

639.543  
INTz



# ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA Y CIENCIAS DEL  
MAR

**“PROBLEMAS DE AISLAMIENTO Y  
CARACTERIZACION DE BACTERIAS ASOCIADAS AL  
SINDROME DE ZOEIA II Y DEMOSTRACION  
EXPERIMENTAL DE SU PATOGENICIDAD”**

TESIS DE GRADO  
Previa obtención del Título de:  
**ACUICULTOR**

Presentada por:  
**WALTER ERNESTO IINTRIAGO DIAZ**

GUAYAQUIL - ECUADOR

1998

## DEDICATORIA

A DIOS, a mis padres Walter y Matilde y a mi esposa Catherine,  
esto es por y para ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por estar siempre a mi lado y sostenerme en los momentos más difíciles de mi vida.

A mi querida esposa, mi gran compañera, por ser fuente inagotable de amor, ternura y estímulos en el desarrollo de mi carrera. Siempre te llevo dentro de mi corazón.

A mis padres, por su ayuda incansable y oportuna durante toda mi vida, por los grandes valores inculcados de lucha, sacrificio y honestidad a través de sus ejemplares vidas. Gracias por haberme dado la oportunidad de educarme hasta culminar mi carrera, cosa que en nuestro querido Ecuador es ya casi un privilegio. Los quiero mucho.

Al CENAIM y al Dr. Jorge Calderón, por haberme brindado la oportunidad de la realización de esta tesis.

A mi directora de tesis, Ac. María Teresa Zherdmant, por ayudarme y estar pendiente en el desarrollo de este trabajo, aportando en todo momento gran dedicación, responsabilidad y profesionalismo. Gracias por todo el apoyo y la amistad brindada.

Al Ac. Marcelo Muñoz, Jefe del Departamento de Epidemiología del CENAIM, por la gran colaboración en este trabajo. Su contagiante optimismo fue un factor importante para soportar algunos momentos difíciles de este trabajo.

Al Dr. Eric Louis Mialhe, por poner a disposición de esta tesis su gran experiencia científica. Gracias compañero.

Al Ing. Julio Macías, Gerente General de ACUATECSA, por donar el material biológico (nauplios) requeridos en las infecciones experimentales de este trabajo.

A Laboratorios Carrera Internacional, por su ayuda oportuna y desinteresada.

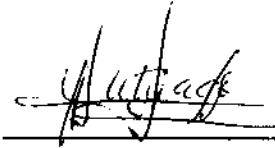
A mis grandes amigos: Ricardo, Javier, Gonzalo, Jorge, Leonardo, Marcelo, Jimmy, Ubaldo, Miguel, Mariuxi, Silvia, Mercedes, por su amistad y compañerismo incondicional durante toda mi vida universitaria. Personas como ellos, estoy seguro que serán un aporte significativo en el desarrollo del País.

A cada una de las personas que conformaron el CENAIM durante mi estadía, recuerden: *"Son los mejores amigos que he tenido en toda mi vida"*.

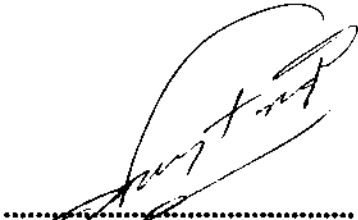
## DECLARATORIA EXPRESA

“ La responsabilidad por 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 Titulos profesionales de la ESPOL).

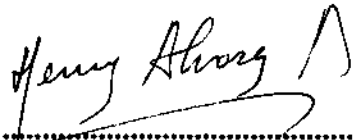


**Walter Ernesto Intriago Díaz**

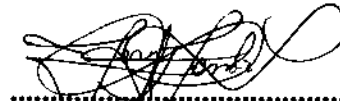


.....  
**Jorge Faytóng, Ing.**  
**Presidente del Tribunal**

*María Teresa Zherdmant*  
.....  
**María Teresa Zherdmant, Ac.**  
**Directora de Tesis**



.....  
**Henry Alvarez, Ac.**  
**Miembro del Tribunal**



.....  
**Jerry Landívar, M.Sc.**  
**Miembro del Tribunal**

## RESUMEN

Los laboratorios de camarón están sometidos de manera crónica a problemas de mortalidades cuyas etiologías son frecuentemente no identificadas. Sin embargo, las bacteriosis parecerían las más importantes ya que el síndrome de bolitas fue asociado a una vibriosis y el síndrome de zoea II parece también ser de naturaleza bacteriana.

El presente trabajo fue emprendido para aislar y caracterizar las bacterias asociadas al síndrome de zoea II y para analizar experimentalmente su patogenicidad frente a larvas de *Penaeus vannamei*.

Se realizaron dos estudios epidemiológicos, uno en situación de producción normal y el otro en el curso de mortalidades correspondientes al síndrome de zoea. En los dos casos se demostró que el medio TCBS, clásicamente utilizado en los laboratorios, es extremadamente “selectivo” y no permite obtener una representación de la flora bacteriana asociada a los camarones.

Por otra parte, se demostró que alrededor del 30% de bacterias no podrían ser identificadas en base a criterios bioquímicos que son utilizados clásicamente para la identificación de especies de vibrios, lo que sugiere que las bacterias asociadas a los camarones pueden presentar diferencias metabólicas resultantes de una adaptación a una vida parasitaria. La caracterización de tales cepas bacterianas fue posible en base a sus perfiles genéticos RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) obtenidos según la técnica de AP-PCR (Aleatory Primed-Polimerase Chain Reaction), lo que conduce a recomendar esta técnica para el diagnóstico.

Varias cepas bacterianas, no identificables bioquímicamente, aisladas de camarones mostraron ser patógenas para las larvas de camarones con una reproducción de los síntomas del síndrome de “zoea II”. Teniendo en cuenta las diferencias entre los perfiles

genéticos de estas cepas, es posible suponer que el síndrome está asociado a diversos genotipos bacterianos, como es conocido en bacteriología humana.

# INDICE GENERAL

|   |      |
|---|------|
| RESUMEN.....  | i    |
| INDICE GENERAL .....  | iii  |
| INDICE DE TABLAS.....   | v    |
| INDICE DE FIGURAS Y GRAFICOS.....   | vi   |
| INDICE DE FOTOS.....  | viii |
| ABREVIATURAS.....   | x    |
| <br>  |      |
| INTRODUCCION.....   | 1    |
| 1. ANTECEDENTES.....  | 3    |
| 1.1. Enfermedades bacterianas reportadas en larvicultura de camarones peneidos. | 3    |
| 1.1.1. Síndrome de bolitas.....   | 6    |
| 1.1.2. Síndrome de zoea II.....   | 8    |
| 1.2. Aislamiento e identificación bacteriana.....                               | 10   |
| 1.2.1. Aislamiento.....   | 10   |
| 1.2.2. Identificación bioquímica.....   | 13   |
| 1.2.3. Caracterización inmunológica.....  | 13   |
| 1.2.4. Caracterización genética por RAPD.....                                   | 17   |
| 1.3. Infecciones experimentales y naturaleza de bacterias.....                  | 18   |
| 1.4. Control de enfermedades.....   | 18   |
| 1.4.1. Antibióticos.....  | 18   |
| 1.4.1.1. Mecanismos de acción.....  | 19   |
| 1.4.1.2. Mecanismos de resistencia.....   | 22   |
| 1.4.2. Probióticos.....   | 25   |
| 2. MATERIALES Y METODOS.....  | 28   |
| 2.1. Material biológico.....  | 28   |
| 2.1.1. Animales.....  | 28   |
| 2.1.2. Anticuerpos.....   | 28   |
| 2.1.3. Aislados bacterianos.....  | 28   |
| 2.2. Metodología.....   | 29   |
| 2.2.1. Macerado de larvas.....  | 29   |
| 2.2.2. Técnicas bacteriológicas.....  | 29   |



|   |    |
|---|----|
| 2.2.3. Identificación bioquímica.....   | 30 |
| 2.2.4. Caracterización antigénica.....  | 35 |
| 2.2.4.1. Técnica de dot-blot.....   | 35 |
| 2.2.5. Caracterización genética.....  | 36 |
| 2.2.5.1. Técnica para la extracción de ADN de bacterias.....  | 36 |
| 2.2.5.2. Protocolo para la amplificación de ADN por medio de una<br>AP-PCR.....   | 37 |
| 2.2.5.3. Elaboración de un gel de electroforesis al 1.5% de agarosa.....  | 38 |
| 2.2.6. Metodología de patología experimental.....   | 39 |
| 2.2.6.1. Recepción de nauplios.....   | 39 |
| 2.2.6.2. Siembra y preparación de bacterias para infecciones experimentales   | 40 |
| 2.2.6.3. Infecciones experimentales.....  | 40 |
| 2.2.6.4. Análisis estadístico.....  | 41 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSION.....  | 42 |
| 3.1. Aislamiento e identificaciones bioquímicas de bacterias relacionadas con<br>síndrome de zoea II.....                                 | 44 |
| 3.2. Análisis de la patogenicidad de las cepas bacterianas.....   | 54 |
| 3.2.1. Optimización del protocolo de infecciones.....   | 54 |
| 3.2.1.1. Evaluación de desinfectante.....   | 54 |
| 3.2.1.2. Evaluación de antibióticos.....  | 55 |
| 3.2.2. Infecciones experimentales.....  | 56 |
| 3.2.2.1. Primera infección experimental.....  | 56 |
| 3.2.2.2. Segunda infección experimental.....  | 62 |
| 3.2.2.3. Tercera infección experimental.....  | 65 |
| 3.2.3. Comparaciones antigénicas de bacterias NIB causantes del síndrome de<br>zoea II y bacterias causantes del síndrome de bolitas..... | 67 |
| CONCLUSIONES.....   | 69 |
| RECOMENDACIONES.....  | 72 |
| ANEXOS.....   | 73 |
| BIBLIOGRAFIA.....   | 77 |

## INDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>TABLA 1.</b> Bacterias aisladas del laboratorio 1.....  | 45 |
| <b>TABLA 2.</b> Bacterias aisladas del laboratorio 2.....  | 48 |
| <b>TABLA 3.</b> Comparación de crecimiento de cepas NIB en medio comúnmente usados<br>..y agares enriquecidos.....   | 53 |
| <b>TABLA 4.</b> Prueba de desinfección de nauplios con Argentine.....  | 54 |
| <b>TABLA 5.</b> Muestreo bacteriológico después de la desinfección de los nauplios.<br>Evaluación de la sobrevivencia luego de los tratamientos.....   | 55 |
| <b>TABLA 6.</b> Infección experimental # 1. Concentración de bacterias en tratamientos $10^7$<br>UFC/ml. 36 horas de exposición. Estadio de infección zoea I. Concentración de algas:<br>50.000 cel/ml.. Recambio diario 100%..... | 57 |
| <b>TABLA 7.</b> Infección experimental # 2. Concentración de bacterias en tratamientos $10^7$<br>UFC/ml. 24 horas de exposición. Estadio de infección zoea I. Concentración de algas:<br>50.000 cel/ml.. Recambio diario 100%..... | 63 |
| <b>TABLA 8.</b> Infección experimental # 3. Concentración de bacterias en tratamientos $10^7$<br>UFC/ml. 24 horas de exposición. Estadio de infección zoea I. Concentración de algas:<br>50.000 cel/ml.. Recambio diario 100%..... | 66 |

## INDICE DE FIGURAS Y GRAFICOS

|   |    |
|---|----|
| <b>Fig. 1.</b> Tipo de infecciones según su localización. (Cortesía de Biotecnodata).....   | 4  |
| <b>Fig. 2.</b> Tipo de bacterias según su interacción con el huésped. (Cortesía de Biotecnodata).....   | 5  |
| <b>Fig. 3.</b> Técnica de dot-blot. (Modificado de Valenzuela, 1996).....   | 16 |
| <b>Fig. 4.</b> Principio de la AP-PCR. (Aleatory-Primed-Polimerase-Chain-Reaction) (Cortesía de Biotecnodata).....  | 17 |
| <b>Fig. 5.</b> Mecanismos de acción de los antibióticos. (Cortesía de Biotecnodata).....  | 21 |
| <b>Fig. 6.</b> Mecanismo de conjugación bacteriana para la adquisición de genes de resistencia a antibióticos.....  | 23 |
| <b>Fig. 7.</b> Transformación. Adquisición de un plásmido que contiene un gen correspondiente a un mecanismo de resistencia a antibióticos.....   | 24 |
| <b>Fig. 8.</b> Proceso de transducción. Adquisición de genes de resistencia a antibióticos por intermedio de un bacteriófago.....   | 24 |
| <b>Fig. 9.</b> Mecanismo de amplificación de resistencia a antibióticos por medio de transposones (secuencias de ADN capaces de trasladarse de un lugar a otro del genoma bacteriano y amplificar la capacidad de resistencia o patogenicidad)..... | 25 |
| <b>Graf. 1.</b> Porcentaje de bacterias identificadas bioquímicamente (laboratorio 1).....  | 46 |
| <b>Graf. 2.</b> Porcentaje de bacterias identificadas bioquímicamente (laboratorio 2).....  | 49 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Graf. 3.</b> Comparación de supervivencia y frecuencia de síntomas en los tratamientos de la infección # 1..... | 61 |
| <b>Graf. 4.</b> Comparación de supervivencia y frecuencia de síntomas en los tratamientos de la infección # 2..... | 64 |
| <b>Graf. 5.</b> Comparación de supervivencia y frecuencia de síntomas en los tratamientos de la infección # 3..... | 66 |

## INDICE DE FOTOS

- FOTO 1.** Perfiles RAPD de bacterias NIB aisladas de macerados de larvas del laboratorio 2..... 51
- FOTO 2.** Perfiles RAPD de bacterias NIB aisladas de macerados de larvas del laboratorio 1 y, de bacterias aisladas de pruebas de desinfección de nauplios con oxitetraciclina a concentraciones de 15 y 20 ppm ..... 51
- FOTO 3.** Perfiles RAPD de bacterias NIB aisladas de macerados de larvas del laboratorio 1 y 2..... 52
- FOTO 4.** Zoea II con las paredes de los lóbulos del hepatopáncreas normales. Larva proveniente de la botella 2 del tratamiento correspondiente a la bacteria IL1 ( $10^7$  bac/ml). Aumento 100X ..... 59
- FOTO 5.** Zoea I con las paredes del hepatopáncreas deformes. Larva proveniente de la botella 1 del tratamiento correspondiente a la bacteria L2.13 ( $10^7$  bac/ml infección 1). Aumento 100X..... 59
- FOTO 6.** Zoea II con una reducción ostensible del tamaño de los lóbulos del hepatopáncreas (marcados con línea), no se observan restos de alimento. Larva proveniente de la botella 2 tratamiento correspondiente a la bacteria L2.27 ( $10^7$  bac/ml). Aumento 200X..... 60
- FOTO 7.** Zoea II en donde casi no se puede notar el hepatopáncreas. El animal se presenta letárgico y solo se puede advertir lentos movimientos peristálticos de su intestino. Larva proveniente de la botella 2 del tratamiento de la bacteria L2.13 ( $10^7$  bac/ml infección 1). Aumento 100X..... 60

**FOTO 8.** Dot-blot de bacterias NIB, de las cuales se probó su patogenicidad. No se observa reacción positiva con los anticuerpos monoclonales 2C9 y 2B6 de E22 e IL1. Aunque se observa reacción en las bacterias L2.7 y L2.39, esta se debe a la producción de fosfatasa endógena ya que en los controles también se observan esta reacción..... 67

**FOTO 9.** Zoea II con síndrome de bolitas infectada con cepa E 22. Presencia de bolitas en el tracto digestivo. Infección 1. Aumento 200X..... 74

**FOTO 10.** Zoea II con síndrome de bolitas afectada con cepa E22. Presencia de bolitas dentro de los lóbulos superiores del hepatopáncreas. Infección 1 ..... 74

**FOTO 11.** Larva con típico síntoma asociado al síndrome de zoea II. Es muy difícil distinguir los lóbulos del hepatopáncreas por su reducido tamaño y deformación..... 75

**FOTO 12.** Larva con signos de síndrome de zoea II. Tan solo se puede distinguir un solo lóbulo y una mancha oscura,..... 75

## ABREVIATURAS

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| ADN                           | : Acido desoxiribonucleico                                      |
| AM                            | : Agar marino   |
| A.mus                         | : Agar músculo  |
| AP-PCR                        | : Aleatory Primed- Polimerase Chain Reaction                    |
| ARN                           | : Acido ribonucleico  |
| ARNt                          | : Acido ribonucleico de transferencia                           |
| BCIP                          | : 5-Bromo-4cloro-3Imdolyfosfato en 0.5 ml de dimethyl formamida |
| BHI                           | : Brain-Heart-Infusion agar                                     |
| Cl <sub>2</sub> Mg            | : Cloruro de magnesio   |
| E22                           | : Cepa de <i>V. harveyi</i>                                     |
| EDTA                          | : Etilén diamino tetra-acético                                  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : Peróxido de hidrógeno   |
| ILI                           | : Cepa de <i>V. alginolyticus</i>                               |
| Na(OH)                        | :Hidróxido de sodio   |
| NII-III                       | :Nauplio en estadio 2 a 3                                       |
| NV                            | :Nauplio en estadio 5   |
| NBT                           | : Nitro Blue Tetrazolium  |
| NIB                           | :No Identificable Bioquímicamente                               |
| PCR                           | : Polimerase Chain Reaction                                     |
| PBS                           | : Tampón fosfato salino   |
| ppm                           | : partes por millón   |
| RAPD                          | : Ramdom Amplified Polymorphism DNA                             |
| RPM                           | : Revoluciones por minuto                                       |
| TAE                           | : Tris Acido acético  |
| Taq                           | : Thermus aquaticus acido desoxiribonucleico                    |
| TE                            | : Tris EDTA   |
| TCBS                          | : Thisulfate-Citrate-Bile-Salts and Sucrose Agar                |
| TSA                           | : Triptyc Soy Agar  |
| UFC                           | : Unidades formadoras de colonias                               |
| V                             | : Vibrio  |
| ZI                            | : Zoea I  |
| ZII                           | : Zoea II   |

- Z111 : Zoea III
- 2B6 : Anticuerpo monoclonal para cepa IL1
- 2C9 : Anticuerpo monoclonal para cepa E22



## INTRODUCCION

El acelerado crecimiento de la industria camaronera del Ecuador y las fluctuaciones cuantitativas espacio-temporales de larvas provenientes del medio natural, trajo como consecuencia que este sector empezara a ver la necesidad de contar con instalaciones de producción de este recurso que le permitiesen un seguro aprovisionamiento durante todas las épocas del año. Así, empezó una masiva construcción de laboratorios a lo largo de la costa, convirtiéndose en la actualidad como una actividad muy importante para la sustentabilidad de una de las industrias que más generan divisas al país.

Desde los inicios la eficiencia de los laboratorios ha sido afectada por la presencia de varias enfermedades, siendo las de origen bacteriano las más comunes y las que más pérdidas han ocasionado.

En 1987, se presentó una enfermedad denominada "síndrome de bolitas" que se caracterizaba por la descamación de las células del epitelio intestinal y que se atribuyó a cepas ( S2 y E22 ) de *Vibrio harveyi* (Morales, 1992; Aráuz, com Pers.), lo que luego fue corroborado gracias a los trabajos realizados por San Miguel (1996) y Serrano (1996) mediante patología experimental.

A partir de 1995, los laboratorios de larvas comenzaron a reportar problemas de mortalidades en el estadio de zoea II, las larvas presentaban anorexia, letargia, rápida evacuación de heces fecales; y, reabsorción y atrofia del hepatopáncreas. Por presentarse esta enfermedad en este estadio larvario en particular se la conoce como síndrome de zoea II.

Por el hecho de no tener suficiente conocimiento, por una parte de las bacterias patógenas y por otra de las bacterias probióticas, se ha venido utilizando como estrategia para el control de estas enfermedades la adición rutinaria de antibióticos sin tomar en cuenta si efectivamente hay presencia de bacterias patógenas y si la dosis de antibiótico es bactericida o solamente bacteriostática, lo que puede conducir a problemas de resistencia. De hecho la bacteriología del camarón está a un nivel muy limitado, tanto del punto de vista conceptual como tecnológico.

Así, falta información sobre la conveniencia de los medios de aislamiento y de identificación bioquímica actualmente disponibles para bacterias asociadas al camarón, lo que podría conducir a graves errores en técnicas de epidemiología bacteriana. Subsecuentemente a estos problemas de aislamiento e identificación de las bacterias asociadas a camarón hay la necesidad de determinar la naturaleza patógena mediante pruebas de patología experimental.

