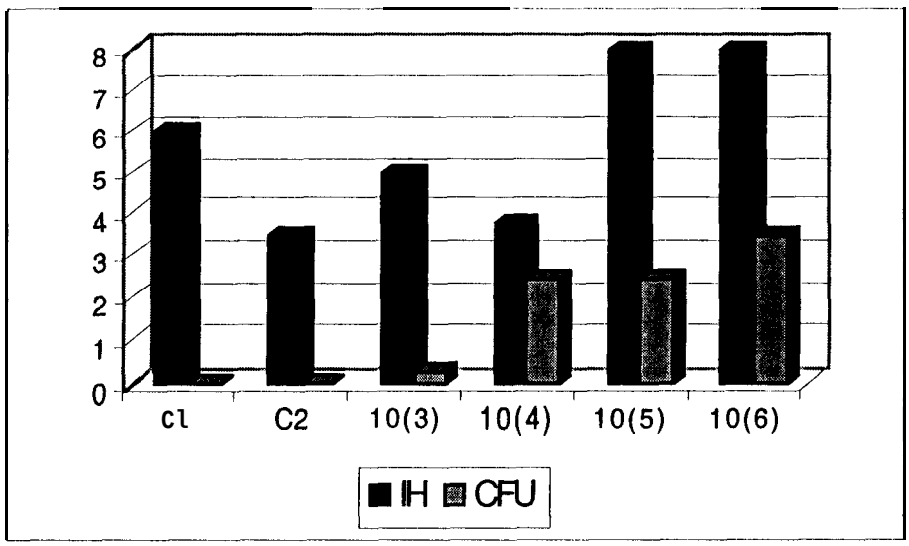


Figura 24. Indice histológico (I.H.) y UFC/g de hepatopáncreas (E+03) recuperadas, de animales sometidos a las concentraciones de $10^3, 10^4, 10^5$ y 10^6 bacterias/ml.

Las bacterias recuperadas de los animales infectados fueron identificadas como *V. vulnificus* por Dot blot y bioquímica. Se encontró diferencias significativas (p=0,043), en la carga bacterina entre los animales infectados y los animales del control desinfectados (C2), lo que indicó que la bacteria pudo colonizar e invadir los sitios libres dejados por el tratamiento antibiótico. En la figura 25 se observa el porcentaje de animales infectados sólo con *V. vulnificus*. Como se puede observar los animales fueron infectados desde la concentración de inóculo de 10^4. Sin embargo fue la concentración de 10^5 en la que se observó lesiones en los tejidos. La inoculación de 10^5 permitió recuperar mayor número de UFC que la inoculación 10^4 en el orden de 3E+02 a 2,9E+03.

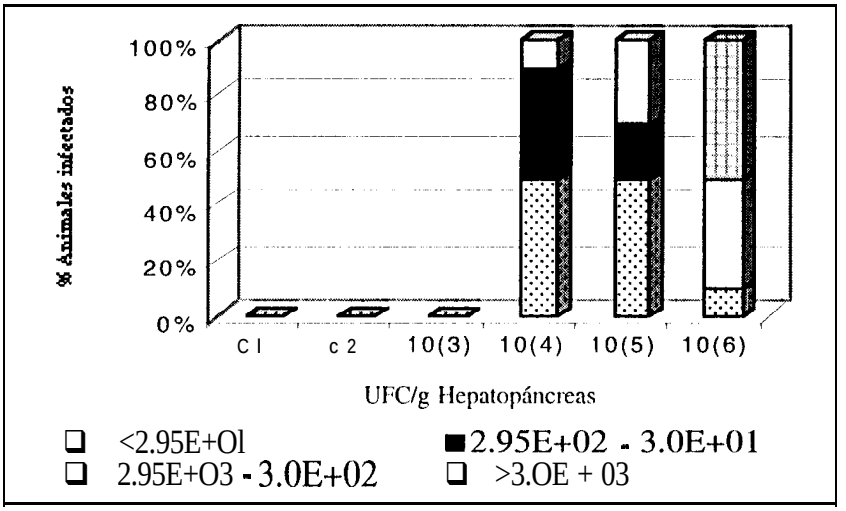


Figura 25. Porcentaje de animales infectados con *V. vulnificus,* y UFC/g. de hepatopáncreas, recuperadas en animales inoculados utilizando cuatro concentraciones bacterias.

Los conteos de UFC se realizaron en agar marino. Donde :

Cl= control sin desinfectar

C2 =control desinfectado

10^3= concentración de 10 000 b/ml

10^4 = concentración de 10 000 b/ml

10^5 = concentración de 100 000 b/ml

10^6= concentración de 1000 000 b/ml

3.2.3.4. Cuarto experimento de infección

Los datos obtenidos de la tercera infección experimental sirvieron para diseñar una cuarta infección similar a la anterior, pero en la cual se eliminó el inóculo correspondiente a la concentración 10^3, para aumentarse la concentración 10'.

Los animales utilizados en este ensayo estuvieron ya infectados con V. *vulnificus* desde el inicio (Cl). El tratamiento antibiótico hizo decrecer de manera significativa (p=0.043) el número de UFC a menos de 2.9E+03 (C2) (Figura 26). Como en el anterior ensayo se observó que las UFC de bacterias recuperadas fue mayor en los animales inoculados con mayor concentración de bacteria, siendo recuperables UFC de V. *vulnificus* a nivel de

hepatopáncreas desde la concentración 10". Sin embargo esto no fue real para la concentración de 10^7 de inóculo, no encontrándose diferencias significativas entre el número de UFC recuperadas de animales inoculados con 10^6 y 10^7. Como en el anterior ensayo las UFC recuperada en el orden de 10^3 estuvieron en relación con lesiones observadas en histopatología. (Figura 27 y 28).