El presente estudio tiene como objetivo el empleo de adecuadas herramientas de aislamiento y caracterización de bacterias asociadas a episodios de Síndrome de zoea II y la posterior demostración experimental de su patogenicidad. Con esto se tendrá un panorama más claro acerca de los próximos pasos encaminados al desarrollo de técnicas de detección y posibles tratamientos dirigidos a la eliminación de este síndrome.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 ENFERMEDADES BACTERIANAS REPORTADAS EN LARVICULTURA DE CAMARONES PENEIDOS

Una de las causas que más ha influido negativamente en el rendimiento de la industria del cultivo de camarón, ha sido la presencia de enfermedades provocadas principalmente por agentes bacterianos. Se ha determinado que desde los primeros estadios larvales de zoea, los animales absorben bacterias que se encuentran en el medio, las mismas que son importantes como fuente de alimentación y como posibles fuentes de enzimas para la digestión y asimilación del alimento. Se supone que diferentes poblaciones bacterianas se suceden desde los estadios zoea y post-larva hasta los estadios adultos (Yasuda y Kitao, 1980).

Las interacciones entre camarón y bacteria son probablemente modificadas en un laboratorio de producción, de hecho se trata de un ecosistema artificial, en donde por sus características se instala una microflora diferente a la del medio marino natural. Las poblaciones bacterianas de tipo natural dan paso a una microflora de regeneración, característica de los medios ricos en materia orgánica (Martín, 1977 *fide* San Miguel, 1996). La utilización de antibióticos también altera la microflora de los tanques y de las piscinas, pues puede provocar una reducción de la diversidad bacteriana que puede ser en detrimento de ciertas bacterias favorables y contribuir así al desarrollo de bacterias patógenas hasta el punto de favorecer fuertemente estas últimas (Le Bitoux, 1988). Además la alta densidad de camarones influye sobre las poblaciones de bacterias en los sitios de cultivo.

Las infecciones bacterianas en camarones, pueden corresponder a tres tipos de localizaciones: un tipo puede estar presente en la superficie del cuerpo (1)(sobre la

cutícula); el segundo (2), localizado en el tubo digestivo asociado a fenómenos de diarrea; y un tercero intracorporal que resulta de la penetración de las bacterias a través de la cutícula o el epitelio digestivo, lo que corresponde a una septicemia (3). (Lightner y Lewis, 1975). (Fig. 1)

En lo que concierne a la presencia de bacterias extracorporales e internas del tracto digestivo, se debe considerar la posibilidad de tratarse de situaciones normales o anormales con bacterias patógenas o no patógenas. La septicemia corresponde a una situación anormal, pudiendo las bacterias ser patógenas u oportunistas cuya penetración fue facilitada por otra bacteria (Fig. 2).

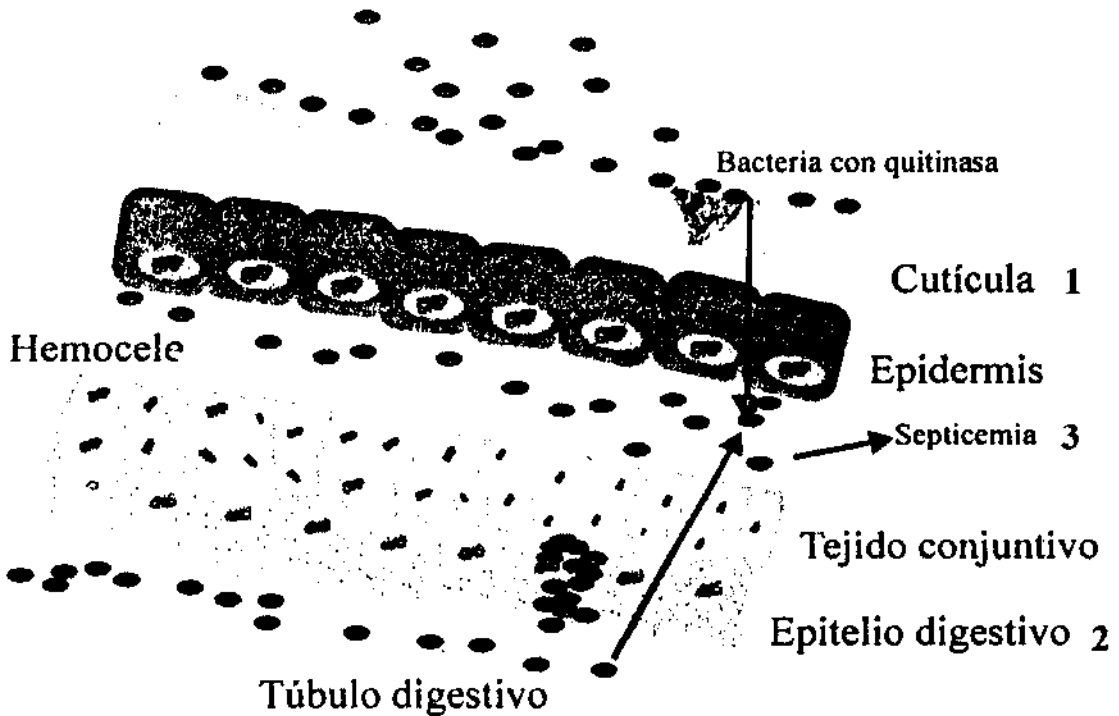
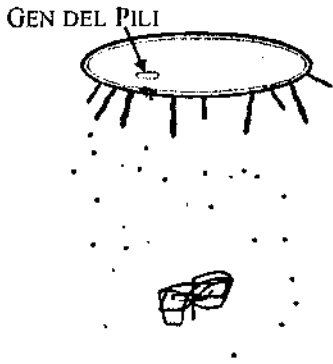


Figura 1.- Tipos de infecciones según su localización (Cortesía de Biotecnodata).

## Bacterias Probióticas

Facilitan la digestión de los alimentos favoreciendo la producción de los micronutrientes esenciales para el camarón



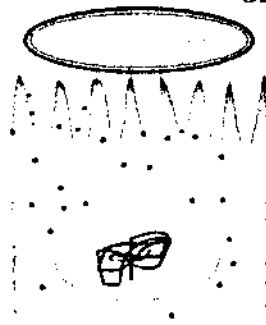
Efecto positivo para el camarón

## Bacterias Oportunistas

"Parásito" que está a la espera de una situación favorable.

Obtiene sus nutrientes y se alimenta de los alimentos o de las células destruidas del camarón.

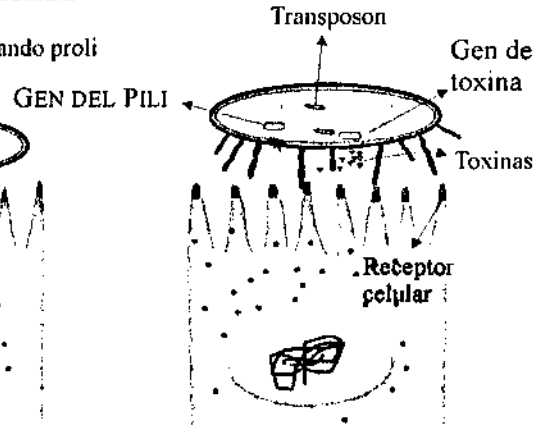
Pueden dañar al camarón cuando proliferan en el medio



Efecto neutro que puede ser negativo cuando existe una proliferación bacteriana

## Bacterias Patógenas

Adaptado a matar las células del camarón como fuente de nutrientes



Efecto negativo para el camarón

Figura 2.- Tipos de bacterias según su interacción con el huésped (Cortesía de Biotecnodata).

Considerando estos tres tipos de infecciones, bacterias aisladas de larvas enfermas han sido identificadas frecuentemente como miembros del grupo de vibrios (Egidis, 1987 *vide* Hameed. A.S. Sahul, 1995). Se han determinado como asociadas al camarón aproximadamente veinte especies de vibrios identificadas bioquímicamente como: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. damsela*, *V. fischeri*, *V. fluvialis*, *V. furnisii*, *V. harveyi*, *V. hollisae*, *V. logei*, *V. marinus*, *V. nereis*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagius*, *V. penaeicida*, *V. splendidus I*, *V. splendidus II*, *V. tubiashii*, *V. vulnificus* (Solís, 1996). De estas especies de vibrios, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V.*

*parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. vulnificus* han sido catalogados como patógenos en camarones peneidos (Vanderzant et al., 1970, Lightner and Lewis, 1975, 1983 and 1988, Takahashi et al., 1984 and 1985 *vide* Hameed, A.S. Sahul, 1995).

### 1.1.1 Síndrome de bolitas

Las primeras mortalidades atribuidas a esta enfermedad causando grandes problemas tanto en *P. vannamei* como en *P. stylirostris* fueron observadas a mediados de 1987 por el equipo de biólogos de INBIOSA y patólogos de IFREMER (Criado 1988; Morales I., 1992; Bell T. A & Lightner D.V., 1991).

La incidencia del síndrome es mayor durante los estadios de post-larva, pero se han reportado mayores mortalidades cuando se presentan en estadios más jóvenes como zoea y mysis, pudiendo llegar a perderse el 90 % de la población en 24 horas (Morales I., 1992).

Los signos clínicos observados en un microscopio óptico corresponden a una descamación de las células epiteliales del hepatopáncreas e intestino, apareciendo estas células con aspecto globular lo que originó el nombre síndrome de bolitas. Los animales no se alimentan y esto se observa hasta poco antes de la muerte que ocurre rápidamente (Morales I., 1992).

Con microscopía fotónica y electrónica de transmisión se comprobaron la ausencia de hongos, protozoos y agentes virales en el tracto digestivo, mientras que se encontraron grandes cantidades de bacterias fácilmente observables sobre frotis del intestino teñidos con naranja de acridina. (Criado Fornelo *et al.*, 1988).

Las bacterias aisladas de macerados de larvas afectadas con síndrome de bolitas aparecen sobre el medio TCBS como colonias verdes y fueron identificadas bioquímicamente como *V. harveyi*, siendo la cepa S2 considerada como referencia del agente causal de síndrome de bolitas. Al mismo tiempo en muestras de larvas sanas no se observaron estas bacterias, al menos de manera predominante (Morales I., 1992).

En 1994 algunas cepas bacterianas fueron aisladas de macerados de larvas que presentaron síntomas del síndrome de bolitas en un laboratorio de la Península de Santa Elena. Algunos aislados fueron identificados bioquímicamente como *V. harveyi*, en particular la cepa E22 (Jenny Aráuz com pers., 1994).

Dada la importancia de esta enfermedad y las limitaciones de la identificación bioquímica para distinguir cepas al nivel infraespecífico, se han preparado anticuerpos monoclonales contra la cepa S2 (Mendoza com. Pers., 1996) y se han realizado trabajos sobre la caracterización genética de esta bacteria, en base a marcadores moleculares de tipo RAPD (Motte E., 1996). Las comparaciones de las cepas S2 y E22, en base a estos dos tipos de marcadores, condujeron a considerarlas como similares pero reconocibles por la presencia de una banda suplementaria en el perfil RAPD de E22. Estudios de patología experimental permitieron reproducir con las dos cepas, E22 y S2, los síntomas asociados a esta enfermedad. Además, se hicieron estudios dirigidos a la prevención de la enfermedad en base a la precolonización del tracto digestivo de larvas de camarón con la cepa IL1 considerada consecuentemente como probiótica, lo que condujo a una nueva estrategia para el control de esta enfermedad. (San Miguel, 1996; Serrano, 1996).

### 1.1.2 Síndrome de Zoea II

En los últimos años un nuevo problema ha afectado a los laboratorios de larvas a lo largo del continente americano. Esta enfermedad provoca fuertes mortalidades larvales, principalmente en los estadios de zoea II, siendo éste es el motivo por el cual esta enfermedad fue denominada "síndrome de zoea II". Información sobre este problema aún es escaso y esencialmente se basa en las experiencias de los productores de larvas de camarón. El síndrome de zoea II, afecta a larvas de las dos especies de camarón más cultivadas en América: *P. vannamei* y *P. stylirostris*, siendo esta última menos sensible. No hay reportes de que este síndrome haya sido encontrado en otras especies de camarón (Juárez L., 1997).

Generalmente cuando se ha presentado el síndrome, los nauplios sembrados en los tanques de larvicultura presentan una apariencia y actividad normales hasta que pasan a zoea I en donde comienzan a alimentarse normalmente. Los síntomas comienzan a hacerse evidentes a las 36 y 48 horas después de la muda a zoea II. Una interrupción en la alimentación (anorexia) es muchas veces precedido de una rápida evacuación del contenido intestinal de los animales que presentan letargia, nadan erráticamente, pierden su normal pigmentación, y mueren por inanición, encontrándose entonces en el estadio Z-II (Juárez L., 1997).

Además, es importante indicar que se ha reportado frecuentemente episodios de síndrome de bolitas y zoea II en asociación. Se encontró también similitud en los perfiles genéticos de tipo RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) producidas por AP-PCR (Aleatory Primed-Polimerase Chain Reaction) a partir del ADN de la cepa S2, causante del síndrome de bolitas y de cepas aisladas de larvas enfermas con síndrome de zoea II (Siavichay, 1997).



Exámenes al microscopio de las larvas enfermas demuestran signos de atrofia del hepatopáncreas, ausencia o reducción del contenido intestinal e inflamación de las paredes del tracto digestivo. En cortes histológicos, pueden ser definidos cuatro tipos de lesiones en muestras de animales enfermos (Pantoja *et al.*, 1997). El primer tipo, tal vez el más frecuentemente observado, consiste en niveles bajos de vacuolas en el citoplasma de las células epiteliales de los tubos del hepatopáncreas, lo cual va acompañado de una atrofia del músculo esquelético a varios niveles. El segundo tipo de lesión, se caracteriza por necrosis idiopática con la presencia de núcleos picnóticos e imagen de cariorresis en el epitelio cuticular, subcuticular, cordón nervioso ventral y células regulares de los ojos. En el tercer tipo de lesión puede ser reconocida la presencia de material finamente granuloso en el citoplasma de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas. Finalmente, en el cuarto tipo de lesión hay proliferación bacteriana. (Pantoja *et al.*, 1997).

Es particularmente importante indicar que al nivel de tanques de producción con larvas enfermas se puede observar animales con síntomas típicos de síndrome de zoea II, animales con síndrome de bolitas y animales con los dos tipos de síntomas, es decir presencia de células descamadas en forma de bolitas y atrofia aguda del hepatopáncreas.

Estas observaciones sugieren que los dos tipos de síntomas corresponden de hecho a diversas formas de una misma enfermedad, pudiendo el síndrome de zoea II corresponder a una forma más virulenta que el síndrome de bolitas.

Muchos tratamientos han sido usados en intentar prevenir o reducir los problemas asociados con el síndrome de zoea II.

Los secados de las instalaciones de los laboratorio parecen eficaces a la condición de hacer un solo ciclo de producción entre cada operación de secado. Así algunos

laboratorios intentan llenar todos los tanques simultáneamente a fin de obtener rápidamente todas las larvas al estadio zoca II. El síndrome parece también controlable con el uso de probióticos mientras que los antibióticos son menos confiables debido a fenómenos de resistencia. El tratamiento de los nauplios con Argentine® (Complejo de Iodo), a varias concentraciones reveló ser poco eficaz debido a la contaminación ulterior (Juárez L., 1997).

## 1.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION BACTERIANA

### 1.2.1. Aislamiento.

El aislamiento bacteriano consiste en obtener colonias provenientes de un solo tipo de bacteria. En la práctica se lo realiza tomando una pequeña cantidad de la muestra con la punta de un asa de platino y sembrándola en una caja Petri que contenga medio sólido.

La composición exacta para obtener un medio satisfactorio va a depender de los requerimientos de la bacteria que necesitan de fuentes de energía, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, oxígeno y varios minerales para mantener su metabolismo. En lo que concierne al concepto de bacterias patógenas, éstas pueden tener deficiencias metabólicas en relación con la adaptación parasitaria, por ejemplo puede existir la necesidad de algunos tipos de micronutrientes como nucleótidos, vitaminas o cofactores enzimáticos.

Además de una adecuada fórmula de nutrientes, los medios de cultivo líquidos o sólidos deben permitir la fácil recuperación de las bacterias. Los medios sólidos generalmente son utilizados para aislar bacterias a partir de muestras, mientras que los medios líquidos sirven para cultivar cepas puras.

Los medios de cultivo sólidos deben su consistencia generalmente a una sustancia conocida como agar. El agar es un polímero sulfatado que está compuesto principalmente de D-galactosa, 3,6-anhydro-L-galactosa y ácido D-glucurónico que es extraído de las algas rojas.

Los medios de cultivo generales son medios no selectivos adecuados para una gran variedad de microorganismos, mientras que los medios selectivos favorecen el crecimiento de microorganismos particulares. Por ejemplo, la adición de sales biliares y tintes como la fucsina básica y el cristal violeta tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positiva sin afectar el crecimiento de algunas bacterias Gram-negativas. También se puede seleccionar bacterias en base a la capacidad específica de metabolizar nutrientes. Por ejemplo, un medio que contenga tan solo celulosa como fuente de carbono y energía, es adecuado para aislar bacterias consumidoras de celulosa.

Los medios diferenciales son medios que distinguen entre diferentes grupos de bacterias y además permiten una identificación tentativa de los microorganismos basados en sus características biológicas. Estos medios diferenciales poseen en su fórmula componentes que han sido definidos considerando las características metabólicas de la bacteria que se desea aislar en particular, como en el caso de los medios diferenciales para *Vibrio proteolyticus* y *Vibrio harveyi* (Muniensa-Pérez, Jofre M. y Blanch A.R. 1996; Lachlan H., Owens L., y Smith S., 1996).

Entre los medios utilizados para aislar bacterias presentes en cultivos de camarón están los medios selectivos o enriquecidos, los cuales satisfacen las demandas fisiológicas más o menos específicas de un grupo de microorganismos. Entre los medios de aislamiento utilizados en el cultivo de camarón están el TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile

Salts and Sucrose Agar), TSA (Tryptic Soy Agar), Agar Marino y algunos recientemente desarrollados con extracto de músculo de camarón (Calero, 1998).

### **Agar Marino**

El medio Agar Marino es recomendado para cultivar bacterias marinas heterótrofas. Este medio, preparado de acuerdo a la fórmula de ZoBell contiene peptonas, extracto de levadura como fuente de micronutrientes y minerales que se asemejan en gran manera a la composición mineral del agua de mar.

### **Agar TCBS**

El agar TCBS (thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar) es utilizado en bacteriología humana para el aislamiento selectivo y cultivo de *Vibrio cholerae* y otros vibrios enteropatógenos. Este medio es preparado de acuerdo a la fórmula de Kobayashi, Enomoto, Sakasaki y Kuwabara. Fue demostrado que el medio TCBS permite también el crecimiento de varios vibrios, por ejemplo: *V. parahaemolyticus*. Mientras que algunas cepas de *V. tubiashii* y *V. vulnificus* no pueden ser aisladas sobre este medio. Otras bacterias entéricas, como las coliformes y *Proteus* son generalmente inhibidos en este medio, aunque algunas cepas de *Proteus* y enterococos pueden crecer sin color y en forma de pequeñas colonias (Difco, 1984).

### **Enriquecimiento de agares TCBS y AM con caldo de músculo de camarón.**

Los medios TCBS y AM fueron elaborados para la bacteriología médica y marina, dejando al descubierto la necesidad de trabajos encaminados a la elaboración y optimización de medios específicos de bacterias asociadas al camarón.

Calero (1998) realizó trabajos dirigidos al enriquecimiento de los medios previamente citados, TCBS y agar marino, con caldos de extracto de músculo y hepatopáncreas de camarón. La adición de caldo de músculo en el medio agar marino reveló ser de mucha utilidad para la cuantificación de *V. alginolyticus* ya que las colonias se desarrollan de manera compacta e individualizadas y no de manera extendida y amontonada, como es el caso sobre el medio agar marino (Calero, 1998).

En base a identificaciones bioquímicas de bacterias aisladas sobre los medios agar marino o agar músculo (Mus-Agar-SS), fue demostrada la equivalencia en términos de la variedad de las bacterias aisladas.

La comparación entre el medio TCBS y su derivado con extracto de músculo (TCBS E) reveló una menor selectividad de este último, siendo bacterias Gram-positivas y bacterias del género *Photobacterium* aislables.

Finalmente, fue establecido que el medio TSA (Tryptic Soy Agar) es relativamente selectivo, probablemente debido a la falta de micronutrientes que son aportados generalmente por el extracto de levadura en diversos medios. Este componente debería ser considerado en la elaboración de medios ya que tal extracto constituye una excelente fuente de nucleótidos y oligoelementos.

### 1.2.2. Identificación bioquímica.

La identificación bioquímica es un proceso clave para determinar el nombre de una bacteria por referencia a las especies descritas, ya que este sistema de taxonomía binomial es basado exclusivamente sobre criterios bioquímicos.

Las pruebas bioquímicas clásicamente utilizadas corresponden a una metodología relativamente costosa en tiempo y en reactivos. Recientemente fue desarrollado un

sistema miniaturizado en placas y de fácil uso para vibrios (Solís A., 1996). Este sistema permite efectuar 16 pruebas bioquímicas, que con cinco pruebas suplementarias son necesarias y suficientes para poder identificar al nivel específico cualquier vibrio conocido en el camarón. (Solís A., 1996).

Las 16 pruebas de este sistema miniaturizado son: crecimiento en 0% NaCl, utilización de la glucosa (OF oxidativo y fermentativo), producción de indol, Voges-Proskauer, citrato de Simmons, ornitina decarboxilasa, arginina dihidrolasa, L-arabinosa, celobiosa, D-manosa, D-manitol, sucrosa, D-glucuronato, D-gluconato, D-galactosa. Las otras cinco pruebas son: forma celular, motilidad, tinción de Gram, oxidasa y catalasa (Solís A., 1996). Estas últimas son importantes para la identificación a nivel de los diferentes géneros de la familia Vibrionaceae.

### 1.2.3. Caracterización inmunológica

La caracterización inmunológica de una cepa bacteriana se basa en la utilización de anticuerpos mono o policlonales que reaccionan en forma específica con un epítipo. Este tipo de caracterización es particularmente interesante al nivel infraespecífico para la identificación de serotipos.

Según este concepto, fueron preparados anticuerpos monoclonales contra la cepa S2, causante del síndrome de bolitas y, seguidamente fue demostrado un parentesco antigénico entre S2 y E22 (Donoso E., 1996).

Entre las técnicas inmunológicas para caracterizar una bacteria, el dot-blot y el colony-blot son particularmente adecuadas debido a la alta especificidad así como a la simplicidad y rapidez, ya que las colonias pueden ser detectadas con el anticuerpo antes de ser observables a simple vista. Ambas técnicas consisten en colocar una suspensión

bacteriana o adherir una colonia sobre una membrana constituyendo esta la fase sólida donde se va a realizar el reconocimiento del anticuerpo, marcado con un enzima o indirectamente detectado con un segundo anticuerpo marcado. El complejo antígeno anticuerpo enzima es revelado por la adición de sustrato transformado por el enzima en un producto coloreado precipitable sobre la membrana (fig. 3).

La técnica de colony-blot puede no solamente ser utilizada para la caracterización de cepas de bacterias sino también para detectar rápidamente algunas bacterias de un serotipo dado en muestras de agua o de homogenizado de muestras de camarón.

## DOT BLOT

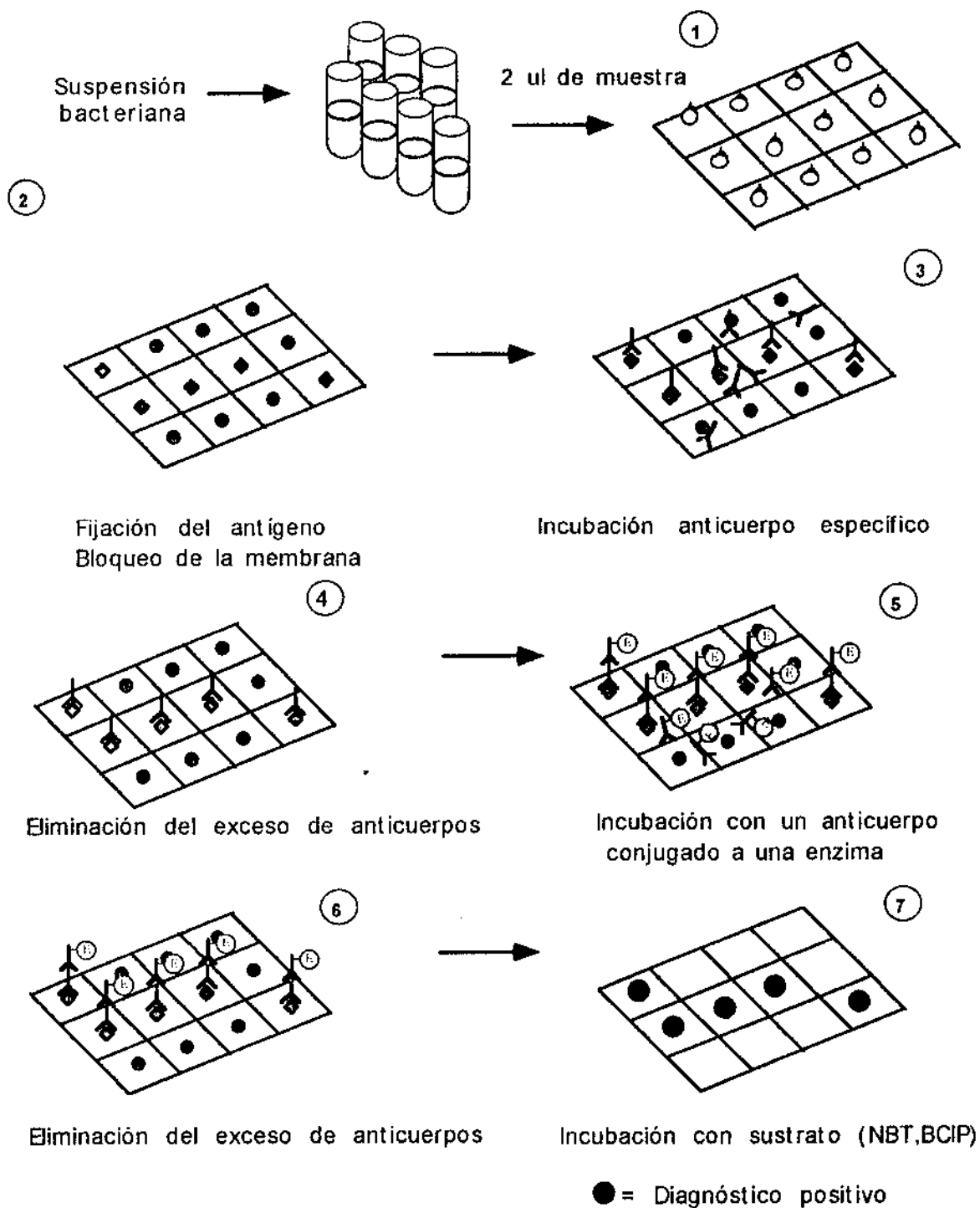
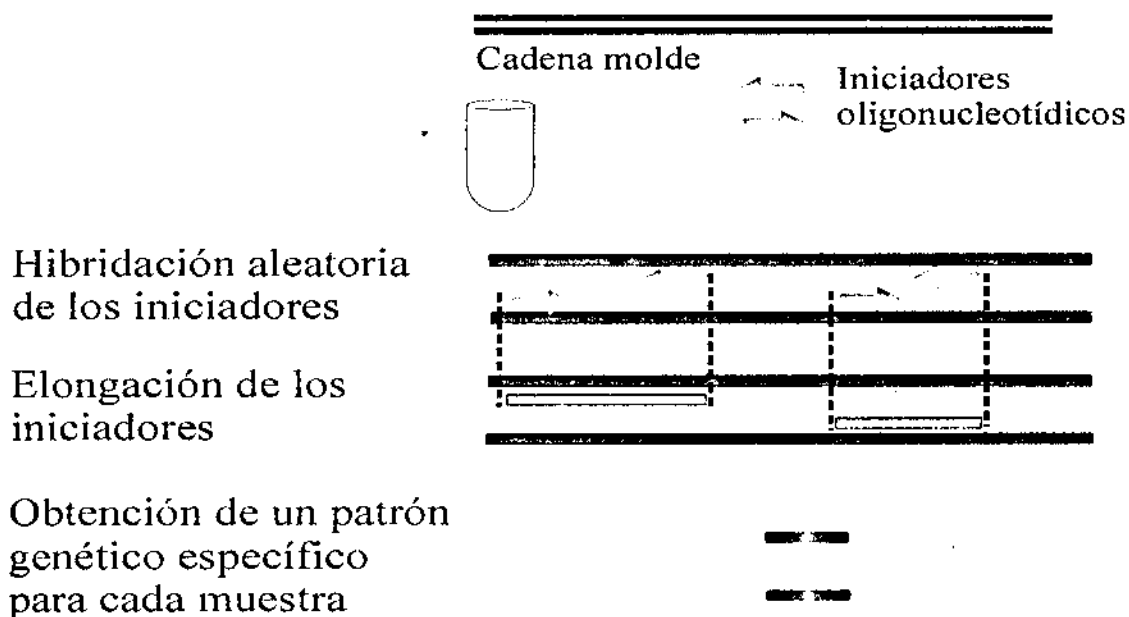


Figura 3. Técnica de dot-blot. (Modificado de Valenzuela, 1996).



#### 1.2.4. Caracterización genética por RAPD

Las bacterias en razón de su alta capacidad de multiplicación y, subsecuentemente de mutación son altamente variables genéticamente. Esta variabilidad puede ser revelada en base a la técnica de AP-PCR (Aleatory-Primed-Polimerase-Chain-Reaction) que permite, mediante el uso de iniciadores oligonucleótidos con secuencias escogidas aleatoriamente, obtener productos de amplificación (fig. 4). Estos productos cuyo número y tamaño son propios de una cepa, corresponden a un perfil electroforético característico llamado RAPD. En base a esta metodología, se puede caracterizar al nivel infraespecífico cualquier bacteria sin conocimiento previo de su material genético.



**Figura 4.**-Principio de la AP-PCR (Aleatory-Primed-Polimerase-Chain-Reaction). (Cortesía de Biotecnodata).

### 1.3. INFECCIONES EXPERIMENTALES Y NATURALEZA DE BACTERIAS

La determinación de la naturaleza probiótica, patógena u oportunista de cualquier cepa bacteriana aislada de camarón es primordial en términos de epidemiología analítica.

En este sentido, un protocolo de patología experimental fue desarrollado por San Miguel (1996) y después optimizado por Serrano (1996). Se reveló que es posible, siguiendo este protocolo, controlar la monoclonización del tracto digestivo de larvas con la condición que se realice la infección en el estadio Nauplio V antes que la boca sea funcional. Así, fueron demostradas la naturaleza patógena y no patógena de las bacterias E22 e ILI, respectivamente.

Con el uso de anticuerpos monoclonales específicos de estas cepas fue posible analizar el efecto de una monoclonización bacteriana previa a la infección secundaria por otra cepa bacteriana. Así, la bacteria ILI como colonizadora inicial del tracto digestivo reveló ser capaz de impedir la colonización secundaria del tracto por la bacteria patógena S2, lo que corresponde al concepto de uso de bacterias probióticas para la prevención de enfermedades.

### 1.4 CONTROL DE ENFERMEDADES

#### 1.4.1 Antibióticos

Los antibióticos son compuestos capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias o matarlas. Existen antibióticos que actúan sobre un importante rango de bacterias y se los conoce como antibióticos de amplio espectro, otros en cambio actúan específicamente sobre un restringido grupo de bacterias. Además, se debe considerar la toxicidad para el

huésped, lo que corresponde al medio terapéutico, es decir la relación entre la dosis eficaz contra la bacteria y la dosis tóxica para el huésped (Sayers A. y Whitt D.,1994).

#### 1.4.1.1. Mecanismos de acción

##### **Inhibición de la síntesis de la pared celular**

Una diferencia fundamental entre las células bacterianas y la de los eucariotes es la presencia en las bacterias de una pared celular rígida por fuera de la membrana celular. Esta pared protege a las células bacterianas de la rotura osmótica, debido a la diferencia entre el interior de la célula marcadamente hiperosmótica (hasta 20 atm) y el medio ambiente del huésped isoosmolar o hipoosmolar. La estructura que confiere rigidez y resistencia a la lisis osmótica a la pared celular, tanto en las bacterias gram positivas como las gram negativas es el peptidoglucano, un sáculo de gran tamaño, con enlaces covalentes, que envuelve a las bacterias. En las bacterias gram positivas, el peptidoglucano es la única capa externa a la membrana celular y tiene gran grosor (20 a 80 nm); en las bacterias gram negativas, existe una membrana exterior a la capa de peptidoglucano, que es muy fina (1nm). Los agentes quimioterapéuticos dirigidos contra cualquier etapa de la síntesis, exportación, ensamblaje o enlazamiento transversal del peptidoglucano conducen a la inhibición del crecimiento celular bacteriano y, en la mayoría de los casos, a la muerte celular, ya que el peptidoglucano es una estructura que confiere rigidez y resistencia a la lisis osmótica de la pared celular, tanto en las bacterias gram positivas como en las gram negativas. Casi todos los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana son bactericidas, esto es que terminan por causar la muerte de la célula por lisis osmótica (Gordon L., 1996).

##### **Inhibición de la síntesis proteica**

La mayoría de los agentes antibacterianos que inhiben la síntesis de la proteínas interaccionan con el ribosoma bacteriano. La diferente composición con el ribosoma de células eucariotes confiere su selectividad a estos compuestos.

Los macrólidos (ejemplo:eritromicina) son antibióticos que consisten en un gran anillo de lactona al que se unen azúcares. Se ligan específicamente a la porción 50 S del ribosoma bacteriano. Tras la unión del ARN mensajero al lugar de la iniciación de la subunidad 30S del ribosoma, la subunidad 50 S se une al componente 30 S para formar el complejo ribosómico de 70 S, y se produce la elongación de la cadena proteínica (Sayers A. y Whitt D.,1994).

El cloranfenicol, muy usado en laboratorios de producción de larvas, es un pequeño antibiótico con un anillo aromático y una corta cadena lateral, se une irreversiblemente a la porción 50 S del ribosoma bacteriano. La unión del cloranfenicol inhibe la formación de enlaces peptídicos (Sayers A. y Whitt D.,1994).

La tetraciclina consiste en cuatro anillos aromáticos con diversos grupos sustituyentes. Interaccionan reversiblemente con la subunidad 30 S del ribosoma bacteriano, bloqueando la unión del aminoacil-ARNt al complejo ARNm-ribosoma (Gordon L.,1996).

### **Inhibición de la síntesis o actividad de los ácidos nucleicos**

Antibióticos como las quinolonas, son compuestos capaces de inhibir una de las subunidades del enzima girasa de ADN, que es responsable del superenrollamiento negativo del ADN, lo cual es una conformación esencial para la replicación del ADN en la célula (Sayers A. y Whitt D.,1994).

Otros antibióticos son capaces de unirse estrechamente con la ARN polimerasa, inhibiendo así la transcripción del ADN en ARN. (Fig.5)

Los nitrafuranos, son reducidos por un enzima bacteriano a productos intermedios muy reactivos, de vida corta, de los que se piensan que causan rotura de los filamentos del ADN (Sayers A. y Whitt D.,1994).

### Alteración de la permeabilidad de la membrana celular

Las polimixinas son polipéptidos cíclicos básicos. Se comportan como compuestos catiónicos, activos en la superficie, que distorsionan la permeabilidad tanto en las membranas externas como de la membrana citoplasmática de las bacterias gram negativas.

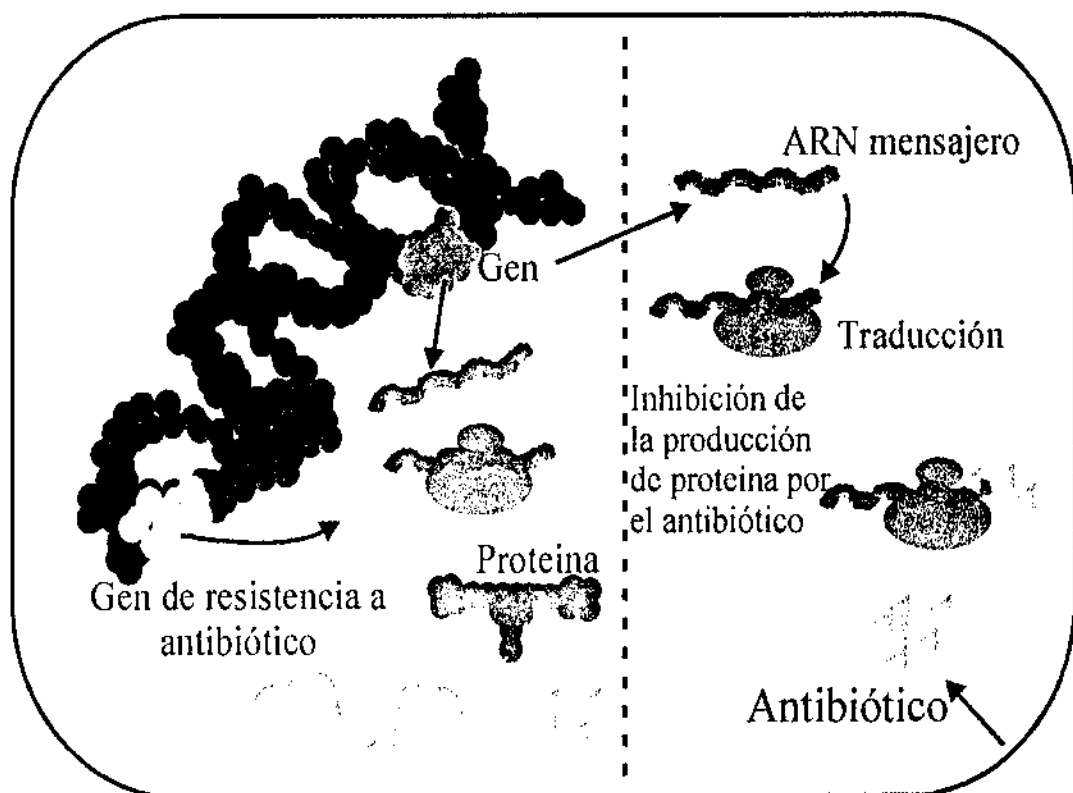


Figura 5.-Mecanismos de acción de los antibióticos. (Cortesía de Biotecnodata)

### 1.4.1.2. Mecanismos de resistencia

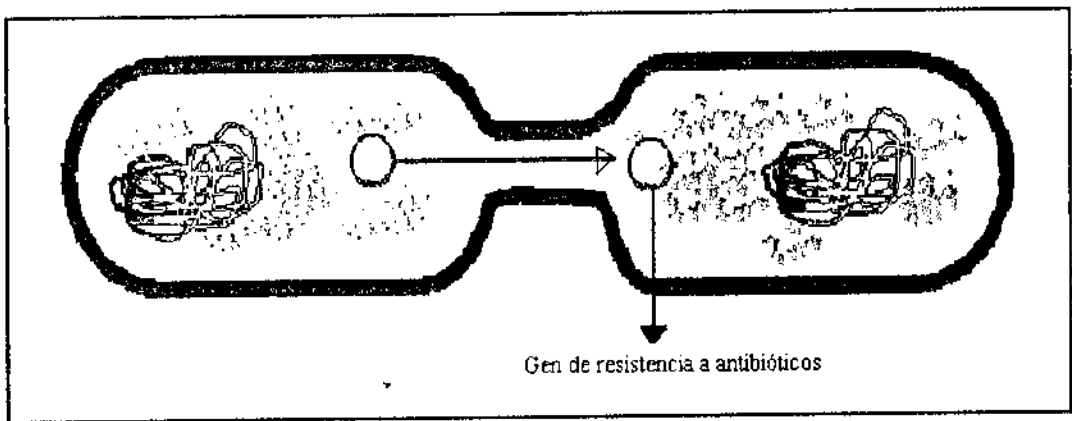
Algunas bacterias son intrínsecamente resistentes a ciertas clases de antibióticos. Claramente estos agentes nunca pueden ser utilizados aisladamente en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes. Sin embargo, bacterias que son habitualmente susceptibles a agentes antibacterianos pueden adquirir resistencia. La resistencia adquirida es una de las principales limitaciones a la eficacia de la quimioterapia antibacteriana. La resistencia puede desarrollarse por mutación o por adquisición de nuevos genes. Los nuevos genes que median la resistencia se diseminan habitualmente de unas células a otras por elementos genéticos móviles como plásmidos, y bacteriófagos según los procesos de conjugación (Fig. 6), transferencia (Fig.7) y transducción (fig. 8). Además la resistencia de una cepa puede aumentar mediante el proceso de transposición de un elemento complejo (fig. 9). Las poblaciones bacterianas resistentes florecen en zonas de gran utilización de antimicrobianos, en las que gozan de una ventaja selectiva respecto a las poblaciones sensibles.