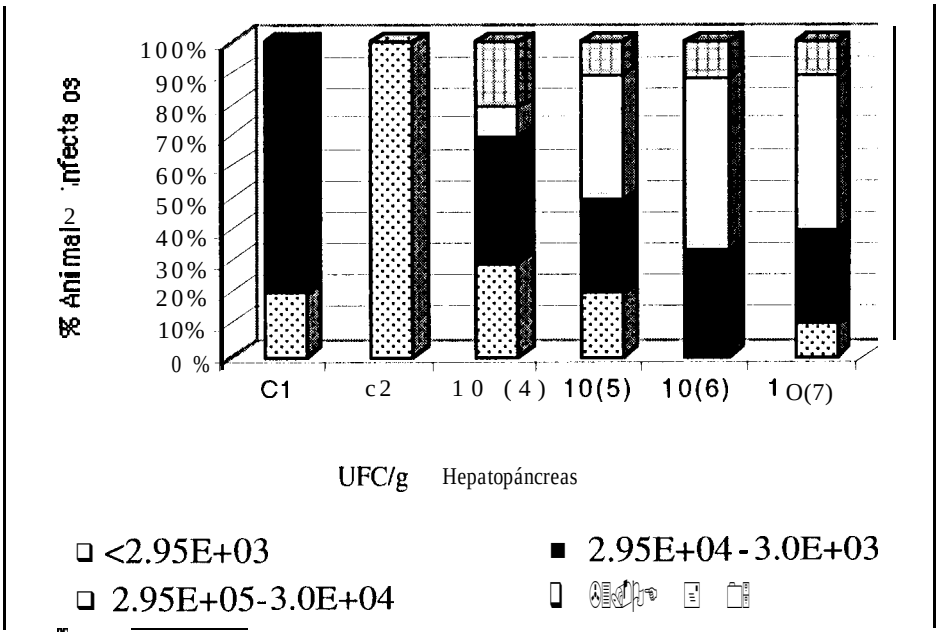


Figura 26. Porcentaje de animales infectados y UFC/g. de hepatopáncreas recuperadas en animales, luego de inocular cuatro concentraciones de *V. vulnificus*. Donde :

Cl= control sin desinfectar

C2 =control desinfectado

10^4 = concentración de 10 000 b/ml

10^5 = concentración de 100 000 b/ml

10^6 = concentración de 1000 000 b/ml

10^7 = concentración de 10000 000 b/ml

En este ensayo parecería que la bacteria fue más virulenta infectando y lesionando a los animales a concentraciones de 10^4 del inoculo, sin embargo no hay que olvidar que los animales estuvieron ya previamente infectados con *V. vulnificus* y que el tratamiento

antibiótico no alcanzó a eliminar totalmente la bacteria original.

Los resultados de los cuatro experimentos indicarían que el método de baño es más eficaz que la inyección, y que la concentración de inóculo de 10^5 se logra recuperar más de 10^3 UFC del 50% de animales coincidiendo con la visualización de lesiones en histopatología.

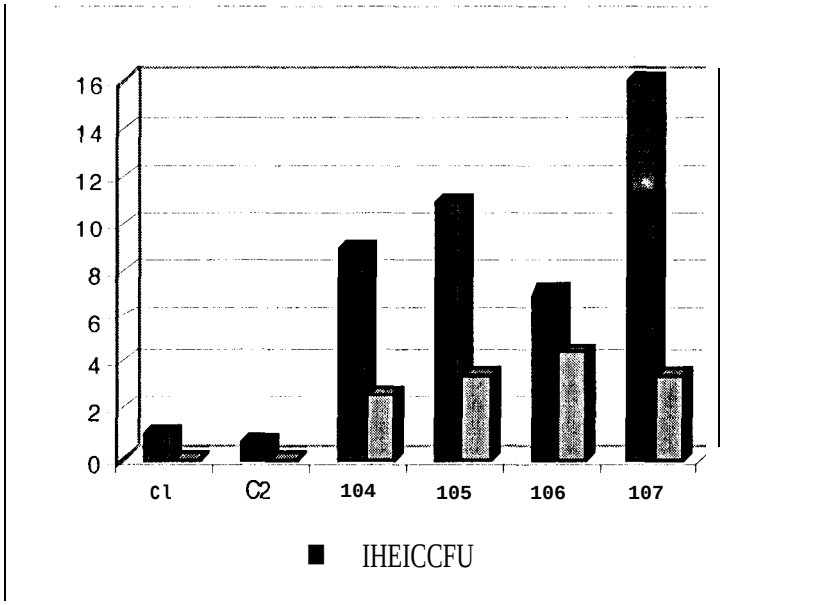


Figura 27. Indice histológico y UFC/g. de hepatopáncreas (E+05) de animales infectados con *V. vulnificus* con varias concentraciones de 10^4, 10^5, 10^6, y 10^7 bacterias/ml.

Figura 28. Observación histológica de hepatopáncreas con túbulos lisados y encapsulados, de un animal infectado con *V. vulnificus* en la concentración de 10^7bacterias/ml

A continuación se presenta el protocolo de infección experimental seleccionado luego de los resultados obtenidos.

3.2.3.5. Protocolo para infecciones en camarones iuveniles

1. Medios de cultivo

Agar LB para preparación de la bacteria.

Agar TCBS y agar marino para recuperación de la bacteria a nivel de hepatopáncreas.

Agar TSA para aislamiento e identificación bioquímica de la bacteria.

LB B para crecimiento y congelación de la bacteria.

2. Preparación de la cepa bacteriana

Para el cultivo de la cepa bacteriana utilizar el medio de cultivo líquido LB B al 2% con NaCl , sin glucosa (10 g. bacto triptona, 5g. extracto de levadura, 20g. NaCl, y pH 7.5).