Los principales mecanismos por los cuales las bacterias resisten a la acción de agentes antimicrobianos son la destrucción del compuesto, la alteración o hiperproducción del blanco del antibacteriano, la disminución de la permeabilidad del revestimiento celular al agente, y la eliminación activa del compuesto del interior de la célula.

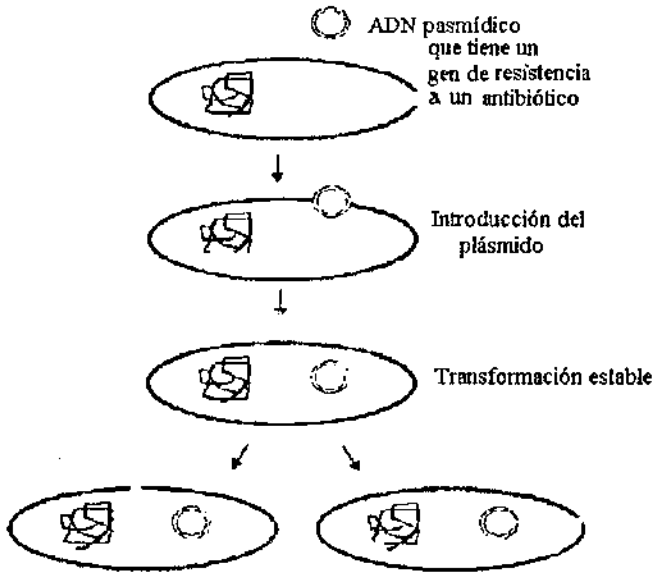
La mayoría de las bacterias resistentes al cloranfenicol producen un enzima codificado por plásmidos, el cloranfenicol-acetil-transferasa, que inactiva el compuesto por acetilación. Ocasionalmente algunas bacterias gram negativas adquieren una mutación que afecta la permeabilidad de la membrana externa a este antibiótico.

El mecanismo más común de resistencia a las tetraciclinas es una bomba de flujo activo, codificada por plásmidos que se inserta a la membrana citoplasmática y expulsa el antibiótico al exterior de la célula (Sayers A. y Whitt D.,1994).

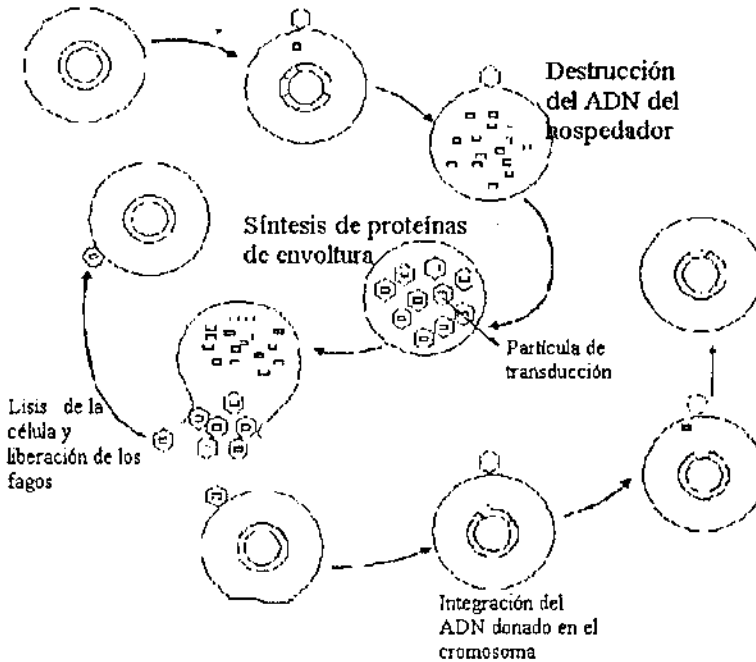
La resistencia adquirida de una bacteria frente a diferentes antibacterianos se está haciendo cada vez más frecuente, lo que resulta del uso sucesivo y de un solo antibiótico a concentraciones subletales. La proliferación de tales cepas multirresistentes resulta de su extrema ventaja selectiva en sitios de producción con alto uso de antibióticos y alta concentración de residuos. (Gordon L.,1996).



**Figura 6.** Mecanismo de conjugación bacteriana para la adquisición de genes de resistencia a antibióticos.

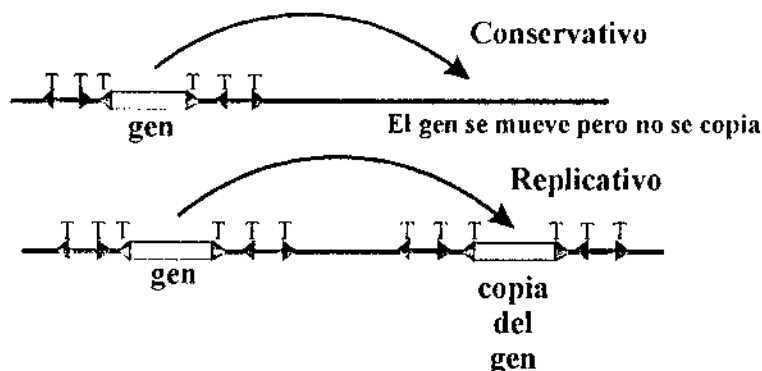


**Figura 7.** Transformación. Adquisición de un plásmido que contiene un gen correspondiente a un mecanismo de resistencia a antibióticos.



**Figura 8.** Proceso de transducción. Adquisición de genes de resistencia a antibióticos por intermedio de un bacteriofago.





**Figura 9.** Mecanismo de amplificación de resistencia a antibióticos por medio de transposones (secuencias de ADN capaces de trasladarse de un lugar a otro del genoma bacteriano y amplificar la capacidad de resistencia o patogenicidad).

#### 1.4.2. Probióticos

El término probiótico es definido como: “preparaciones que contienen microorganismos y cuando sus metabolitos son utilizados como aditivos alimenticios afectan al huésped de una manera beneficiosa”. (Smoragiewiez *et al*, 1993). En la mayoría de los casos los probióticos incluyen microorganismos que son capaces de crecer y/o funcionar en el tracto digestivo del huésped.

Algunas teorías explican el incierto papel del mecanismo de acción de los probióticos en sistemas acuícolas (Garriquez, Arévalo, 1995):

- Competitividad por sitios de fijación con bacterias patógenas
- Mejoramiento de la nutrición por nutrientes esenciales suplementarios
- Mejoramiento de la digestión por enzimas esenciales suplementarias
- Eliminación directa de materia orgánica disuelta mediada por las bacterias
- Producción de sustancias que inhiben el crecimiento de bacterias oportunistas

Uno de los factores más importantes para el uso de las bacterias probióticas es que permiten la posibilidad de reemplazar el uso de antibióticos para el control de enfermedades. Los probióticos no matan otras bacterias pero compiten con ellas, inhibiendo su desarrollo .

Maeda y Liao (1992) aislaron e identificaron una bacteria de un extracto de suelo que aumentó la supervivencia y el porcentaje de muda en larvas de *P.monodon*.

Laboratorios ecuatorianos de producción de larvas de camarón son frecuentemente afectados por enfermedades bacterianas como síndrome de bolitas y síndrome de zoea II. Tradicionalmente la prevención y tratamiento para estas enfermedades han sido basados en el rutinario uso de antibióticos, de los cuales su acción contra bacterias patógenas se desconoce. Así, el inadecuado uso de estos ha ocasionado fenómenos de resistencia, desordenes ecológicos y limitado éxito en el control de enfermedades. Por esto el uso de probióticos surge como una alternativa al uso de antibióticos en las estrategias para el control de enfermedades.

Importantes avances en estudios de probiosis han sido realizados, desde la preparación de anticuerpos monoclonales contra las cepas S2 e ILI, consideradas patógena y probiótica respectivamente, hasta el desarrollo de un modelo experimental para el estudio de las interacciones de larvas de camarón con bacterias patógenas y probióticas

Se ha reportado que con una concentración de ILI ( $10^5$  bac/ml) en los tanques de producción desde NV hasta PL12 ha sido regularmente posible la prevención de enfermedades (Donoso *et. al*, 1997).

La habilidad en el manejo de la flora bacteriana en sistemas de cultivo mediante la inoculación de bacterias beneficiosas es una alternativa viable para la industria del

camarón en el futuro (Garriques y Arévalo, 1995). De esta manera, se podrá establecer progresivamente un catálogo de cepas presentes en situaciones normales y aquellas específicamente aisladas luego de fenómenos de mortalidades.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **2.1.1 Animales**

Larvas de *Penaeus vannamei*, en estadio larvario N 2-3, provenientes del Laboratorio ACUATECSA, ubicado en la Península de Santa Elena.

#### **2.1.2. Anticuerpos**

Anticuerpos monoclonales, 2B6 y 2C9 específicos para la detección de las cepas bacterianas ILI (*V. alginolyticus*) y E22 (*V. harveyi*) respectivamente, obtenidos del CENAIM (Departamento de Inmunología).

#### **2.1.3. Aislados bacterianos**

Las bacterias fueron aisladas de larvas enfermas con síndrome de zoca II provenientes de un laboratorio situado en la Península de Santa Elena. Las cepas escogidas fueron codificadas como: L2.7, L2.10, L2.13, L2.27 y L2.39, no identificables bioquímicamente; L2.11 y L2.20 identificadas bioquímicamente como *V. anguillarum* y *V. tubiashii*, respectivamente.

Cepa ILI aislada, de *P. vannamei* e identificada bioquímicamente como *V. alginolyticus* (Morales, 1994). La capacidad probiótica de esta cepa fue establecida experimentalmente (San Miguel, 1996 ; Serrano, 1996).

Cepa E22 identificada bioquímicamente como *V. harveyi* (Aráuz com. Pers., 1994) y su naturaleza patógena establecida experimentalmente (San Miguel, 1996 ; Serrano, 1996).

## 2.2. METODOLOGIA

### 2.2.1. Macerado de larvas

Larvas provenientes de laboratorios fueron filtradas en una malla de 100  $\mu\text{m}$  y luego lavadas con agua de mar estéril. Estas larvas fueron pesadas e introducidas en un microtubo de 1.5 ml para ser maceradas. Luego se añadió solución salina al 2.5 % de ClNa a una relación de 900  $\mu\text{l}$  por cada 100 mg de larvas maceradas. Lo cual fue homogenizada con ayuda de un vortex.

### 2.2.2. Técnicas bacteriológicas

Para realizar la siembra de los macerados de larvas se vertieron 100  $\mu\text{l}$  de estos al medio de cultivo sólido y con una varilla de vidrio estéril se esparció por la superficie del agar. Luego estas cajas eran puestas en la incubadora a 28°C y después de 24 horas de incubación se hicieron los conteos y descripción morfológica de las colonias bacterianas.

Los procedimientos de aislamiento consistieron en obtener una colonia pura proveniente de un solo microorganismo. El aislamiento de las bacterias se realizó tomando una pequeña cantidad de la colonia deseada con la punta de un asa de platino estéril y sembrándola en forma de estrías sobre el medio sólido de cultivo. Estas cajas fueron incubadas a 28°C por 24 horas. La siembra en estrías se la realizó por agotamiento, de tal manera que fue posible obtener colonias aisladas.

Una vez obtenidos los aislados bacterianos estos eran sembrados en TSA (medio recomendado para realizar pruebas bioquímicas).

En estas manipulaciones era de vital importancia el mantenimiento de las condiciones asépticas durante todos los pasos, para lo cual se trabajó en una cámara de flujo laminar (Air Tech Japan, Ltd. Mod. BCM-1002W).

### 2.2.3. Identificación Bioquímica

La determinación de la forma celular, motilidad, oxidasa y catalasa se la realizó de la siguiente manera:

#### **Motilidad y forma**

El movimiento característico de una bacteria se debe a la presencia o ausencia de flagelos y se puede observar usando una lámina excavada de Koch mediante la técnica de la gota pendiente, para lo cual se coloca una gota pequeña de la suspensión bacteriana en el centro de una lámina cubre-objeto con un asa de platino estéril en punta. En las esquinas de la laminilla se debe colocar pequeños puntos de vaselina con el fin de que la suspensión bacteriana cuelgue libremente del cubre-objeto sin tocar los lados ni el fondo de la lámina de Koch, cuando se presiona suavemente el cubre-objeto sobre la lámina.

Luego se coloca una gota de aceite inmersión directamente sobre la superficie del cubre-objeto para examinar el cultivo al microscopio (100X), observándose la motilidad, forma y arreglo celular. Para realizar esta prueba es recomendable que el aislado bacteriano tenga un periodo de incubación de 12 horas, esto es para detectar fácilmente la motilidad de las bacterias.

#### **Determinación de Gram**

Para determinar si una bacteria es Gram negativa o positiva se utilizó el *Método de Ryus* que consiste en tomar un inóculo de bacteria con un asa de platino en punta y ponerlo en contacto con hidróxido de sodio (NaOH) al 3%. Si se forma un hilo al levantar el asa, la bacteria es Gram negativa, caso contrario es Gram positiva.

#### **Catalasa**

Ciertas bacterias tienen la capacidad de producir la reacción de catálisis del peróxido de hidrógeno; y esto se puede observar poniendo en contacto un inóculo bacteriano con una gota de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), si se producen burbujas que representan al oxígeno y al agua liberados, la prueba es positiva, caso contrario es negativa. Esta prueba se debe hacer con asa de níquel-cromada o con palillos de madera estéril; el asa de platino da una respuesta falsa positiva.

### **Oxidasa**

Con esta prueba se detecta la presencia de la enzima citocromo-oxidasa, que es capaz de reducir el oxígeno, esta prueba se la realizó de la siguiente manera:

Con un asa de platino se tomó un inóculo bacteriano y frotó en el papel impregnado con el reactivo (cytochrome-oxidase reagent "Nissui", Yaku Code 05180), previamente humedecido con agua destilada. El desarrollo de un color violeta al instante o dentro de un minuto significa un resultado positivo.

El resto de las pruebas seleccionadas (16) se las hizo en microplacas de titulación de 96 pozos, incubadas a  $28^\circ C$ , haciendo las lecturas a las 24, 48 y 72 horas de cultivo.

Las suspensiones bacterianas fueron preparadas en microtubos Eppendorf, colocando una asada de la colonia bacteriana en agua destilada estéril para la prueba de crecimiento al 0% de NaCl y en solución salina al 0.85% de NaCl para el resto de las pruebas.

Los medios fueron colocados en la microplaca de tal forma que son utilizadas dos columnas de ésta para identificar una cepa, por lo tanto se pueden analizar hasta seis cepas por cada microplaca.

### **Crecimiento, 0% NaCl**

A 200  $\mu$ l del medio NB (Nutrient Broth), se inocularon 20  $\mu$ l de la suspensión bacteriana en agua destilada. La formación de turbidez en el medio indica un resultado positivo, mientras que si permanece igual sería negativo.

### **Tipo de metabolismo**

Se utilizaron dos pozos, en uno se determinó el metabolismo oxidativo, usando 200  $\mu$ l de medio y en el otro se determinó el metabolismo fermentativo, usando 150  $\mu$ l. Se inocularon 20  $\mu$ l de suspensión bacteriana a ambos pozos y al segundo se le añadió 100  $\mu$ l de aceite mineral estéril, para garantizar una condición anaerobia.

La acidificación del medio con un cambio del indicador de pH a amarillo solo en el pozo abierto indica un resultado positivo para la utilización oxidativa de la glucosa, mientras que la acidificación del medio en el pozo cubierto indica un resultado positivo para la utilización fermentativa de la glucosa, si el medio permanece igual sería negativo para ambos casos. Si no se produce acidificación en ninguno de los pozos significa que la bacteria no utiliza la glucosa de ninguna forma.

### **Producción de indol**

A 200  $\mu$ l agua de triptona al 1% se inocularon 20  $\mu$ l de la suspensión bacteriana, después de 1-3 días de incubación (cuando se note crecimiento) se adicionaron 20  $\mu$ l del reactivo de Kovac mezclándolo directamente con la micropipeta. La aparición de un halo de color rosado o rojo en la superficie indica una respuesta positiva.



### **Voges Proskauer**

A 100  $\mu\text{l}$  del medio MR-VP se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana, después de 1-3 días de incubación (cuando se note crecimiento) se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de la solución 1 (Alfa naptol al 5% de etanol absoluto) y 20  $\mu\text{l}$  de la solución 2 (Hidróxido de potasio al 40%), mezclando después de añadir cada solución.

La aparición de un color rojo indica que la prueba es positiva, esto ocurre inmediatamente o después de 5 minutos de haber añadido el segundo reactivo. Sin embargo, es preferible leer los resultados después de 4 horas a fin de garantizar la veracidad de la reacción.

### **Citrato de Simmons**

A 200  $\mu\text{l}$  del medio citrato de Simmons se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana. Una reacción positiva debe 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 decarboxilasa**

A 150  $\mu\text{l}$  del medio bacto decarboxylasa base Moellier con el aminoácido ornitina, se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de suspensión bacteriana y 100  $\mu\text{l}$  de aceite mineral estéril. El desarrollo de una coloración violeta fuerte o débil indica un resultado positivo, una coloración amarilla negativo.

### **Arginina dihidrolasa**

A 150  $\mu\text{l}$  del medio bacto decarboxylase base Moeller con el aminoácido arginina, se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana y 100  $\mu\text{l}$  de aceite mineral estéril. El desarrollo de una coloración violeta fuerte o débil indica un resultado positivo, una coloración amarilla negativo.

## Asimilación de carbohidratos

A 200  $\mu$ l del medio OF con el carbohidrato apropiado, se añadieron 20  $\mu$ l de la suspensión bacteriana. Si el medio se torna amarillo la prueba es positiva, y negativa si permanece verde o se vuelve azul.

Es importante recalcar que ciertos carbohidratos no pueden ser esterilizados en el autoclave (se desdoblán a esas temperaturas), sino por filtración entre ellos arabinosa y sucrosa, además se recomienda esterilizar el resto de los carbohidratos utilizados a 110°C por 10 minutos.

Los carbohidratos que se utilizaron para la realización de la bioquímica miniaturizada fueron:

L-Arabinosa.

Celobiosa.

D-Manosa.

D-Manitol.

Sucrosa.

D-Glucuronato.

D-Gluconato.

Galactosa.

Nota: A todos los medios se les debe ajustar la concentración de NaCl a un 2%, excepto al medio NB que sirve para determinar si los aislados bacterianos crecen al 0% de NaCl.

La interpretación de los resultados se la expresa con un porcentaje de concordancia con el total de las pruebas realizadas.

La lectura de los resultados es posible hacerla usando tablas de diagnóstico en conjunto con computadoras. Por ejemplo, las tablas son incorporadas a la memoria del computador y los resultados de aislados desconocidos son comparados con cada una de las posibilidades, la correlación más alta es tomada para inferir una identificación.

#### 2.2.4. Caracterización antigénica

##### 2.2.4.1. Técnica de dot blot

**Protocolo básico** ( Protocolo según Evelyne Bachere, 1992 )

1. Depositar 1 ó 2 microlitros de la suspensión de bacterias (por ej: 1 colonia de bacteria dentro de 200-500  $\mu$ l de PBS-M) en una membrana de nitrocelulosa. Se puede también usar un aparato de microfiltración (Dot blot apparatus) para filtrar 500  $\mu$ l de suspensión bacteriana.
2. Dejar secar la membrana a la temperatura ambiente por 30 min.
3. Saturar la membrana mediante incubación con PBS (Tampón fosfato salino)-leche descremada 5% (peso/volumen) en una caja Petri agitando suavemente por 60 minutos a temperatura ambiente.
4. Realizar 3 lavados de 3 minutos c/u con PBS-Tween 20 (0.1%).
5. Depositar 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.

6. Realizar 3 lavados de 3 min c/u con PBS-Tween 20 (0.1%).
7. Depositar el anticuerpo conjugado (a la fosfatasa alcalina) e incubar por 45 min.; dilución empleada del anticuerpo 1/10000 en PBS-Tween 0.1%-Leche 0.5 %.
8. Realizar 3 lavados de 3 min c/u con PBS-Tween 20 (0.1%).
9. Incubar con la solución substrato recientemente preparada:

BCIP (25 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyl fosfato en 0.5 ml de dimethyl-formamida) = 33  $\mu$ l.

NBT (25 mg de Nitro Blue Tetrazolium en 1 ml de agua deionizada)= 66  $\mu$ l.

Tampón Fosfatasa Alcalina (NaCl 5.84g/l, MgCl<sub>2</sub> 0.5 g/l, Tris base 12.11 g/l, pH 9.5) = 10 ml.

Nota: Cuando las manchas alcanzan la intensidad deseada, la reacción enzimática es detenida lavando la membrana con EDTA 2 mM (100  $\mu$ l. de EDTA 0.5 M diluído en 25 ml. de PBS).

### 2.2.5. Caracterización genética

#### 2.2.5.1. Técnica para la extracción de ADN de bacterias

1. Centrifugar los tubos que contienen las bacterias (TSB+glicerol) a 13000 RPM durante 15 minutos.
2. Eliminar el sobrenadante.
3. Agregar 300  $\mu$ l. de TE (tris EDTA) a los tubos.

4. Calentar por 10 min. a 100°C para romper la pared celular de las bacterias.
5. Dejar enfriar los tubos en hielo.
6. Centrifugar por 10 min. a 13000 RPM.
7. Extracción final del sobrenadante (ADN).

#### 2.2.5.2. Protocolo para la amplificación de ADN por medio de una AP PCR

1. Coger 5 µl. de ADN y ponerlo en un tubo eppendorf pequeño (0.5 ml.).
2. Agregar 5 µl. de agua destilada estéril.
3. Agregar 40 µl. de mezcla.

La mezcla se compone de: H<sub>2</sub>O.....25.8 µl.

Buffer 10X.....5.0 µl.

dNTPs.....4.0 µl.

Cl<sub>2</sub>Mg.....4.0 µl.

Primer 1.....1.0 µl.

Taq.....0.2 µl.

4. Agregar 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.

### 2.2.5.3. Elaboración de un gel de electroforesis al 1.5% de agarosa

1. En una probeta poner 1960 ml. de agua destilada.
2. Agregar 40 ml. de solución TAE 50X y homogenizar.
3. Tomar en una fiola 350 ml. de la solución tampón 1X.
4. Pesar 5.25 g. de agarosa y agregársela a la fiola.
5. Calentar en baño maría por espacio de 1 hora la fiola que contiene el tampón 1X con la agarosa para lograr que ésta se disuelva por completo.
6. Cuando dicha solución esté algo fría agregar 17.5  $\mu$ l. de Bromuro de Etidio (1  $\mu$ l. de bromuro por cada 20 ml de solución) y depositar en el molde.
7. Verter el volumen restante de la solución TAE 1X en la cubeta de electroforesis (Macicell. Mod. EC 360 M).
8. Sumergir el gel en la cubeta que contiene la solución TAE 1X.

### **Depósito de la muestra en el gel**

1. Coger 20  $\mu$ l. de ADN amplificado y colocarlo en un tubo eppendorf pequeño (0.5 ml).
2. Agregar 4  $\mu$ l. de Azul de bromo fenol (el azul de bromo fenol, ayuda a precipitar la muestra en los pozos del gel).
3. Depositar los 24  $\mu$ l. de muestra en cada pozo del gel.
4. Conectar la cubeta de electroforesis a la fuente de poder (E-C Aparatus Corporation Mod. EC 135) y ajustar el voltaje (75 v. por espacio de 3 horas).

## 2.2.6. Metodología de patología experimental

### 2.2.6.1. Recepción de nauplios

Los nauplios (NII) fueron transportados desde el laboratorio en fundas plásticas con 30 L de agua con salinidad de 35 UPS. Una vez en la sala de infecciones la fundas que contenían los nauplios fueron colocadas en un tanque con agua a 28°C, temperatura a la cual se llevaría a cabo la experimentación.

Los animales fueron colocados en un cosechador de fibra de vidrio para su posterior desinfección con oxitetraciclina (40 ppm, 24 horas). Luego de la desinfección los animales fueron lavados con agua de mar esterilizada por filtración (filtros de 5, 1 y 0,5µm) y posteriormente por irradiación ultravioleta (ACUANECTIS SYSTEMS INC.).

Los nauplios (NV) fueron colocados en botellas de capacidad de 3.5l. a razón de 250 por botellas. Las botellas fueron colocadas en bandejas de fibra de vidrio (90.7 x 71.2 x 29 cm), las cuales contenían agua dulce para lograr el efecto de baño maría y así mantener constante la temperatura a 29°C. A cada bandeja se le colocó una pastilla de cloro concentrada para evitar una posible contaminación con bacteria ajenas a cada tratamiento.

La aireación se suministró a las botellas por medio de mangueras conectadas por un lado a orificios de salida de aire y por otra parte a pipetas Pasteur previamente autoclavadas y utilizadas como difusores dentro de cada botella.

### 2.2.6.2. Siembra y preparación de bacterias para infecciones experimentales

Las cepas controles E22 e ILI patógena y probiótica respectivamente, fueron cultivadas en el medio TSB (Tryptic Soy Broth) en fioles de 500 ml ( 28 C por 12 horas).

Posteriormente las suspensiones bacterianas fueron centrifugadas (3500 rpm por 15 min a una temperatura de 28° C) , y las bacterias fueron resuspendidas después en solución salina (2.5%).

La cuantificación de las suspensiones bacterianas fue realizada espectrofotométricamente (Shimadzu UV-2100 550 nm), siendo la unidad de densidad óptica equivalente a  $1.2 \times 10^9$  bacterias / ml.

### 2.2.6.3. Infecciones experimentales

Las infecciones fueron realizadas por inoculación de bacterias en las botellas cuando las larvas alcanzaron el estadio N5 y Z1. El inóculo bacteriano fue de  $10^7$  bac/ml por una duración de 24 o 36 horas. Luego se hizo un recambio del 100% de agua y subsecuentemente recambios diarios durante todo el periodo de la experimentación.

Las larvas fueron alimentadas diariamente con algas (*Chaetoceros sp.*) a una concentración de 50000 cel/ml.

Diariamente se tomaron 10 animales por cada botella para observaciones en el microscopio a fin de detectar síntomas de la enfermedad. Cada anomalía presentada por las larvas era fotografiada con el fin de tener respaldo.



#### 2.2.6.4. Análisis Estadístico

Se analizaron los resultados de sobrevivencia por medio de un Análisis de varianza (ANOVA). El intervalo de confianza de  $p < 0.05$ .

### **3. RESULTADOS Y DISCUSION**

El presente trabajo corresponde a un estudio de epidemiología analítica del síndrome de zoea II, que afecta a los laboratorios ecuatorianos de manera endémica, con objetivo primordial la determinación de su etiología.

Los datos de epidemiología descriptiva de este síndrome sugieren una etiología infecciosa, siendo las larvas de diferentes regiones rápidamente infectadas cuando arriban a un laboratorio con problemas. La hipótesis de una etiología bacteriana fue considerada más probable que una etiología viral, debido a la aparente persistencia del agente causal entre las infraestructuras, lo que es más difícil de concebir para un virus, que para las bacterias que pueden persistir y multiplicarse en el medio.

Un primer punto de investigación del síndrome, consistió en el aislamiento de bacterias a partir de animales enfermos paralelamente con aislamientos a partir de animales sanos.

Tales aislamientos necesitan la utilización de medios adecuados, es decir medios que no son demasiado selectivos para bacterias patógenas, ya que su adaptación parasitaria puede conducir a deficiencias para la síntesis de algunos metabolitos provistos por el huésped. Sin embargo, bacterias patógenas sin deficiencias deben tener una ventaja selectiva en términos de capacidad de persistencia en las piscinas de camarones. Según este concepto, fueron realizados análisis con diferentes medios de aislamiento, algunos clásicamente utilizados en acuicultura, como TCBS, otros recientemente desarrollados con adición con extracto de tejido de camarón.

Simultáneamente al aislamiento de bacterias, fue considerada su identificación bioquímica, siendo los criterios bioquímicos clásicamente utilizados para la determinación al nivel de especie según el principio de taxonomía binomial (Berger's manual).

Este sistema taxonómico binomial, adoptado de la taxonomía de los organismos eucariotes con reproducción sexual, es mal adaptado para procariotes con reproducción por escisiparidad que pueden producir en poco tiempo una extensa variedad de genotipos, resultado de mutaciones. Sin embargo, el concepto de especie bacteriana en base a criterios bioquímicos debe ser considerado como referencia en acuicultura como es el caso en bacteriología. Con este fin, la adecuación de los medios de identificación bioquímica para bacterias asociadas al camarón fue considerado, en particular frente a la posibilidad de que algunas bacterias estrechamente adaptadas a una vida parasitaria podrían ser difíciles de identificar en base a estos criterios. También por referencia a la bacteriología humana, la caracterización de las bacterias fue complementada por criterios antigénicos y genéticos, siendo estos últimos extremadamente útiles al nivel infraespecífico y eventualmente más confiables que los criterios bioquímicos para relacionar taxonómicamente cepas bacterianas.

En el tercer punto de este estudio de epidemiología analítica del síndrome de zoea II, se trató de determinar bacterias como agentes causales de la enfermedad. Por referencia al postulado de Koch, se intentó reproducir el síndrome de zoea II a partir de bacterias aisladas de larvas enfermas. Previamente, algunos mejoramientos del protocolo de infección experimental fueron intentados, en particular para liberar los nauplios de bacterias que podrían interferir con las bacterias estudiadas.

### 3.1. AISLAMIENTOS E IDENTIFICACIONES BIOQUIMICAS DE BACTERIAS RELACIONADAS CON SINDROME DE ZOEIA II

Un primer muestreo bacteriológico fue realizado durante un episodio de producción normal en un laboratorio ubicado en la Península de Santa Elena, que fue afectado por la enfermedad en anteriores ciclos de cultivo. De hecho, observaciones al microscopio óptico de las larvas analizadas no revelaron ningún signo característico del síndrome zoea II.

Para este muestreo se utilizaron los medios agar marino y TCBS que son comúnmente usados en los laboratorios para el aislamiento de bacterias "totales" y vibrios, respectivamente. Suspensiones bacterianas fueron preparadas a partir del homogenizado de larvas ( 10 % peso/volumen) en solución salina (2.5 %), siendo diluciones ulteriores preparadas para sembrar en caja Petri (100 µl/ caja). Algunas colonias aisladas fueron sembradas sobre medios BHI (Brain Heart Infusion Agar) o TSA (Tryptic Soy Agar) para su posterior identificación bioquímica, utilizando microplacas de 96 pozos. Cada bacteria aislada fue conservada en congelación (-80°C) y un código fue asignado para su reconocimiento posterior.

Las características morfológicas de las colonias bacterianas aisladas sobre agar marino o TCBS y su identificación bioquímica fueron consideradas (Tabla 1).

Tabla 1.- Cepas aisladas del laboratorio 1.

| Cepa    | Agar | Descripción de la colonia                       | Identificación bioquímica          |
|---------|------|---|------------------------------------|
| L1.1    | AM   | Redonda, blanca, traslúcida, convexa, brillante | N.I.B.                             |
| L1.2    | AM   | Redonda, blanca, cremosa, convexa, brillante    | Gram +                             |
| L1.3    | TCBS | Amarilla, convexa, brillante, cremosa           | <i>V. tubiashii</i>                |
| L1.4    | TCBS | Verde, redonda, convexa, brillante              | <i>V. vulnificus</i>               |
| L1.5    | TCBS | Amarilla, redonda, convexa, brillante, cremosa  | <i>V. fischeri</i>                 |
| L1.6    | AM   | Redonda, naranja, brillante, pequeña, convexa   | N.I.B.                             |
| L1.7    | TCBS | Verde, redonda, convexa                         | <i>V. vulnificus</i>               |
| L1.8    | AM   | Redonda, centro oscuro, bordes traslucidos      | <i>V. tubiashii/Photobacterium</i> |
| L1.9    | TCBS | Amarilla, rizoide, plana                        | <i>V. tubiashii</i>                |
| L1.10   | AM   | Spreader traslucido,                            | <i>V. tubiashii</i>                |
| L1.11   | AM   | Blanca, irregular, plana                        | <i>V. tubiashii</i>                |
| L1.12   | TCBS | Amarilla, redonda, convexa, bordes definidos    | <i>V. anguillarum</i>              |
| L1.13   | AM   | Spreader pequeño, blanco, bordes irregulares    | <i>V. anguillarum</i>              |
| L1.14   | AM   | Spreader blanco, traslucido, bordes irregulares | <i>V. anguillarum</i>              |
| L1.15   | AM   | Redonda, irregular, plana, blanca, traslúcida   | <i>V. fischeri</i>                 |
| L1.16   | AM   | Blanca, con bordes irregulares, poco convexa.   | N.I.B.                             |
| L1.17   | AM   | Blanca, con bordes irregulares, poco convexa    | N.I.B.                             |
| L1.18   | TCBS | Redonda, verde, convexa, brillante              | <i>V. fischeri</i>                 |
| L1.19   | AM   | Redonda, blanca, convexa                        | <i>V. logei</i>                    |
| L1.20   | AM   | Redonda, gris, convexa                          | N.I.B.                             |
| L1.21   | AM   | Redonda, gris, convexa                          | <i>V. fischeri</i>                 |
| L1.22   | AM   | Blanca, convexa, con bordes rizoides            | <i>V. campbelli/fischeri</i>       |
| L1.23   | TCBS | Verde, redonda, brillante, convexa              | N.I.B.                             |
| L1.24   | AM   | Colonias transparentes y convexas               | <i>V. damsela/nereis</i>           |
| L1.25   | AM   | Spreader, pequeña y convexa                     | N.I.B.                             |
| L1.26   | AM   | Bordes rizoides, blanca                         | <i>V. cholerae</i>                 |
| L1.27*  | AM   | Blanca con borde irregulares, poco convexa      | N.I.B.                             |
| L1.28*  | AM   | Anaranjada, redonda, convexa.                   | N.I.B.                             |
| L1.29*  | AM   | Blanca, redonda, pequeña, convexa.              | <i>V. alginolyticus</i>            |
| L1.30*  | AM   | Anaranjada, redonda, convexa.                   | N.I.B.                             |
| L1.31** | AM   | Anaranjada, redonda, convexa.                   | <i>V. alginolyticus</i>            |

N.I.B. No identificable bioquímicamente.

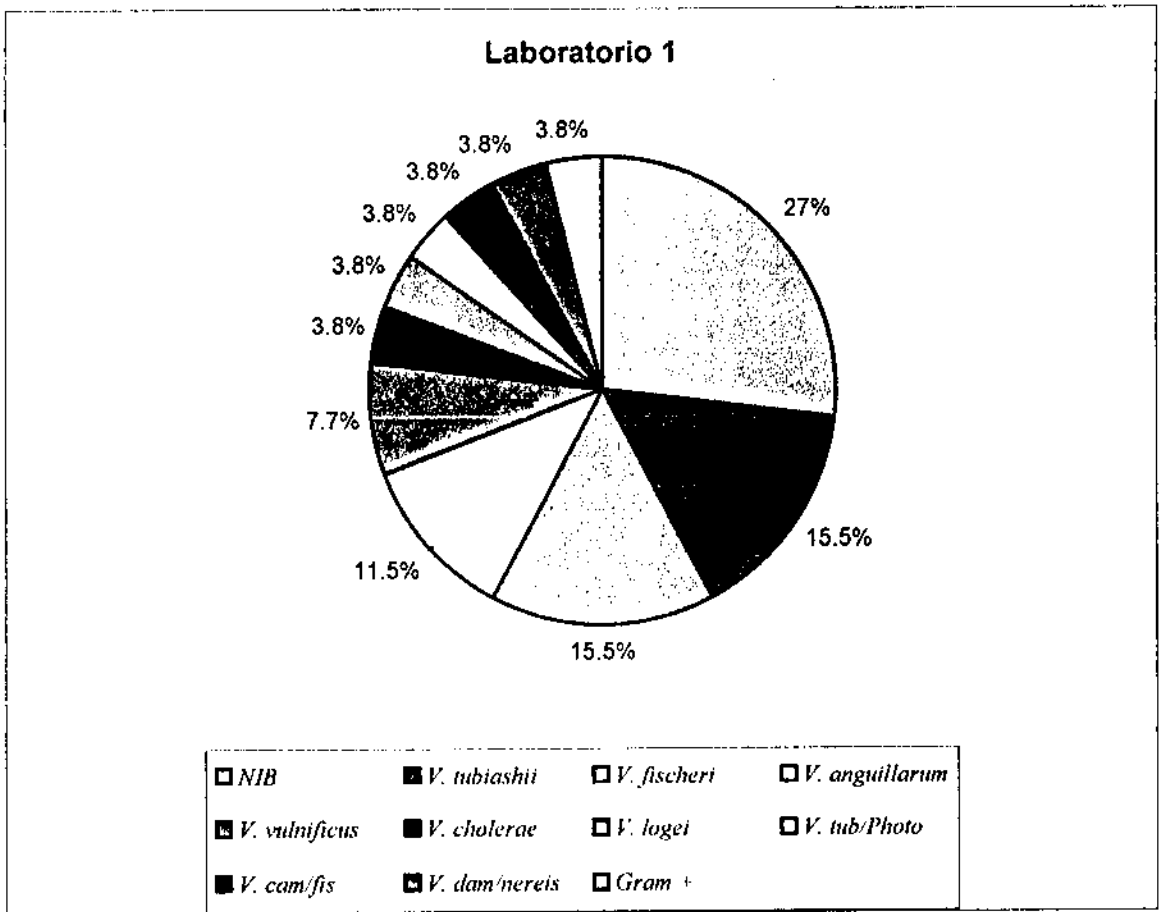
\* Bacterias proporcionadas por el laboratorio, debido a su resistencia a eritromicina, oxitetraciclina, furazolidona y cloranfenicol.

\*\* Bacteria proporcionada por el departamento de algas del laboratorio 1.

Es importante considerar algunas bacterias aisladas sobre AM durante una epidemia dentro de este laboratorio. Estas bacterias fueron seleccionadas por el biólogo del laboratorio debido a su resistencia a eritromicina, oxitetraciclina, furazolidona y cloranfenicol, antibióticos utilizados para intentar controlar la mortalidad.

Considerando las cinco cepas aislada por el biólogo del Lab.1 durante previos episodios epidémicos, se observó que bacterias del tipo NIB estuvieron siempre presentes (graf. 1)

En lo que concierne al ciclo de producción normal se reveló una gran variedad bacteriana ya que de las 26 bacterias analizadas fueron identificadas 9 especies en base a criterios bioquímicos, siendo *V. fischeri* (15.5%), *V. tubiashii* (15.5%), *V. anguillarum* (11.5%) las más frecuentes.



**Gráfico. 1.-** Porcentaje de bacterias identificadas bioquímicamente (laboratorio 1).

Sin embargo, una gran proporción de las bacterias (27%) no pudieron ser identificadas bioquímicamente, siendo estas bacterias aisladas casi exclusivamente del medio agar marino. De hecho en ninguno de los 16 medios de identificación se observó crecimiento bacteriano, lo que sugiere ya sea una gran deficiencia metabólica de las bacterias o una

condición de cultivo desfavorable que podría deberse a la temperatura de incubación o a la concentración de sal. Estas bacterias fueron entonces sometidas a tres operaciones de identificación a diferentes temperaturas de incubación (25, 28 y 32°C). Además se utilizaron sistemas comerciales como el API, lo que condujo a confirmar la imposibilidad de identificar estas bacterias debido a su incapacidad a crecer en los medios de identificación. Consecuentemente estas bacterias, no identificables bioquímicamente (NIB), podrían corresponder a bacterias con deficiencias metabólicas y requerimientos específicos provistas por células del camarón.

Un segundo muestreo fue realizado durante un episodio del síndrome de zoea II en un laboratorio ubicado en la Península de Santa Elena. Para aislar bacterias se escogieron larvas que presentaban los síntomas en base a una observación al microscopio óptico.

Considerando los casos frecuentes de cepas de tipo NIB en el primer muestreo, en el segundo muestreo los aislamientos fueron realizados sobre el medio agar TCBS-E, que corresponde a TCBS enriquecido con 25% de caldo de músculo de camarón y sobre el medio Mus-Agar-SS que corresponde a caldo de músculo de camarón más 2% de agar-agar (Calero, 1998). Las bacterias aisladas fueron sembradas sobre TSA o BHI para la identificación bioquímica. Los resultados de los aislamientos y de las identificaciones bioquímicas son presentados en la tabla 2.