Cepa utilizada el *Vibrio vulnificus*.

Sembrar en 50 ml de LB B por 4 horas una colonia de S_2, e incubar en baño maría por agitación a 30ºC, en agitación constante.

Repicar a un volumen de 450 ml de LB B al 2% de NaCl según las concentraciones de inóculos a usar. Deja r crecer por 8 -10 horas en baño maría con aireación con una temperatura no superior a 30°C. Si se necesita concentraciones de 10^7 - 10^3una fiola de 500ml con LB es suficiente.

Se recomienda centrifugar la bacteria después de 8 - 120 a horas de crecimiento por 10 minutos a 3.000 rpm., eliminar el sobrenadante, resuspendiéndolas en solución salina al *2%*.

Leer la D.O. de la solución diluyendo la misma cinco veces en.solución salina al 2%.

Realizar los cálculos correspondientes para determinar el volumen necesario para la concentración a utilizar.

3. Animales

Camarones de 4 - 8 gramos.

Desinfectar los animales con 40 ppm de oxitretaciclina hydroclorada y 40 ppm de cloranfenicol.

4. Diseño

Preparación del laboratorio

- Desinfectar el laboratorio (paredes, piso, techo, peceras, mangueras, filtros, tuberías).
- Mangueras y difusores: con los anteriores pasos, se procedió a esterilizar por calor a una temperatura de 121ºC, 12PSI por 15 minutos.
- Todas las tuberías de aire y agua deben ser abiertas por 15 minutos para la eliminación de agua y otros.
- Los filtros deben ser lavados con jabón y cloro antes de ser usados. Se recomienda taparlos con papel aluminio para evitar crecimiento de algas.

Todo la limpieza debe realizarse un día antes de la manipulación con animales, para permitir el debido secado de todo el laboratorio.

Tabla 14. Protocolo de desinfección en la sala experimental

Hora	Actividad
6:30am	Adecuación de la sala: Abertura de tubería de agua salada y aire por 5 minutos. Llenado de peceras hasta 60 litros de su capacidad.
7:15am	Colocación de antibióticos
7:25am	Peso y distribución de animales (10/pecera)
2-3pm	Alimentación

Tabla 15. Protocolo de infección en la sala experimental

Hora	Actividad
12 horas después de la desinfección	Con un 100% de recambio se añade en 20 litros de agua estéril la concentración de bacteria a inocular.
8-10 horas posterior	Alimentar
24 horas después	Realizar segundo baño.
12	Muestreo de 15 animales por tratamiento al azar

5. Técnicas de análisis

Microbiología

Histopatología

Bioquímica para identificación de bacterias

Dot - blot

AP - PCR

Tabla 16. Técnicas de análisis

Técnica	Forma de análisis
Microbiológico	Individual
Histológico	Individual
Conteo bacteriano	Total y por forma
Aislamiento bacteriano	Cinco animales por tratamiento, en todas sus formas posibles
Bioquímicas y Dot Blot	A todos los aislados
RAPDs	Cepas dudosas por su forma

Tabla 17. Diluciones recomendadas para análisis microbiológicos

Tratamiento	Agar Marino	Agar TCBS
Controles desinfectados	10^{-1} y 10^{-2}	10^{n} y 10^{-1}
Controles sin desinfectar	10^{-2} y 10^{-3}	10^{-1} y 10^{-2}
10^{3}	10^{-1} y 10^{-2}	10^{0} y 10^{-1}
10^{4}	10^{-1} y 10^{-2}	10^{0} y 10^{-1}
10^{5}	10^{-2} y 10^{-3}	10^{-1} y 10^{-2}
10^{6}	10^{-2} y 10^{-3}	10^{-1} y 10^{-2}
10^{7}	10^{-2} y 10^{-3}	10^{-1} y 10^{-2}
10^{8}	10^{-3} y 10^{-4}	10^{-2} y 10^{-3}

Las interacciones patógeno – huésped, son vinculadas con el medio donde se realizan estas relaciones, y con el estado y/o edad fisiológica del huésped. La existencia de carencias nutricionales, cambios extremos del medio, deficiencias de manejo de los cultivos, ayudan al establecimiento de los patógenos en los animales, al punto que estos microorganismo desarrollan patologías, y hasta la muerte del huésped. Nuestros resultados mostraron el ingreso de una bacteria (*V. vulnificus*) a diferentes concentraciones en animales previamente desinfectados, sin embargo estas concentraciones no provocaron mortalidades o signos externos clínicos de enfermedad, debido posiblemente a otros factores que no permitieron a la enfermedad causar daños en el camarón tales como buena nutrición y condiciones controladas de cultivo. Así por ejemplo en *P. stylirostris el Vibrio peneicida* es una bacteria altamente patógena capaz de causar mortalidades masiva en pocos días, pero esta patogenicidad se manifiesta sólo durante los periodos de cambios de temperatura y salinidad. El resto del año a pesar de estar presente en el medio y en los animales no provocaron ninguna patología.

Por otra parte el comportamiento de la bacteria dentro del animal, también está vinculada a la capacidad de eliminación o de limpieza del huésped. Así autores como Sung,(1996) utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta han estudiado la distribución del *V. vulnificus*, en los tejidos del camarón *P. monodon*, encontrando el antígeno en los tejidos a los 5 minutos de inmersión a nivel de plasma, hemocitos, branquias, estómago, tejido hematopoyético, intestino anterior e intestino posterior, pero no en el corazón ni en el órgano linfoide. Mientras que a las 6 horas posteriores a la inmersión se encontró la bacteria en el órgano linfoide y niveles altos en intestino y hepatopáncreas, manteniéndose relativamente presente hasta la 24 horas. Los órganos más susceptibles al ingreso de la bacteria, como branquias y estómago, carecieron de las mismas a los 7 días de la infección, manteniéndose un bajo nivel de bacterias en el órgano linfoide. Esto indicaría que el antígeno puede ingresar por dos medios: vía oral y vía circulatoria. Siendo posiblemente la vía anal otro medio de ingreso. Debe considerarse que la presencia en el órgano linfoide indicaría no sólo el grado de infección, sino tal vez la puesta en marcha de los mecanismos de limpieza, es de anotar que la literatura indica que este órgano estaría implicado en los mecanismos de limpieza del camarón.

Hameed (1995), demostró que la dosis y tiempo de mortalidad en experimentos con bacterias en tres tipos de Peneidos depende de la concentración y periodo de exposición a la bacteria, edad y especie de camarón. Observando en larvas y post- larvas mayor mortalidad. La mortalidad estuvo relacionada con el estadio del animal, ya que a la misma concentración de bacteria (10^4 b/ml) se redujeron las mortalidades al pasar los animales a estadios superiores.

De la Peña *et al.,* 1993 fide (De la Peña *et al.*,1995) por medio del método de inyección observaron camarones moribundos a una concentración de 10^3 b/ml, mientras que por baño necesitaron una concentración mayor para observar camarones moribundos a las 48 horas posteriores a la infección. Resultado que indicaría que la cantidad de bacteria que ingresa en el animal tiene incidencia en los daños ocasionados, así altas concentraciones de bacterias y su manera de ingreso pueden ser causa de mortalidades en animales con el

sistema inmunitario desarrollado. De la Peña 1993 también observó alta proliferación de bacterias en branquias y estómago al inicio de la infección entre las 3 y 6 horas de infección, empezando a desaparecer el patógeno desde las 8 y 12 horas. Pero 12 horas posterior al ingreso, las bacterias empezaron a presentarse en el hepatopáncreas y en el órgano linfoide. Encontrándose en todos los órganos excepto en branquias, y estómago 24 horas después. Sus resultados no concuerdan con los obtenidos en este trabajo, ya que en las infecciones *de V. vulnificus* en el *P. vannamei* el baño ,mostró ser un método eficaz , recuperándose pocas UFC con el método de inyección.

CIB ESPOL

Los resultados de De la Peña indica una distribución y acomodación de la bacteria en el organismo en varias etapas, como son: establecimiento, distribución, limpieza, multiplicación secundaria y sistemática infección. Siendo el estómago el primer lugar de establecimiento para posterior multiplicación y distribución por la hemolinfa a otros órganos como hepatopáncreas, órgano linfoide, intestino y músculo, además de directamente del estómago al hepatopáncreas e intestino. Por el contrario animales infectados en este trabajo (datos no mostrados) observados después de 7 días indicaron la ausencia de lesiones en hepatopáncreas, invasión de tejidos y otro tipo de lesión, lo que indicaría que el huésped mantenido en buenas condiciones es capaz de eliminar el *V. vulnificus*. Existiendo a las 8 - 12 horas de infección una clara evidencia de limpieza de los órganos, seguida de una multiplicación en el hepatopáncreas y órgano linfoide a las 12 horas, en intestino y músculo a las 24 horas, y en el estómago a las 36 horas. Iniciándose así una multiplicación sistemática en todos los órganos, mostrando en este caso que a pesar de la puesta en marcha de los mecanismos de limpieza el huésped es incapaz de controlar la infección.

La remoción de bacterias por la hemolinfa de camarón fue determinada por Martin et *al.*,1993 al inyectar bacterias en *Sicyonia ingentis*. Concordando con De la Peña que son las branquias los órganos mas susceptibles a la infección en los primeros minutos de exposición, seguido de la hemolinfa, habiendo una limpieza o remoción de la bacteria en

horas posteriores.

Pero la distribución y limpieza de la bacteria en el organismo, dependen también de la virulencia de la bacteria y de la especie (huésped). Ligthner,1983; *fide* (Martin et *al.*,1993) encontró que la *Aeromona viriduns* en camarón es eliminada rápidamente de la circulación, pero en la langosta *Homarus americanus* esta misma bacteria causa la enfermedad gakkemia.

Según Roque *et al.*, 1998, la vibriosis ocurre solo cuando el camarón es continuamente invadido por bacterias. En otras palabras para desarrollar un modelo de infección experimental, con el método de inoculación de bacteria por baño, se necesitan añadir un inóculo suficientemente concentrado que permita recuperar UFC de la bacteria inoculada y provocar lesiones en los tejidos del animal.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En ensayos de infecciones en camarones juveniles se debe considerar la interacción patógeno – huésped, proceso que vincula tanto a la capacidad de agresión del agente invasor (en este estudio bacteria) y a el sistema de defensa del huésped (camarón), junto a las condiciones ambientales.

En los resultados *in vitro* observamos que las bacterias en estado vivo activan los mecanismos de defensa del *P. vannamei* como el sistema fenoloxidasa , no estimulando la producción de radicales libres de oxígeno siendo insensible a la actividad antibacteriana del plasma, sistemas que responden dependiendo del tipo de bacterias usadas en la estimulación.

Al realizar las infecciones y enfrentar la interrelación *in vivo* de los animales con las bacterias, se pudo observar diferentes grados de ingreso dependiendo de la concentración administrada y su forma de administración, existiendo un límite de ingreso del *V. vulnificus*, al administrarse concentraciones de bacterias superiores al orden 10^7 a concentraciones de inóculo menor a 10^4 no se observaron lesiones a pesar de recuperarse UFC de V. *vulnificus* debido posiblemente a la limpieza realizada por los mecanismos que el animal utiliza, para no permitir mayores ingresos en sus órganos internos.