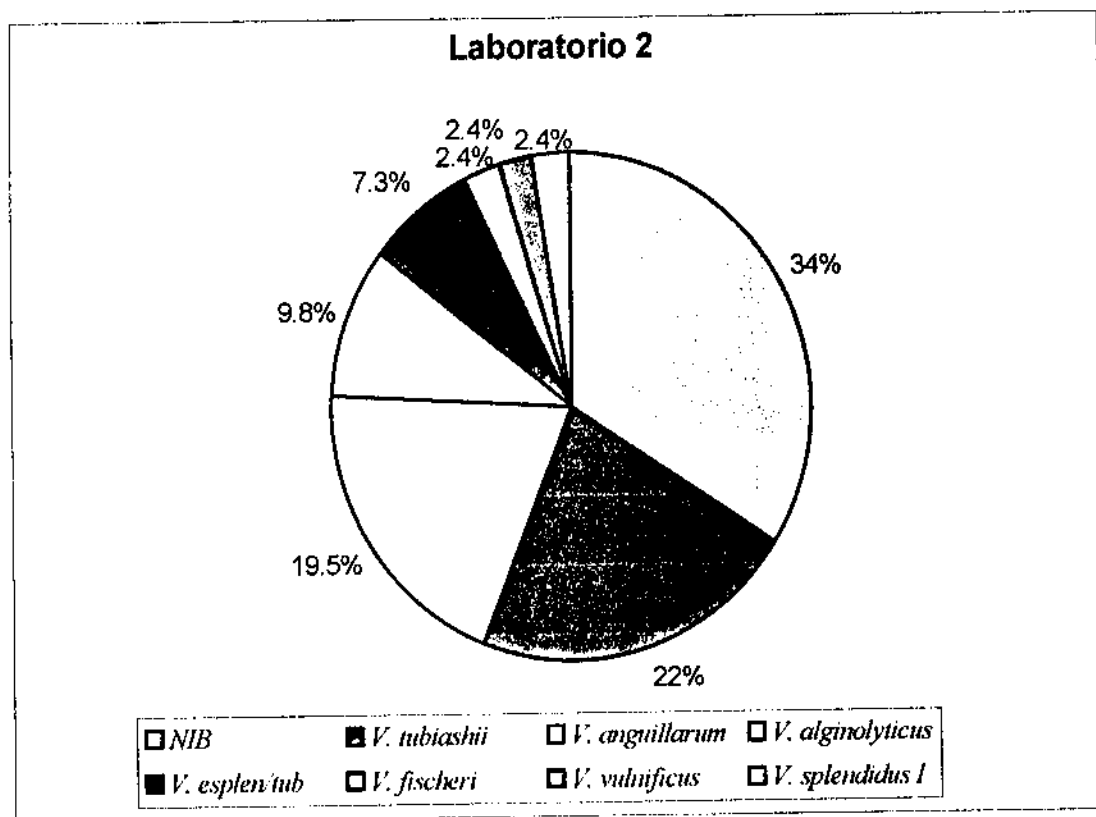
Tabla 2.- Bacterias aisladas del laboratorio 2.

| Código | Características                              | Agar   | Identificación Bioquímica |
|--------|--|--------|---------------------------|
| L2.1   | Blanca, redonda, poco convexa                | A.Mus. | <i>V. tubiashii</i>       |
| L2.2   | Opaca con halo en el medio, plana, redonda,  | A.Mus. | <i>V. tubiashii</i>       |
| L2.3   | Pequeña, redonda, blanca, opaca.             | A.Mus. | N.I.B.                    |
| L2.4   | Pequeña, redonda, blanca, convexa            | A.Mus. | <i>V. tubiashii</i>       |
| L2.5   | Blanca, opaca, con punto en el medio, plana. | A.Mus. | <i>V. tubiashii</i>       |
| L2.6   | Pequeña, redonda, poco convexa, transparente | A.Mus. | <i>V. tubiashii</i>       |
| L2.7   | Bordes irregulares, plana traslúcida         | A.Mus. | N.I.B.                    |
| L2.8   | Redonda, opaca, pequeña, poco convexa        | A.Mus. | <i>V. splen I/ tub.</i>   |
| L2.9   | Redonda, traslúcida, pequeña, transparente   | A.Mus. | <i>V. angillarum</i>      |
| L2.10  | Redonda, convexa, pequeña, verde             | A.Mus. | N.I.B.                    |
| L2.11  | Irregular, traslúcida, pequeña               | A.Mus. | <i>V. angillarum</i>      |
| L2.12  | Blanca, redonda, convexa                     | A.Mus. | <i>V. anguillarum</i>     |
| L2.13  | Amarilla, redonda, convexa                   | A.Mus. | N.I.B.                    |
| L2.14  | Plana, amarilla, con halo traslúcido         | TCBS E | <i>V. tubiashii</i>       |
| L2.15  | Grande, convexa, amarilla, redonda           | TCBS E | <i>V. anguillarum</i>     |
| L2.16  | Pequeña, convexa, verde                      | TCBS E | N.I.B.                    |
| L2.17  | Pequeña, transparente, plana                 | TCBS E | <i>V. angillarum</i>      |
| L2.18  | Verde, redonda, pequeña                      | TCBS E | N.I.B.                    |
| L2.19  | Verde, redonda, pequeña                      | TCBS E | <i>V. fischeri</i>        |
| L2.20  | Verde, redonda, pequeña                      | TCBS E | <i>V. tubiashii</i>       |
| L2.21  | Verde, redonda, pequeña                      | TCBS E | <i>V. splen I/ tub.</i>   |
| L2.22  | Grande, amarilla, opaca, redonda             | TCBS E | <i>V. splen I/ tub.</i>   |
| L2.23  | Verde, convexa, pequeña                      | TCBS E | N.I.B.                    |
| L2.24  | Amarilla, redonda, con bordes irregulares    | TCBS E | <i>V. anguillarum</i>     |
| L2.25  | Amarilla, grande, brillante, convexa         | TCBS E | <i>V. anguillarum</i>     |
| L2.26  | Redonda, amarilla convexa                    | TCBS E | <i>V. splendidus I</i>    |
| L2.27  | Verdosa, pequeña                             | TCBS E | N.I.B.                    |
| L2.28  | Verdosa, pequeña                             | TCBS E | N.I.B.                    |
| L2.29  | Café, redonda, pequeña convexa               | A.Mus. | N.I.B.                    |
| L2.30  | Convexa, amarilla, pequeña                   | A.Mus. | N.I.B.                    |
| L2.31  | Convexa, amarilla, pequeña                   | A.Mus. | N.I.B.                    |
| L2.32  | Verde, redonda, convexa                      | TCBS E | <i>V. vulnificus</i>      |
| L2.33  | Redonda, amarilla convexa                    | TCBS E | <i>V. alginolyticus</i>   |
| L2.34  | Redonda, amarilla convexa                    | TCBS E | <i>V. alginolyticus</i>   |
| L2.35  | Verde, redonda, convexa                      | TCBS E | <i>V. tubiashii</i>       |
| L2.36  | Redonda, amarilla convexa                    | TCBS E | <i>V. alginolyticus</i>   |
| L2.37  | Verde, redonda, convexa                      | TCBS E | <i>V. tubiashii</i>       |
| L2.38  | Redonda, amarilla convexa                    | TCBS E | <i>V. alginolyticus</i>   |
| L2.39  | Negra, plana, pequeña                        | A.Mus. | N.I.B.                    |
| L2.40  | Pequeña, convexa, verdosa                    | TCBS E | N.I.B.                    |
| L2.41  | Grande, amarilla parda                       | TCBS E | <i>V. anguillarum</i>     |

En base a las identificaciones bioquímicas, se observó comparativamente al precedente muestreo una menor diversidad bacteriana, ya que solamente siete tipos de bacterias



fueron reconocidas, siendo *V. tubiashii* la más frecuente (22%), seguida por *V. anguillarum* (19.5%), *V. alginolyticus* (9.8%)(graf.2).



**Gráfico 2.-** Porcentaje de bacterias identificadas bioquímicamente (laboratorio 2).

Al igual que en el estudio clínico anterior, alrededor de 30% de bacterias aisladas sobre los dos tipos de medios no pudieron ser caracterizadas bioquímicamente, debido al no crecimiento en los medios de identificación, lo que condujo a considerarlas como NIB.

En conclusión en lo que concierne a las bacterias identificables, la comparación entre los dos muestreos, no condujo a detectar la predominancia de una especie en relación con el síndrome.

En lo que respecta a las bacterias NIB, su presencia parece constante en los laboratorios sin aumento significativo de su proporción durante episodios de mortalidades de larvas. Tales bacterias, podrían beneficiarse directamente para multiplicarse, de los micronutrientes del medio o, podrían directamente causar daños a las células, lo que conduce a considerarlas como oportunistas o patógenas respectivamente. A fin de evaluar esta hipótesis, infecciones experimentales fueron desarrolladas y descritas posteriormente.

Finalmente se debe mencionar que las observaciones de bacterias NIB parecen corresponder a un fenómeno reciente en los laboratorios de la península, ya que en su largo estudio en 1996, K. Siavichay no detectó este tipo de bacterias.

En 1997, durante el presente estudio, tales bacterias fueron mayoritariamente detectadas en dos laboratorios muestreados así como en un tercer estudio en donde el muestreo se lo hizo luego de la desinfección de nauplios, que provenían de un laboratorio ajeno a los muestreos anteriores, con fuertes dosis de oxitetraciclina (Tabla 9, en anexo 2).

El problema de no poder identificar estas bacterias en base a la bioquímica, fue superado gracias a la técnica de AP-PCR que permite determinar los perfiles RAPD, lo que muestra una gran variabilidad genotípica. Sin embargo durante el síndrome, un perfil RAPD fue más frecuentemente observado correspondiente a las cepas, L2.10, L2.30 y L2.31, y eventualmente L2.13, ya que se diferencia de las últimas por la adición de una banda (Foto 1, 2 y 3). Estas cepas representan el 20% de las bacterias NIB. La patogenicidad de este tipo de bacterias fue consecuentemente considerado durante los experimentos de infección.

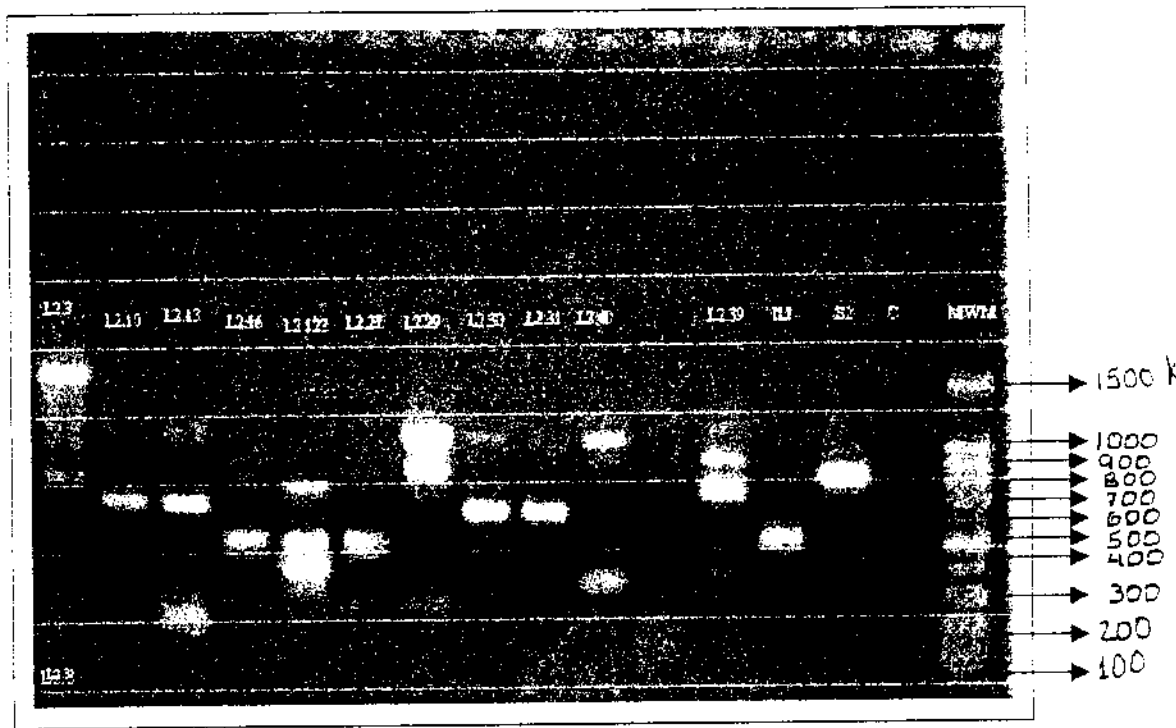


Foto 1 Perfiles RAPD de bacterias NIB aisladas de macerados de larvas del Lab 2

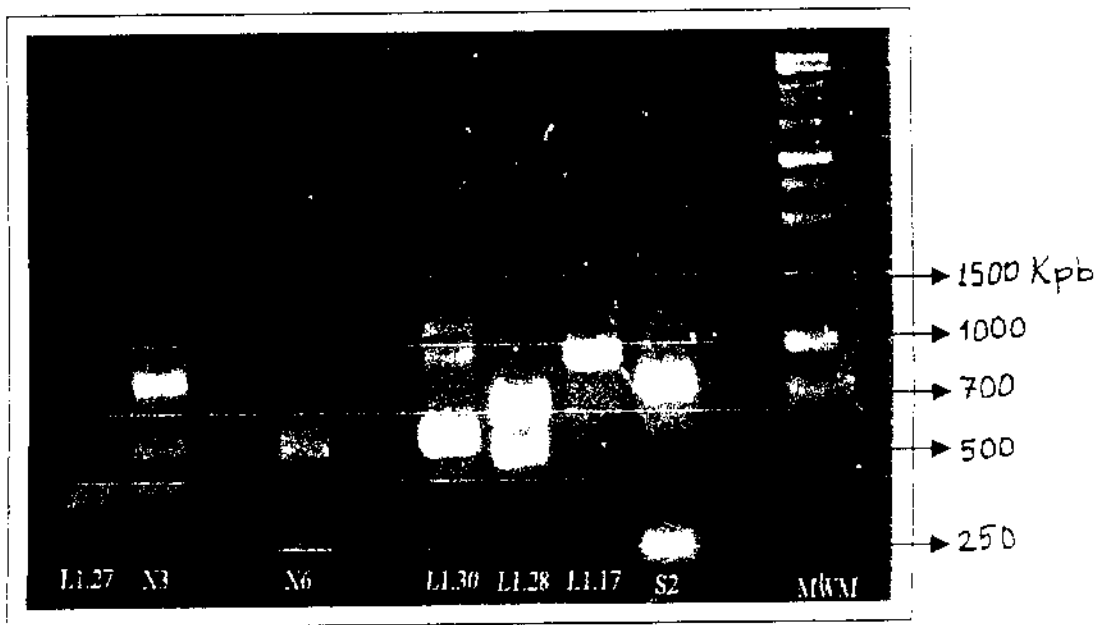


Foto 2 Perfiles RAPD de bacterias NIB aisladas de macerados de larvas del laboratorio (L1) y de bacterias aisladas en pruebas de desinfección de nauplios con oxitetraciclina a concentraciones de 15 y 20 ppm

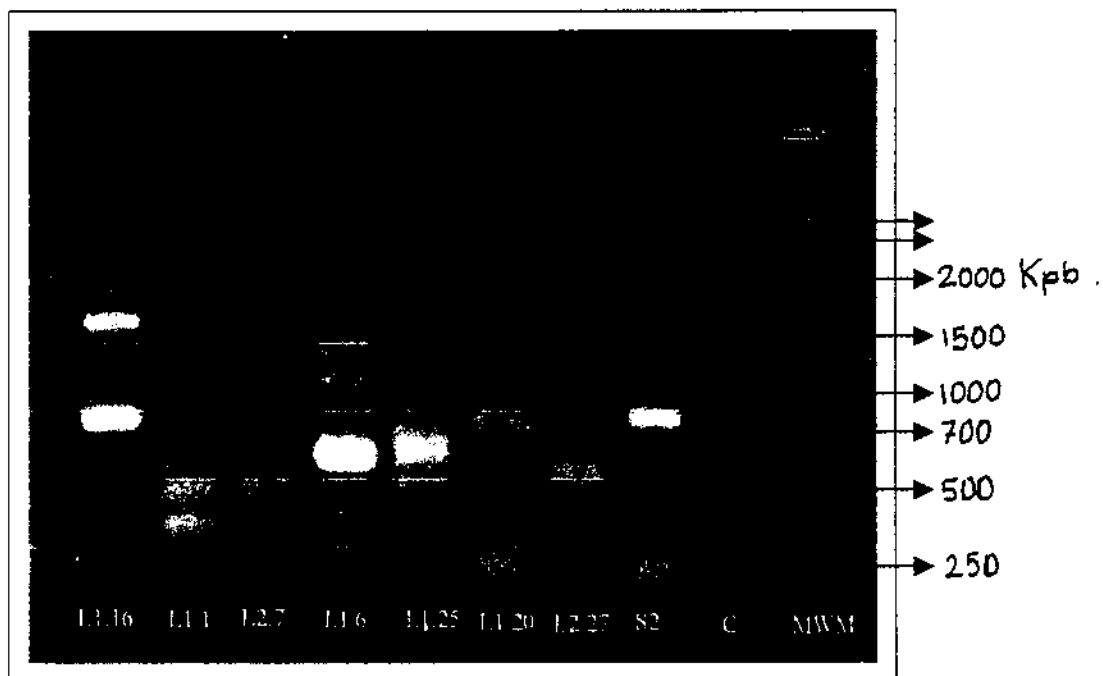


Foto 3. Perfiles RAPD de bacterias NIB aisladas de macerados de larvas del laboratorio 1 y 2.

Un último análisis consideró la adecuación respectiva de diferentes medios para aislar estas bacterias de tipo NIB. Los resultados mostrados en la tabla 3 indicaron que el 80 % de ellas no pueden ser aisladas sobre TCBS, siendo 30% de ellas también no aislables sobre TCBS enriquecido con extracto de camarón (TCBS E).

Estos resultados mostraron claramente el carácter inadecuado del TCBS en los estudios epidemiológicos en cultivos de camarón.

**Tabla 3.** - Comparación de crecimiento de cepas NIB en medios comúnmente usados y agares enriquecidos.

| Aislada de: | Cepa  | TCBS | TCBS (E) | AM | A mus |
|-------------|-------|------|----------|----|-------|
| AM          | L1.1  | -    | +        | +  | +     |
| AM          | L1.6  | -    | +        | +  | +     |
| AM          | L1.16 | -    | +        | +  | +     |
| AM          | L1.17 | +    | +        | +  | +     |
| AM          | L1.20 | -    | -        | +  | +     |
| TCBS        | L1.23 | +    | +        | +  | +     |
| AM          | L1.25 | -    | +        | +  | +     |
| AM          | L1.27 | +    | +        | +  | +     |
| AM          | L1.28 | +    | +        | +  | +     |
| AM          | L1.30 | -    | +        | +  | +     |
| AM          | L1.25 | +    | +        | +  | +     |
| AM          | X3*   | -    | -        | +  | +     |
| AM          | X4*   | -    | +        | +  | +     |
| AM          | X6*   | -    | +        | +  | +     |
| AM          | X8*   | +    | +        | +  | +     |
| A. Mus      | L2.3  | -    | +        | +  | +     |
| A. Mus      | L2.7  | -    | -        | +  | +     |
| A. Mus      | L2.10 | -    | -        | +  | +     |
| A. Mus      | L2.13 | -    | +        | +  | +     |
| TCBS E      | L2.16 | -    | +        | +  | +     |
| TCBS E      | L2.18 | -    | +        | +  | +     |
| TCBS E      | L2.23 | -    | +        | +  | +     |
| TCBS E      | L2.27 | -    | +        | +  | +     |
| TCBS E      | L2.28 | -    | +        | +  | +     |
| A. Mus      | L2.29 | -    | -        | +  | +     |
| A. Mus      | L2.30 | -    | -        | +  | +     |
| A. Mus      | L2.31 | -    | +        | +  | +     |
| A. Mus      | L2.39 | -    | +        | +  | +     |

- No presencia de colonias

+ Presencia de colonias

\* Bacterias aisladas de macerados de nauplio V después del tratamiento de 24 horas con 20ppm de oxitetraciclina (Tabla 9 en Anexo 2).

## 3.2 ANÁLISIS DE LA PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS BACTERIANAS.

### 3.2.1 Optimización del protocolo de infecciones

En base a los trabajos publicados por San Miguel (1996) y Serrano(1996) para la realización de pruebas de patogenicidad *in vivo* de una cepa bacteriana es necesario evitar la presencia de bacterias "contaminantes" asociadas a los nauplios, agua y algas utilizadas como alimento, siendo estas bacterias capaces de colonizar el tracto digestivo e interferir con las cepas en estudio.