Más no se observó signos clínicos externos de patología causado por la bacteria, pero sí se encontró a nivel microbiológico, y se observaron lesiones en histología.

El grado de lesiones observadas guardó relación con el número de UFC de V. *vulnificus* recuperadas, habiendo relación entre la presencia de lesiones y UFC en el orden de 10^3.

La carencia de mortalidad en los ensayos de infecciones, pudo deberse a la falta de otros factores productores de estrés en los ensayos, ya que factores como salinidad y oxigeno estables, además de una buena dieta pudieron evitar un mayor grado de estrés para el animal, ayudando a los microorganismos a atacar más agresivamente o a aprovechar los cambios metabólicos y/o alteraciones internas del camarón.

Una segunda etapa de infecciones experimentales serían la aplicación de estresantes ambientales tales como cambios de temperatura, salinidad y oxígeno.

Para ensayos de análisis inmunitarios, donde se quiere evaluar las técnicas de inmunodiagnóstico, se recomienda que el animal debe ser lo menos estresado, tanto a nivel ambiental como de manipulación, ya que estas alteraciones también se medirían en la producción de radicales de oxígeno y fenoloxidasa, junto con las producidas por las bacterias.

Es por esto que el método de inyección no es aplicable para este objetivo de investigación (inmunología), ya que la misma introducción del contenido bacteriano puede romper el equilibrio homeostático que mataría al animal.

Es necesario experimentar nuevas cepas de bacterias reportadas como posibles causales de mortalidades en animales adultos, pues estas serían de mayor importancia, porque al estar causando daños, tienen la capacidad de evadir al sistema de defensa del camarón. En ensayos de infección-inmunológico, investigar la forma de interacción de este tipo de bacterias con el huésped, nos proporcionaría información para determinar por técnicas de inmunodiagnóstico anormalidades patológicas por bacteria con mayor rapidez, en los sistemas de producción.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Cámara Nacional de Acuacultura, 1999. Acuacultura del Ecuador, No 30. Abril - Mayo, 1999.

2. Adams, A., 1991. Response of peneid shrimp to exposure to Vibrio species. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 1, 59-70.

3. Amborski, R., & Glorioso, J., 1974. Factors influence the bacteria1 diseases of poikilothermic aquatic animals. Amborski, R., Hood, M., & Miller, R. (Eds). Gulf Coast Regional. Symposium on Diseases of Aquatic Animals. Center for Wetland Resources, Louisiana State University, 19-32.

4. Aono, H., Ochara, I., & Mori, K., 1992. Cell Type-specific role in the hemocyte clotting system of the sping lobster, ***Panulirus japonicus.*** Comp. Biochem. Phisiol. 1993. Vol. 105A. 1, 11-15.

5. Austin, B., & Austin, D., 1987. Bacteria1 fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Edt. Ellis Horwood Limited.

6. Bachère, E., Mialhe, E., & Rodríguez, J., 1995. Identification of defense effectors in the haemolymph of Crustaceans with particular reference to the shrimp ***P. japonicus*** (Bate): prospects and applications. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 5,597 - 612.

7. Bergey, 1994. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Noel R. Krieg (Edt). Editorial Williams & Wilkins. Baltimore/ London. Vol. 1.

8. Blake, P.A., Merson, M.H., Weaver, R.E., Hollis, D.G. & Hublein, P.C., 1979. Disease caused by a marine Vibrio - clinical characteristics and epidemiology. N. Engl. J. Medical. 300, 1-5.

9. Bush, C.A., Patel, P., Gunawardena, S., Powel, J., Joseph, A., Johnson, J.A., and Morris, J.G., 1997. Classification of *Vibrio vulnificus* strains by the carbohydrate composition of their capsular polysaccharides. Department of Chemistry & Biochemistry. University of Maryland Baltimore.

10. Calero, G., 1998. Enriquecimiento de agar Marino y TCBS con caldos de músculo y hepatopáncreas de camarón ***Penaeus vannamei.*** Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.

ll. Cedeño, V., 1988. Evaluación clínica de ensayos inmunitarios en el ***camarón Penaeus vannamei.*** Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador.

12. Chen, H., Hanna, P.J., 1994. Inmunodetection of specific Vibrios bacteria attaching to tissues of the giant tiger prawn ***Penaeus*** *monodon*. Diseases of Aquatic Organisms, Vol. 20, 159- 160.

13. Chisholm, J., & Smith,V., 1992. Antibacterial activity in the haemocytes of shore crab, ***Carcinus maenas.*** Journal Mar. Biol. 72, 529-542.

14. Chisholm, J., & Smith, V., 1995. Comparison of antibacterial activity in the haemocytes of different crustacean species. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 1 10,1, 39-45.

15. Christensen, B. M., Nappy, A.J., 1988. Immune Responses of Arthropods. Animal and plant Sciences, 15-19.

16. Colwell, R.R.,1984. En Vibrios in the environment. Colwell Rita R. (Ed). University of Maryland. A volume in Environmental Science and Technology.

17. Colwell, R.R., & Kaneko, T. 1974. Ecological studies of ***Vibrio parahaemolyticus***. Colwell R.R. and Mor-ita R.Y. (Eds). Effect of the ocean environments on microbial activities. University Park Press. Baltimore., 536 - 545.

18. De la Peña, L.D., Nakai, T., & Muroga, K., 1995. Dynamics of ***Vibrio sp.*** PJ in Organs of Orally Infected Kuruma Prawn, ***Penaeus juponicus.*** Fish Pathology. Vol. 30, 1, 39 – ***45.***

19. De la Peña, L.D., Tamaki, T.,& Momoyama, K., 1993. Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, ***Penaeus japonicus.*** Aquaculture. Vol. 115, 1 - 12.

20. Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Dorsselaer, A., Rodríguez, J., & Bachère, E., 1997. Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp ***Penaeus vannamei*** (Decapoda). Journal of Biological Chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Vol. 272, 45, 28398 – 28406.

21. Donoso, E., 1996. Producción de Anticuerpos Monoclonales y Desarrollo de una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como Probiótico. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.

22. Drlica, K., 1992. Knowledge DNA and Gene cloning. A guide for the curious, 15 - 105.

23. Echeverría, L., 1998. Desarrollo de un ensayo de cuantificación de la actividad Fenoloxidasa (PO) como una herramienta de inmunoevaluación del camarón *Penaeus vannamei*. Redacción técnica. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil - Ecuador.

24. Hameed, A.S.Sahul., 1995. Susceptibility of Three Penaeus Species to a *Vibrio campbellii* - like Bacterium. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 26, 3, 315-310.

25. Honrre, R., Marklein G., Schaal K.P., 1996. *Vibrio vulnificus*, an Emerging Human Pathogen. Institute of Medical Microbiology and Inmunology. University of Bonn, Germany.

26. Intriago, W., 1998. Problemas de aislamiento y caracterización de bacterias asociadas al síndrome de Zoea II y demostración experimental de su patogenicidad. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador.

27. Johansson, M.W., & Soderhall, K., 1989. Cellular Immunity in crustaceans and the proPO System. Parasitology Today. Vol. 5, 6.

28. Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., & Aquacop, 1997. Hematological and phenoloxidase activity with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 7,227 - 234.

29. Levinson, W., & Jawets, E., 1998. Microbiogía e inmunología: Autoevaluación y repaso. Lemus A. G. (Ed). Manual Moderno, S.A. de C.V., segunda edición.

30. Lightner, D.V., & Lewis, D.H., 1975. A septic bacteria1 disease syndrome of penaid shrimp. Marine Fisheries Review. Vol. 37 (5 - 6), 25-28.

31. Lightner, D. V., 1983. Diseases of cultured penaeid shrimp. Crustacean Aquaculture. Vol. 1, 289 - 320.

32. Lightner, D. V., 1988. A Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of Penaeid Shrimp.

33. Lightner, D. V., Bell, T.A., Redman, R.M., Mohney, L.L. 1992. A Review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/ shrimps of the Americas and Indopacific. Diseases in Asian Aquaculture 1. Shariff M., Subasinghe R.P.& Arthur J.R. (Eds), 57 - 80.

34. Lightner, D. V., Redman, R.M., Hasson, K., 1997. Diagnosis and description of some of the common pathogens affecting ***Penaeus vannamei*** and ***Penaeus*** stylirostriis. A.S.A., 3 - ***4.***

35. Litter, M., 1973. Farmacología: Experimental y Clínica. 4ta Edición. 3era. Reimpresión.

36. Litwin, C.M., Rayback, T.W., & Skinner, J., 1996. Role of catechol siderophore synthesis in ***Vibrio vulnificus*** virulence. Infection and Immunity. Vol. 64,7, 2834 - 2838.

37. Liu, P.C., Lee, K.K., & Chen, S.N., 1996. Pathogenicity of different isolates of ***Vibrio harveyi*** in tiger prawn, ***Penaeus monodon***. Applied Microbiology. Vol. 22,413 - 416.

38. Li, J., Li Y., Wang, X., Zang X., Feng, J., Qi Z., Ji, W., & Xu, H., 1996. Pathogenicity and Characteristics of ***Vibrio vulnificus*** Isolated from Hatchery-reared ***Penaeus chinensis*** Larvae. Dept. of Marine biology, Ocean University of Qing dao, Qindao, P. R. China.

39. Martin, G.G., Poole, D., Poole, C., Hoose, J.E., Arias, M., Reynol, L, McKrell, N., & Whang A., 1993. Clearance of bacteria injected into the haemolymph of the penaeid shrimp, ***Sicyonia ingentis***. Joumal of Invertebrate Pathology. Vol. 62,308 - 315.

40. Miyazaki, T., Jo, Y., Kubota, S.S. & Egusa, S., 1977. Histopathologic studies on vibriosis of the Japanese el ***Anguilla japonica.*** Fish Pathology. Vol. 12, 163 - 170.

41. Mohney, L.L., Lightner, D.V., Bell, T.A., 1994. An Epizootic of Vibriosis in Ecuadorian Pond - Reared ***Penaeus vannamei*** Boone (Crustacean: Decapoda). Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 25, 1, 116 -131.

42. Morales, I., 1992. Observaciones sobre el síndrome de descarnación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de ***Penaeus vannamei*** en Ecuador. Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuacultura. 18 - 23 octubre de 1992. Guayaquil, Ecuador.

43. Muñoz, M.,1996. Desarrollo y optimización de ensayos para evaluar el estado inmunitario al camarón ***Penaeus vannamei.*** Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil - Ecuador.

44. Norrell, S.A., Messley, K.E., 1997. Antibiotics and uses. Prentice - Hall de Brasil, Ltda, Rio de Janeiro Editorial, 302.

45. Perazzolo, L., & Barraco, M. 1997. Developmental & Comparative Immunology. Elsevier Science Ltd. A. Vol. 21, 5, 385 -395.

46. Peeters, M., & Rodríguez, J., 1999. Problemas bacterianos en la industria camaronera ecuatoriana, prácticas de manejo y alternativas de control. Mundo Acuícola. Fundación CENAIM – ESPOL. Vol. 5, 1, 13 -19.

47. Prayitno, S.B., Latchford, J.W., 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to Photobacterium and Vibrio. Effect of Salinity and pH on infectiosity. Aquaculture. Vol. 132, 105-l 12.