#### 3.2.1.1. Evaluación de desinfectante

Los autores previamente citados trabajaron sobre la desinfección de los nauplios utilizando un producto con iodo conocido como Argentine.

Este producto es comúnmente utilizado en los laboratorios comerciales para la desinfección de nauplios previa a la siembra en los tanques , fue probada a dos concentraciones (100 y 200 ppm) con una duración de exposición de 5 y 10 minutos (Tabla 4).

**Tabla 4.-** Prueba de desinfección de nauplios con Argentine®.

| Concent. (ppm) | Tiempo de exp. | UFC/ml            | % de desinfección |
|----------------|----------------|-------------------|-------------------|
| 100 ppm        | 5'             | $7.8 \times 10^5$ | 56%               |
| 200 ppm        | 5'             | $9.7 \times 10^5$ | 46%               |
| Control        | 0'             | $1.8 \times 10^6$ |                   |

UFC/ml= Unidades formadoras de colonias por ml.

Los resultados demostraron que el Argentine® no disminuye totalmente la carga bacteriana.

### 3.2.1.2. Evaluación de antibiótico

Posteriormente, se hicieron pruebas de desinfección con oxitetraciclina, antibiótico de amplio espectro. Las concentraciones probadas fueron de 15, 20 y 40 ppm con un tiempo de exposición de 24 horas. El tratamiento de desinfección se inicio cuando los animales se encontraban en el estadio NII-III, hasta NV (Tabla 5).

Paralelamente, para saber si estas concentraciones de antibióticos podrian afectar a los nauplios, se hicieron pruebas de sobrevivencia luego de 24 horas de exposición. Se sembraron 250 nauplios por botella y cada concentración a probar tuvo 2 réplicas.

Los resultados de esta prueba mostraron una pequeña reducción de la sobrevivencia con el tratamiento de 40 ppm (Tabla 5). Sin embargo, esta concentración fue escogida para las infecciones experimentales ya que el criterio de ausencia de bacterias contaminantes es más importante que la sobrevivencia de los nauplios al tratamiento de desinfección previo a la infección experimental.

**Tabla.5.-** Muestreo bacteriológico después de la desinfección de los nauplios. Evaluación de la sobrevivencia de los nauplios luego de los tratamientos.

| de oxi  | UFC/ml (TCBS)   | % de desinfección | UFC/ml (TCBS)     | % de desinfección | % sob |
|---------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|
| Control | $1 \times 10^5$ | -                 | $1.8 \times 10^7$ | -                 | 100   |
| 15 ppm  | $1 \times 10^4$ | 90                | $1.1 \times 10^6$ | 94                | 97    |
| 20 ppm  | 0               | 100               | $9.5 \times 10^5$ | 96                | 95    |
| 40 ppm  | 0               | 100               | 0                 | 100               | 93.5  |

UFC = Unidades formadoras de colonias.

% sob = Porcentaje de sobrevivencia

|| de oxi = Concentración de oxitetraciclina

Así fue establecido que la oxitetraciclina a 40 ppm durante un día permite obtener una desinfección total de los nauplios. Es importante recordar que la concentración del principio activo varía en razón de la marca del producto.

### 3.2.2 Infecciones experimentales

#### 3.2.2.1. Primera infección experimental

Una primera serie de infecciones experimentales fue realizada con las cepas obtenidas del Laboratorio 2 durante un episodio de síndrome de zoea II. Se escogieron cepas representativas del aislamiento. Del grupo de las bacterias N.I.B. fueron escogidas: L2.10, L2.13, y L2.27. Así, se escogieron dos cepas caracterizadas bioquímicamente como *V. anguillarum* (L2.11) y otra como *V. tubiashii*. (L2.20), las cuales fueron frecuentemente encontradas en los dos muestreos.

Paralelamente a las infecciones con las cepas anteriormente mencionadas, se llevaron tres controles:

1. Sin bacterias, lo cual permite determinar la tasa de mortalidad causada por situaciones ajenas al tratamiento aplicado.
2. Un control negativo utilizando la cepa ILI, caracterizada bioquímicamente como *V. alginolyticus* y considerada probiótica. Esta cepa fue inoculada a la misma concentración que los demás tratamientos. Con este control se descarta la posibilidad de mortalidad provocada por carga bacteriana.
3. Con la cepa bacteriana E22, caracterizada bioquímicamente como *V. vulnificus* y considerada agente causal del "síndrome de bolitas".



Tabla # 6.- Infección # 1. Concentración de bacterias en los tratamientos  $10^7$  UFC/ml. 36 horas de exposición. Estadio de infección nauplio V-ZoeaII. Concentración de algas: 50.000/ml. Recambio diario del 100%.

| Tratamiento | % de sob./<br>botella | % de sob./<br>tratamiento | # de larvas con síntomas |       |       | #total de<br>larvas con sint. | % larvas con<br>sint. día 1y2 |
|-------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------|-------|-------|-------------------------------|-------------------------------|
|             |                       |                           | día 1                    | día 2 | día 3 |                               |                               |
| L2.11       | 55                    | 66.5±11.5 b               | 0                        | 0     | 0     | 1                             | 1.7                           |
|             | 78                    |                           | 0                        | 0     | 0     |                               |                               |
|             | 66                    |                           | 0                        | 1     | 0     |                               |                               |
| L2.20       | 74                    | 61±18.4 b                 | 0                        | 0     | 0     | 1                             | 1.7                           |
|             | 48                    |                           | 0                        | 1     | 0     |                               |                               |
|             | *                     |                           | 0                        | 0     | 0     |                               |                               |
| L2.27       | 55                    | 45,3±15 ab                | 4                        | 1     | 1     | 13                            | 18                            |
|             | 53                    |                           | 0                        | 0     | 0     |                               |                               |
|             | 28                    |                           | 3                        | 3     | 1     |                               |                               |
| L2.10       | 77                    | 61±14.7 b                 | 0                        | 4     | 1     | 9                             | 13                            |
|             | 58                    |                           | 0                        | 2     | 0     |                               |                               |
|             | 48                    |                           | 1                        | 1     | 0     |                               |                               |
| E22         | 59                    | 72±17.6bc                 | 6                        | 1     | 0     | 10+1**                        | 1.7                           |
|             | 65                    |                           | 2                        | 1     | 0     |                               |                               |
|             | 92                    |                           | 0                        | 1     | 0     |                               |                               |
| ILI         | *                     | 92±2.8c                   | 0                        | 0     | 0     | 0                             | 0                             |
|             | 94                    |                           | 0                        | 0     | 0     |                               |                               |
|             | 90                    |                           | 0                        | 0     | 0     |                               |                               |
| CSB         | 60                    | 66±5.6b                   | 0                        | 0     | 0     | 1                             | 1.7                           |
|             | 71                    |                           | 0                        | 1     | 0     |                               |                               |
|             | 67                    |                           | 0                        | 0     | 0     |                               |                               |
| L2.13       | 24                    | 29,6±15.3a                | 0                        | 1     | 1     | 12                            | 17                            |
|             | 47                    |                           | 0                        | 1     | 0     |                               |                               |
|             | 18                    |                           | 3                        | 5     | 1     |                               |                               |
| Estadio     |                       |                           | Z1                       | Z1-2  | Z2    |                               |                               |

sint. síntomas

\* Botellas encontradas sin aireación

\*\* 10 síntomas de síndrome de bolitas y 1 de zoea II

1. L2.11, *V. anguillarum*

2. L2.20, *V. tubiashii*

3. L2.27, N.I.B.

4. L2.10, N.I.B.

5. E22, *V. vulnificus*

6. ILI, *V. alginolyticus*

7. Control sin bacterias (CSB)

8. L2.13, NIB

Los análisis estadísticos de los porcentajes de sobrevivencia condujo al reconocimiento de tres grupos. La mejor tasa de sobrevivencia correspondió a la infección con IL1 y las menores correspondió a las cepas L2.27 y L2.13, siendo las diferencias significativas estadísticamente ( $P < 0.05$ ) (Tabla 6) (graf 3).

La mayor presencia de síntomas del síndrome de zoea II fueron observados también en las larvas infectadas con bacterias de las cepas L2.13 y L2.27. En las larvas infectadas con E22, agente causante del síndrome de bolitas, los síntomas típicos de esta enfermedad fueron observados.

Estos resultados indican que las dos cepas bacterianas L2.13 y L2.27 de tipo NIB son capaces de inducir el síndrome de zoea II entre los días 1 y 2, y el 18 y 17% de las larvas presentaron los síntomas de la enfermedad. La cepa L2.10 parece menos patógena con solamente 10% de larvas con síntomas (ver fotos en anexo 1)

El examen microscópico de las larvas permitieron reconocer diferentes fases del síndrome. En la primera fase se podía notar una severa inflamación de las paredes del hepatopáncreas, (ver diferencia con larva sana en foto 4), el cual presenta restos de alimento, sin embargo el intestino se podía notar un poco vacío (foto 5). En la segunda fase, se aprecia una severa atrofia de los lóbulos del hepatopáncreas, pero estos aún son distinguibles, pudiéndose notar el intestino completamente vacío indicando esto que la larva deja de alimentarse (Foto 6). En la tercera fase, ya no se pueden distinguir los lóbulos del hepatopáncreas, viéndose solo una mancha café en el medio. En esta fase se encuentra al animal moribundo, notándose solo los movimientos del corazón y tenues movimientos peristálticos (Foto 7).



Foto 4. Zoea II con las paredes de los lóbulos del hepatopáncreas normales. Larva proveniente de la botella del tratamiento correspondiente a la bacteria IL1 ( $10^7$  bac/ml). Aumento 100X.

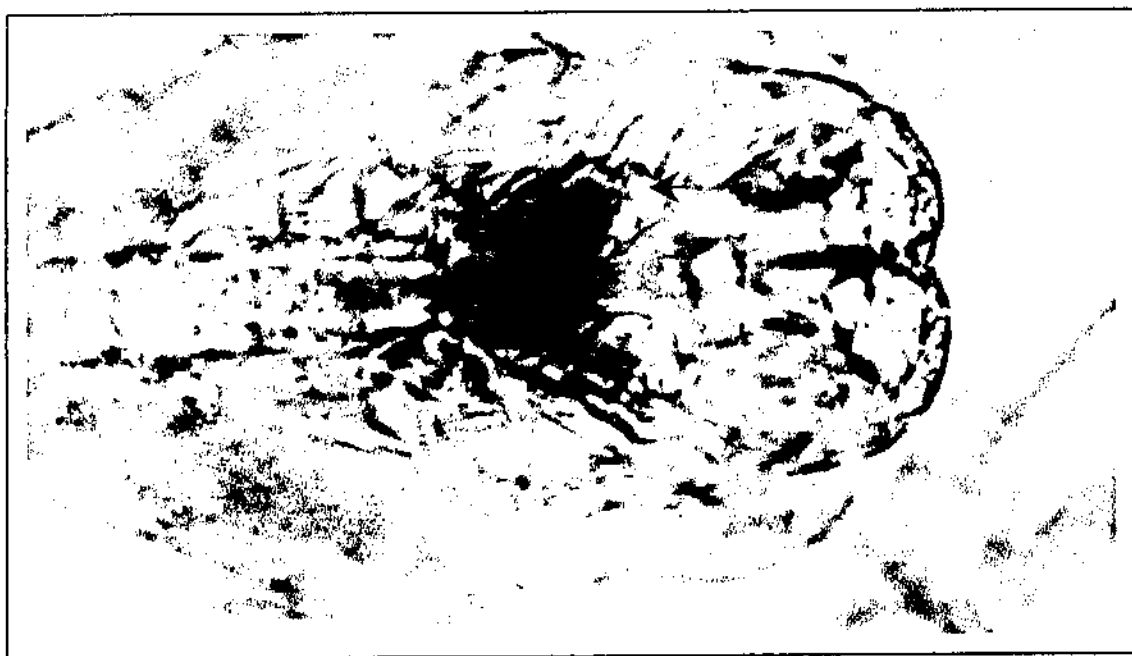


Foto 5. Zoea I con las paredes del hepatopáncreas deformes (ver flecha) Larva proveniente de la botella 1 del tratamiento correspondiente a la bacteria L2.13 ( $10^7$  bac/ml infección 1). Aumento 100X.

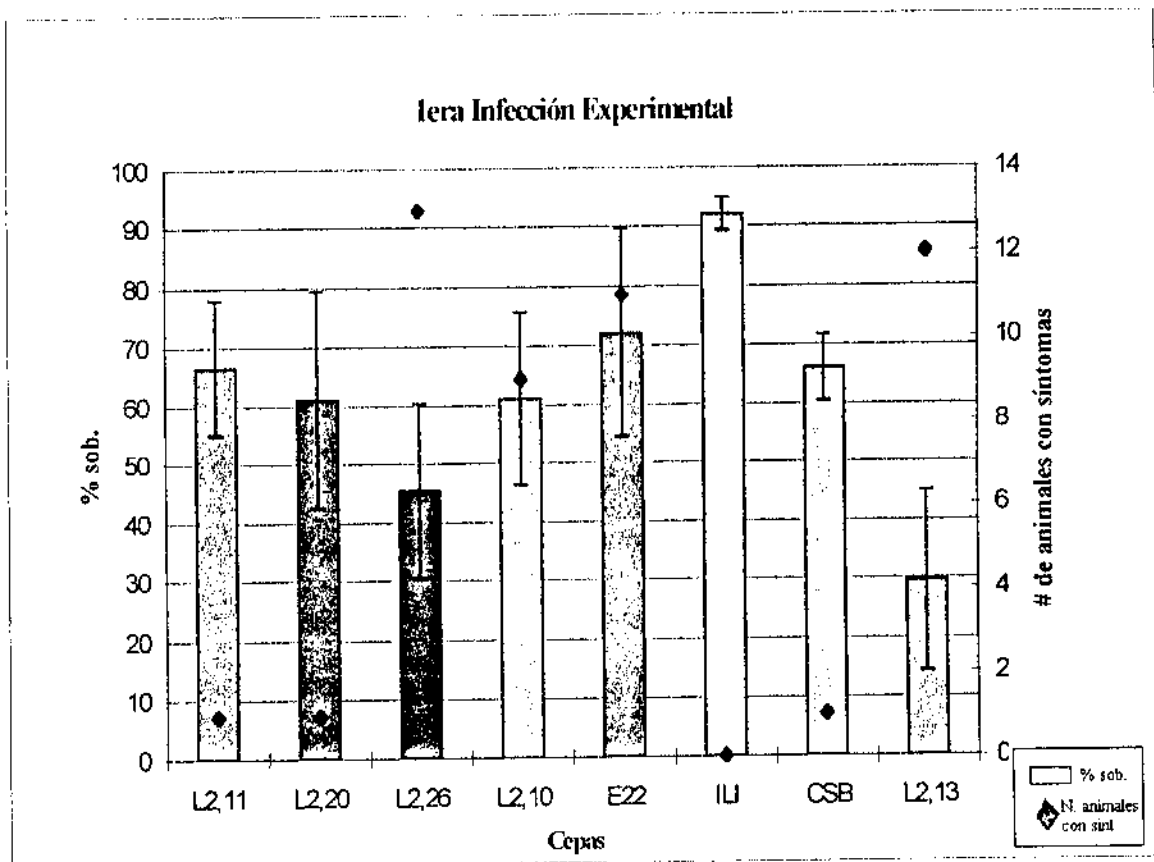


**Foto 6.** Zoea II con una reducción ostensible del tamaño de los lóbulos del hepatopáncreas (marcados con línea), no se observan restos de alimento. Larva proveniente de la botella 2 tratamiento correspondiente a la bacteria L2.27 ( $10^7$  bac/ml). Aumento 200X.



**Foto 7.** Zoea II en donde casi no se puede notar el hepatopáncreas, apenas se observa un lóbulo con un tamaño reducido. El animal se presenta letárgico y solo se puede advertir lentos movimientos peristálticos de su intestino. Larva proveniente de la botella 2 del tratamiento de la bacteria L2.13 ( $10^7$  bac/ml infección 1). Aumento 100X

Gráfico #3.-Comparación de sobrevivencia y frecuencia de síntomas en los tratamientos de la infección # 1



### 3.2.2.2. Segunda infección experimental.

Una segunda serie de infecciones fue realizada para confirmar la patogenicidad de la cepa L2.13 y para probar la patogenicidad de la cepa L2.7, también de tipo NIB.

En la siembra de la cepa L2.13 realizada en caldo marino se pudo observar que esta cepa creció muy poco y que la lectura obtenida en el espectrofotómetro fue debido a ciertas partículas del propio caldo y no a un verdadero crecimiento bacteriano. Por este motivo se utilizó, solo para este tipo de cepa (L2.13), el crecimiento en agar marino, luego de lo cual se resuspendieron en solución salina, y luego se hizo la lectura al espectrofotómetro. Para las cepas IL1 y E22 si se utilizó TSB para su crecimiento, luego de lo cual se hizo la centrifugación y por último la resuspensión y la lectura al espectrofotómetro

Tabla # 7.- Infección #2. Concentración de bacterias en tratamientos  $10^7$  UFC/ml. 24 horas de exposición. Estadio de infección zoea I. Concentración de algas: 50.000 cel/ml. Recambio diario 100%

| Tratamiento    | % sob./botella | % sob./trata. | # de larvas con síntomas |             |           | # total larvas con sint. | % larvas con sint. día 1y2 |
|----------------|----------------|---------------|--------------------------|-------------|-----------|--------------------------|----------------------------|
|                |                |               | día 1                    | día 2       | día 3     |                          |                            |
| L2.13          | 73             | 77±4.5a       | 2                        | 0           | 0         | 5                        | 8                          |
|                | 82             |               | 0                        | 0           | 0         |                          |                            |
|                | 77             |               | 2                        | 1           | 0         |                          |                            |
| ILI            | 75             | 75±11a        | 0                        | 0           | 0         | 1                        | 0                          |
|                | 64             |               | 0                        | 0           | 0         |                          |                            |
|                | 86             |               | 0                        | 0           | 0         |                          |                            |
| L2.7           | 8,6*           | 68,5±23.3a    | 1                        | 2           | 0         | 5                        | 8                          |
|                | 85             |               | 0                        | 0           | 0         |                          |                            |
|                | 52             |               | 0                        | 1           | 1         |                          |                            |
| E22            | 44             | 60,6±15.3a    | 0                        | 0           | 0         | 5                        | 0                          |
|                | 64             |               | 0                        | 0           | 0         |                          |                            |
|                | 74             |               | 0                        | 1           | 4         |                          |                            |
| CSB            | 90             | 70,6±30.1a    | 1                        | 0           | 0         | 2                        | 3                          |
|                | 86             |               | 0                        | 0           | 0         |                          |                            |
|                | 36             |               | 0                        | 1           | 0         |                          |                            |
| <b>Estadio</b> |                |               | <b>Z1</b>                | <b>Z1-2</b> | <b>Z2</b> |                          |                            |

sint. Síntomas

\* botella sin aireación

1. L2.13. NIB

2. ILI, *V. alginolyticus*

3. L2.7 NIB

4. E22, *V. vulnificus*

5. CSB, Control sin bacterias

No fue observada diferencia significativa al nivel de los porcentajes de sobrevivencia pero si síntomas del síndrome de zoea II fueron observados específicamente en las infecciones con L2.13 y L2.7 (Tabla 7)(graf. 4). Las mejores tasas de sobrevivencia podrían ser explicadas por la duración de las infecciones, 24 horas en el presente experimento contra 36 horas de la infección anterior.

Además fueron notados problemas de cultivo de la cepa L2.13, convirtiéndose estos problemas cada vez más críticos en el curso del siguiente experimento.

Se debe también indicar que en esta infección se introdujeron las algas cuatro horas antes del paso de los animales del estadio N5 al estadio de zoea I, al contrario a lo realizado en

la infección anterior en donde las algas fueron colocadas dos horas después de esta metamorfosis. Bacterias contaminantes de algas podrían interferir con la monoclonización del tracto digestivo y, subsecuentemente reducir el efecto patógeno de las bacterias estudiadas.