48. Roque, A., Gommez-Gil, B., Guerra, A.L., 1998. Standardization of three techniques for experimental vibrio infections in the marine shrimp ***Penaeus vannamei.*** Flegel TW (Ed) Advances in shrimp biotechnology. 109 - 203.

49. Salyers, A.A., & Whitt, D.D., 1994. Bacteria1 pathogenesis. A Molecular Approach. Department of Microbiology, University of Illinois, USA.

50. San Miguel, L. 1996. Caracterización de una bacteria probiótica en larvas de ***Penaeus vannamei*** y estudio in vivo de la interacción con una bacteria patógena. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.

51. Serrano, J., 1996. Optimización de un modelo experimental en larvas de camarón ***Penaeus vannamei,*** para el control de infecciones por ***V. haweyi*** (CEPA E22) mediante la utilización de ***Vibrio*** *alginolyticus* (CEPA III). Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.

52. Siavichay, K., 1997. Aplicación de nuevas técnicas para el seguimiento bacteriológico en un laboratorio de larva de camarón. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.

53. Sinderman, C.J., & Lightner. D.V., 1988. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Vol.17, 8.

54. Singleton, P., Sainsbury, D., 1993. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. Second edition, 82- 83.

55. Soderhall, K., & Cerenirus, L., 1992. Crustacean Immunity. Annual Rev. of fish Diseases, 3-23.

56. Solís, A. 1996. Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas de bacterias marinas asociadas al camarón. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil, Ecuador.

57. Song, Y., & Hsieh, Y., 1993. Immunoestimulación of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) haemocytes for generation of microbial substances: Analysis of reactive oxygen species. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 10, 3, 201-209.

58. Song, Y., Gheng, W., Wang, C., 1993. Isolation and characterization of ***Vibrio damsela*** infections for cultured shrimp in Taiwan. Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 61, 24-31.

59. Spira, W.M., Ahmed, Q.S., & Saeed, Y.A., 1981. Uptake of ***Vibrio cholerae*** biotype of el tor for contaminated water by water hyacinth. (Eichornia crassipes). Appl. Envirom. Microbiol. 42,550 – 554.

60. Sung H., Song Y., 1996. Tissue location of Vibrio antigen delivered by immersion to tiger shrimp ***(Penaeus monodon).*** Aquaculture. Vol. 145, 41 - 54.

61. Sung, H., Chang, H., Her, C., Chang, J., and Song, Y., 1998. Phenoloxidase Activity of Haemocytes Derived from *Penaeus monodon* and ***Macrobrachium rosenbergii.*** Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 7 1,26 – 33.

62. Tapia, F., 1996. Optimización de ensayos antibacterianos y estadíos sobre la inducción de a actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón ***Penaeus vannamei.*** Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.

63. Todar, K., 1997. Mechanisms of bacteria1 pathogenicity: Colonization and Invasion. University of Wisconsin Department of Bacteriology. Bacteriology at UW – Madison.

64. Todar, K., 1997. Mechanisms of bacterial pathogenicity: Principles of Host-Parasite. University of Wisconsin Department of Bacteriology. Bacteriology at UW – Madison.

65. Todar, K., 1997. Mechanisms of bacteria1 pathogenicity: protein toxins. University of Wisconsin Department of Bacteriology. Bacteriology at UW – Madison.

66. Wolfon, A & Hopper, C., 1989. Antibiotics: their use and abuse in aquaculture. World Aquaculture. Vol., 20, 2, 34- 43.

67. Wright, A.C., Simpson, L.M., and Oliver, J.D., 1981. Role if iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. Infect. Immun. 34, 503 - 507.

ANEXOS

ANEXO

Histología

1. Fijador Davidson

Alcohol etílico al 95%.	330 ml
Formol (al 37 - 39%).	220 ml
Acido acético glacial.	115 ml
Agua destilada (se puede usar también agua corriente).	335 ml

2. Preparación de la hematoxilina de Mayer

Los reactivos deben ser agregados en el siguiente orden:

Hematoxilina	1.0 g
Iodato de sodio	0.2 g
Alumbre de amonio o potasio	50.0 g
Acido cítrico	1.0 g
Hidrato de cloral	50.0 g
Agua destilada	1000 ml

Eosina - Floxina

Eosina Y (1%)	100 ml
Floxina B (1%)	10 ml
Etanol (95%)	780 ml
Acido ácetico glacial	4 ml

Microbiología

Medios para Bioquímica

Para un volumen de (40 ml):

OF

OF (OF Basal Medium)	0.376 g
NaCl,	0.600 g
Glucosa	0.400 g

NB

NB (medio nutritivo)	0.32 g

Arginina

Descarboxilasa	0.42 g
L-arginina	0.44 g
NaCl	0.80 g

Indo1

Agua de peptona	0.60 g
NaCl	0.80 g

VP

VP medium	0.68 g
NaCl	0.80 g

Citrato

Agar Citrato de Simmons	0.96 g

NaCl	0.40 g.

Orni tina

Descarboxilasa	0.42 g
L- ornitina	0.44 g
NaCl	0.80 g

Carbohidratos

OF	0.37 g
NaCl	0.60 g

0,4g c/u Carbohidrato: (L(+) Arabinosa, D+(+) Cellobiose, D (+) Mannose, Mannitol, Sucrosa, D (+) -Galactosa, D-Glucoronic Acid y D- Gluconic Acid Lactone.

Nota

Para los carbohidratos Arabinosa y Sucrosa.- se debe preparar una solución 10 X y esterilizarla por filtración (1g/40ml agua destilada).

Se preparan colocando 36 ml de H20 con otros ingredientes, esterilizar por 15 minutos a 121 ºC, entonces colocar 4 ml de la solución 10X.

Acido Gluconato y Acido Glucoronato.- se esterilizan a 110 ºC por 10 minutos a un pH 7,2 con Na (OH) 1 N, estabilizar con Hepes (5,7g/l de Hepes o 0,2g. de Hepes en 40 ml).

Inmunología

1. Medio de cultivo para la preparación de primocultivos.

-Solución salina modificada de Hank's

Sales de Hank's	100ml
Agua destilada	900ml
Hepes	2,6 g
Cloruro de sodio	190mM
PH	7,2

-Solución salina modificada de sales de Hank's 1 X (MHBSS 1X)

Sales de Hank's	100 ml
Agua destilada	900 ml
Hepes	2,6 g
Cloruro de Sodio	190 mM
Cloruro de Calcio	6 mM
Cloruro de Magnesio	13 mM
PH	7,2

-Solución salina modificada de sales de Hank's 2 X (MHBSS 2X)

Sales de Hank's	100 ml
Agua destilada	900 ml
Hepes	2.6 g
Cloruro de Sodio	190 mM
Cloruro de Calcio	12 mM
Cloruro de Magnesio	26 mM
PH	7,2

-Solución salina modificada de sales de Hank's 3 X (MHBSS 3X)

Sales de Hank's	100 ml
Agua destilada	900 ml
Hepes	2.6 g
Cloruro de sodio	190 mM
Cloruro de Calcio	18mM
Cloruro de Magnesio	39 mM
PH	7.2

Preparación bufer de electroforesis (TAE 50X)

Tris base	121.14 g
Acido Acético glacial	57.1 ml

Na2 EDTA (100 ml EDTA ph 8 0,5 M)	37.2 g
Agua destilada	1000 ml
PH	8.0 - 8.5

Tampon PBS (Bufer sodio fosfato) para (llitro)	pH: 7.4
Na Cl	8.0 g
KH_2HPO_4	0.2 g
Na_2HP04, 12 H_20	2.9 g

Tabla 18. UFC/ g. de hepatopáncreas, Indice histológico, densidad óptica de macerados de corazón y número de bacterias observadas por histología, de animales expuestos a varias concentraciones de antibióticos. (Segunda desinfección)

Tratamiento	Tiempo de exposición	UFC / ml (AM)	D.O. macerados de corazón 550nm	I.H.	No. de bacterias
Control	0	$8,61x10^7$	0,435	4.60	+++
Control	8	$6,61x10^7$	0,116		+++
Control	12	8,61x 10'	0,227	i4	+++
Control	24	$4,1x\ 10^6$	0,233	7	++
20	8	$3x10^8$	0,036	5	+++
20	12	$9,6x10^6$	0,035	1,70	+
20		$2,9x10^6$	0,100	8	+
20	24	4x10'	0,278	2	++
30	4	$2,9x10^6$	0,029	2	++
30	12 8	$2,9x10^6$	0,033 0,045	6	++ +
40	24	$2,9x10^6$	0,054	4,.	++
40	48	$2,9x10^6$	0,056 0,133	5.47	++
	12			3	+
40	24	$2,9x10^6$	0,049	10	+
40		$2,9x10^6$	0,026		++

Tabla 19. Observaciones microbiológicas y D.O. (55onm) de macerados de corazón. de animales expuestos a varias concentraciones de antibióticos.(Tercera desinfección)

Tratamiento	Tiempo de exposición	UFC / Hp (AM)	D.O. macerados de corazón 550nm
Control [b]	0	$6,6x10^4$	0,257
30 [a]	12	$3,7x10^4$	0,054
40 [a,]	12	$1,9x10^4$	0,080
30 [a,]	24	$3,4x10^4$	0,037
40 [a,]	24	$4.0x10^4$	0,047
30 [b]	48	$4.8x10^8$	0,138
40 [b]	48	$3,6x\ 10^4$	0,115

Tabla 20. UFC/g. de hepatopáncreas y densidad óptica de macerados de corazón de animales desinfectados con dos tratamientos de antibióticos, al tiempo 12 horas. (Cuarta desinfección)

Tratamiento	Tiempo de exposición	UFC / g. Hp (AM)	D.O. macerados de corazón 550nm
Control [a]	0	$2,66x10^4$	0,257
30 [b,a]	12	$1,88\ x10^4$	0,054
40 [b,a]	12	$1,44x10^4$	0,080

Tabla 21. Indice de histología y UFC/g. de hepatopáncreas recuperadas de animales infectados con *V. vulnificus,* con dos concentraciones de bacterias. (Segunda infección)

Tratamiento	Tiempo de exposición	I.H.	UFC/ g. de Hepatopáncreas
Control [c]	0	2,5	$1,22\ x10^6$
10^7 b/ml [b]	36 horas	8	$2,66x10^6$
10^8 b/ml [a]	36 horas	3	$2,11x10^6$

Tabla 22. Indice histológico y UFC/g. de hepatopáncreas, de animales infectados con cuatro dosis de bacterias de V. *vulnificus*. (Tercera infección)

Tratamiento	UFC/g Hepatopáncreas	I.H.
Desinfectados	0	3,5
No desinfectados	0	6,0
10^3	$2,8 \times 10^2$	5
10^4	$2,5 \times 10^3$	3,75
10^5	$2,5 \times 10^3$	8
10^6	3.5 x 10"	8

Tabla 23. Indice de histología y UFC/g de hepatopáncreas, de animales infectados con varias concentraciones de *V. vulnificus*. (Cuarta infección)

Tratamiento	I.H.	UFC/g Hepatopáncreas
C1	1,0	0
C2	0,7	0
10^4	9,0	$2,7 \times 10^5$
10^5	11,0	$3,5 \times 10^5$
10^6	7,0	$4,5 \times 10^5$
1 0 '	15.5	3.3×10^5