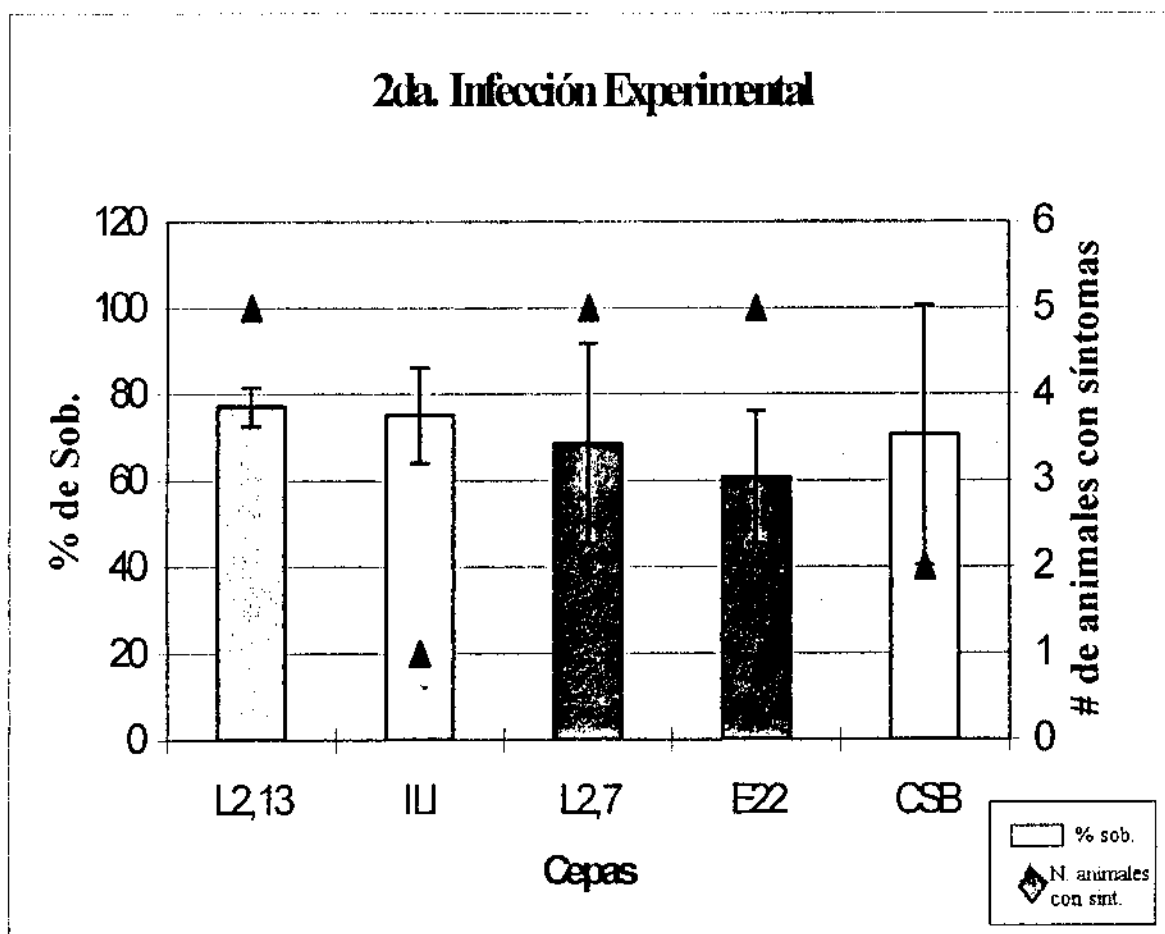


Gráfico #4.-Comparación de sobrevivencia y frecuencia de síntomas en los tratamientos de la infección # 2



### 3.2.2.3. Tercera infección experimental

La tercera serie de infecciones fue realizada con el objeto de clarificar los resultados sobre la patogenicidad o no de la cepa L2.13 y su aparente pérdida de patogenicidad en relación con su cultivo *in vitro*. Además, se decidió probar otra cepa bacteriana correspondiente al grupo NIB (L2.39) Nuevamente se puede advertir dificultad para el crecimiento de la cepa L2.13, esta vez sobre agar marino, en donde se debió sembrarla en dos ocasiones, notándose suficiente crecimiento después de 24 horas.

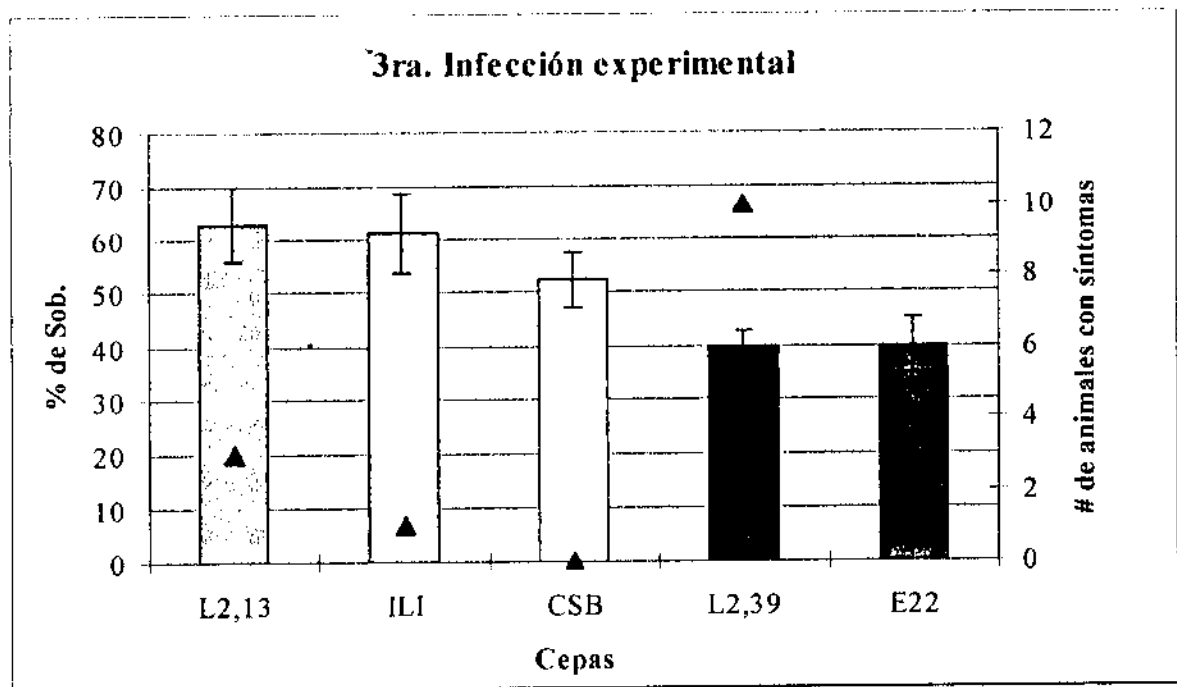
Al nivel de tasas de sobrevivencia se reconoció dos grupos estadísticamente diferentes, encontrándose el control sin bacterias entre estos dos grupos. Las tasas de sobrevivencia más bajas correspondieron a la cepa E22 causante de bolitas y la cepa L2.39. Se observaron síntomas del síndrome de zoea II en larvas infectadas con la cepa L2.39, sugiriendo su naturaleza patógena como agente causante del síndrome (tabla 8)(graf. 5).

En lo que concierne a la cepa L2.13 parece confirmarse la pérdida progresiva de patogenicidad en relación con su cultivo *in vitro*.

**Tabla 8.** Infección # 3. Concentración de bacterias en tratamientos  $10^7$  UFC/ml. 24 horas de exposición. Estadio de infección zoea I. Concentración de algas: 50.000 cel./ml. Recambio diario 100%

| Tratamiento | % de sobrev. por botella | % de sobrev. por tratamien | # de larvas con síntomas |           |             | # total de larvas con sin | % de larvas con sint. día 1y2 |
|-------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------|-------------|---------------------------|-------------------------------|
|             |                          |                            | día 1                    | día 2     | día 3       |                           |                               |
| L2.13       | 69                       | 63±7.2b                    |                          | 0         | 0           | 3                         | 5                             |
|             | 65                       |                            | 1                        | 1         | 0           |                           |                               |
|             | 55                       |                            | 0                        | 1         | 0           |                           |                               |
| ILI         | 68                       | 61,3±7.6b                  | 0                        | 0         | 0           | 1                         | 1.7                           |
|             | 63                       |                            | 0                        | 0         | 0           |                           |                               |
|             | 53                       |                            | 1                        | 0         | 0           |                           |                               |
| CSB         | 51                       | 52,3±5.1ab                 | 0                        | 0         | 0           | 0                         | 0                             |
|             | 58                       |                            | 0                        | 0         | 0           |                           |                               |
|             | 48                       |                            | 0                        | 0         | 0           |                           |                               |
| L2.39       | *                        | 40±2.8a                    | 1                        | 2         | -           | 10                        | 13                            |
|             | 38                       |                            | 1                        | 1         | 1           |                           |                               |
|             | 42                       |                            | 1                        | 2         | 1           |                           |                               |
| E22         | 37                       | 40±5.2a                    | 0                        | 1         | 0           | 3                         | 5                             |
|             | 37                       |                            | 1                        | 1         | 0           |                           |                               |
|             | 46                       |                            | 0                        | 0         | 0           |                           |                               |
|             |                          |                            | <b>Estadio</b>           | <b>Z1</b> | <b>Z1-2</b> | <b>Z2</b>                 |                               |

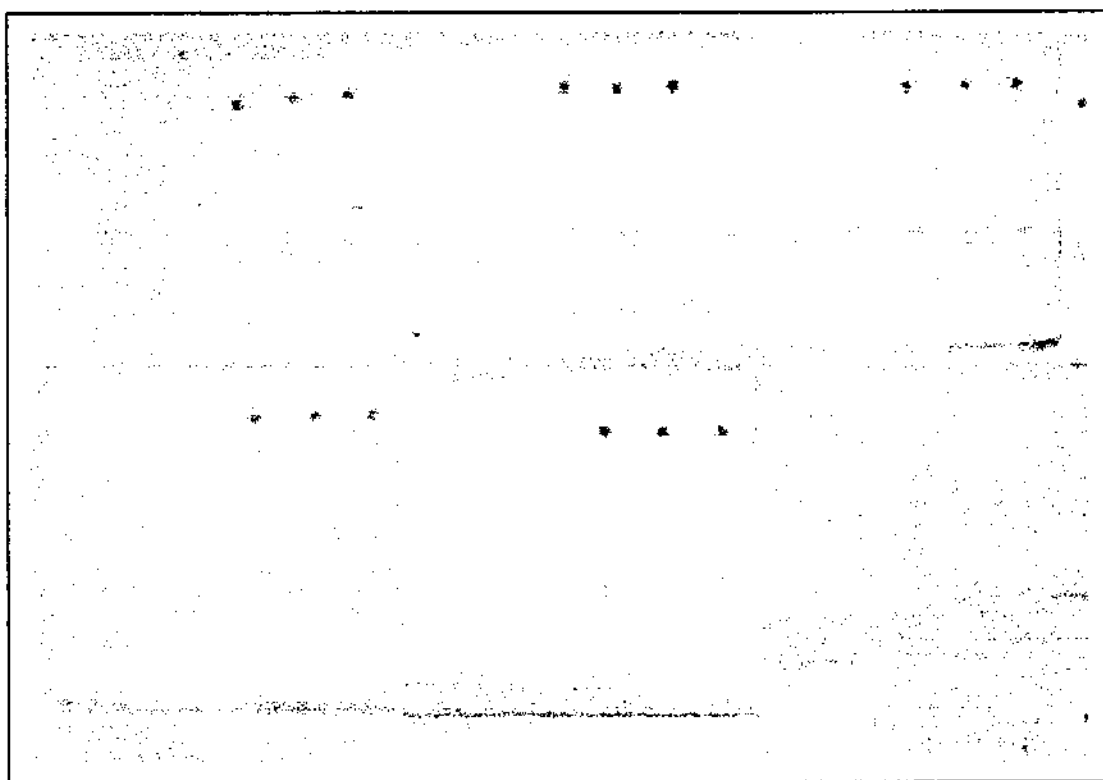
1. L2.13 NIB
2. L2.39 NIB
3. E22 *V. vulnificus*
4. CSB. Control sin bacterias
5. ILI. *V. alginolyticus*



**Gráfico 5.** Comparación de sobrevivencia y frecuencia de síntomas en los tratamientos de la infección # 3.

### 3.2.3 Comparaciones antigénicas de bacterias NIB causante del síndrome de zoea II y bacterias causantes del síndrome de bolitas

La frecuente asociación de síntomas característicos del síndrome de bolitas y de zoea respectivamente condujo a considerar que se podría tratar de las mismas cepas bacterianas. Los anticuerpos monoclonales 2C9 específicos de las bacterias S2 y E22 fueron evaluados por su reacción con las cepas L2.7, L2.13, L2.39, L2.27 y L2.10, mientras que los controles E22 e ILI fueron reconocidos por sus respectivos anticuerpos específicos 2C9 y 2B6, respectivamente, lo que indica la especificidad de los mismos.



**Foto 8.** Dot-blot de bacterias NIB, de las cuales se probó su patogenicidad. No se observa reacción positiva con los anticuerpos monoclonales 2C9 y 2B6 de E22 e ILI. Aunque se observa reacción en las bacterias L2.7 y L2.39, esta se debe a la producción de fosfatasa endógena ya que en los controles también se observa esta reacción.

No se encontraron reacciones positivas de ningún anticuerpo con las cepas L2.13, L2.27, y L2.10, esto sugiere que ninguno de los anticuerpos utilizados reconoció algún epítoto específico. En las cepas L2.7 y L2.39 se observaron reacciones positivas incluso, en donde no se habían colocado anticuerpos (anticuerpo monoclonales y conjugados). Esto sugeriría una producción de fosfatasa exógena de estas bacterias lo que provoca una reacción con el sustrato utilizado y por consiguiente se obtiene un resultado falso-positivo.

## CONCLUSIONES

Este estudio fue enfocado en base a la epidemiología analítica del síndrome de zoea II, considerando el aislamiento, la caracterización y la demostración de la patogenicidad de bacterias asociadas con animales enfermos.

La naturaleza bacteriana del o de los agentes causantes del síndrome fue considerado como hipótesis de trabajo debido a datos de epidemiología descriptiva y de histopatología.

Al nivel de las operaciones de aislamiento, fue demostrado que el medio TCBS podría ser demasiado selectivo frente a algunas cepas bacterianas, que no pueden crecer sobre este medio a pesar de ser muy importantes en términos de epidemiología en razón de su alta patogenicidad. En base a este resultado, se debe recomendar un cambio rápido de la metodología de los laboratorios de bacteriología al servicio de los laboratorios de producción debido a que están actualmente en incapacidad de detectar tales bacterias. En este sentido, el medio agar marjino podría ser utilizado como referencia hasta que se demuestre la existencia de bacterias patógenas y no aislables sobre este medio.

Tal hipótesis es concebible, siendo el proceso de adaptación parasitaria frecuentemente correlacionadas con deficiencias metabólicas. Así, bacterias patógenas pueden situarse entre dos situaciones extremas correspondientes respectivamente a microorganismos con requerimientos sencillos brindados por un medio de cultivo básico, y al otro extremo, a bacterias intracelulares obligatorias cultivables solamente en células cultivadas *in vivo* o en el huésped.

Estas observaciones se relacionan con numerosas informaciones adquiridas en bacteriología humana, en particular en *V. cholerae* para lo cual fueron descritas formas viables no cultivables pero altamente infecciosas.

Durante las operaciones de identificación bioquímica, fueron observadas nuevamente dificultades de crecimiento para algunas cepas bacterianas, esta vez en los medios de identificación bioquímica. Estos medios tienen de hecho una composición muy simple a fin de determinar una actividad metabólica, lo que los hace inadecuados para caracterizar bacterias con deficiencias como resultado de una adaptación parasitaria. En el presente estudio, estas bacterias fueron consideradas como no identificables bioquímicamente NIB, lo que corresponde a un concepto nuevo en el campo de la bacteriología del camarón.

Gracias al desarrollo reciente de técnicas alternativas de caracterización bacteriana fue posible progresar en el estudio de estas bacterias NIB. Así el caso de la AP-PCR permiten establecer los perfiles RAPD y reconocer diferentes genotipos con solamente un tipo de iniciador.

Un genotipo apareció más frecuentemente que otros (L2.10, L2.13, L2.30 y L2.31).

Para evaluar la capacidad de las bacterias aisladas de reproducir el síndrome, fueron realizadas infecciones experimentales con un protocolo optimizado de eliminación de bacterias contaminantes externas de los nauplios, esto a fin de controlar mejor el proceso de monoclonización del tracto digestivo.

La cepas de bacterias NIB revelaron ser capaces de inducir los síntomas característicos del síndrome de zoea II con una mayor reducción de la tasa de sobrevivencia. Al contrario, dos cepas aisladas de camarones enfermos e identificados como *V. tubiashii* y *V. anguillarum* no mostraron ni síntomas ni reducción de la tasa de sobrevivencia.

En base a estos resultados, se puede considerar que el síndrome de zoea II tiene efectivamente una etiología bacteriana, teniendo estas bacterias deficiencias metabólicas que las hacen difícilmente cultivables e identificables bioquímicamente. Debido al gran poder de

Durante las operaciones de identificación bioquímica, fueron observadas nuevamente dificultades de crecimiento para algunas cepas bacterianas, esta vez en los medios de identificación bioquímica. Estos medios tienen de hecho una composición muy simple a fin de determinar una actividad metabólica, lo que los hace inadecuados para caracterizar bacterias con deficiencias como resultado de una adaptación parasitaria. En el presente estudio, estas bacterias fueron consideradas como no identificables bioquímicamente NIB, lo que corresponde a un concepto nuevo en el campo de la bacteriología del camarón.

Gracias al desarrollo reciente de técnicas alternativas de caracterización bacteriana fue posible progresar en el estudio de estas bacterias NIB. Así el caso de la AP-PCR permiten establecer los perfiles RAPD y reconocer diferentes genotipos con solamente un tipo de iniciador.

Un genotipo apareció más frecuentemente que otros (L2.10, L2.13, L2.30 y L2.31).

Para evaluar la capacidad de las bacterias aisladas de reproducir el síndrome, fueron realizadas infecciones experimentales con un protocolo optimizado de eliminación de bacterias contaminantes externas de los nauplios, esto a fin de controlar mejor el proceso de monoclonización del tracto digestivo.

Las cepas de bacterias NIB revelaron ser capaces de inducir los síntomas característicos del síndrome de zoea II con una mayor reducción de la tasa de sobrevivencia. Al contrario, dos cepas aisladas de camarones enfermos e identificados como *V. tubiashii* y *V. anguillarum* no mostraron ni síntomas ni reducción de la tasa de sobrevivencia.

En base a estos resultados, se puede considerar que el síndrome de zoea II tiene efectivamente una etiología bacteriana, teniendo estas bacterias deficiencias metabólicas que las hacen difícilmente cultivables e identificables bioquímicamente. Debido al gran poder de

distinción de los marcadores RAPD, será importante buscar características genéticas comunes con valor de marcador de patogenicidad, por ejemplo la caracterización de los genes de toxinas.



Durante las operaciones de identificación bioquímica, fueron observadas nuevamente dificultades de crecimiento para algunas cepas bacterianas, esta vez en los medios de identificación bioquímica. Estos medios tienen de hecho una composición muy simple a fin de determinar una actividad metabólica, lo que los hace inadecuados para caracterizar bacterias con deficiencias como resultado de una adaptación parasitaria. En el presente estudio, estas bacterias fueron consideradas como no identificables bioquímicamente NIB, lo que corresponde a un concepto nuevo en el campo de la bacteriología del camarón.

Gracias al desarrollo reciente de técnicas alternativas de caracterización bacteriana fue posible progresar en el estudio de estas bacterias NIB. Así el caso de la AP-PCR permiten establecer los perfiles RAPD y reconocer diferentes genotipos con solamente un tipo de iniciador.

Un genotipo apareció más frecuentemente que otros (L2.10, L2.13, L2.30 y L2.31).

Para evaluar la capacidad de las bacterias aisladas de reproducir el síndrome, fueron realizadas infecciones experimentales con un protocolo optimizado de eliminación de bacterias contaminantes externas de los nauplios, esto a fin de controlar mejor el proceso de monoclonización del tracto digestivo.

La cepas de bacterias NIB revelaron ser capaces de inducir los síntomas característicos del síndrome de zoea II con una mayor reducción de la tasa de sobrevivencia. Al contrario, dos cepas aisladas de camarones enfermos e identificados como *V. tubiashii* y *V. anguillarum* no mostraron ni síntomas ni reducción de la tasa de sobrevivencia.

En base a estos resultados, se puede considerar que el síndrome de zoea II tiene efectivamente una etiología bacteriana, teniendo estas bacterias deficiencias metabólicas que las hacen difícilmente cultivables e identificables bioquímicamente. Debido al gran

## RECOMENDACIONES

### 1.- A nivel de los laboratorios de producción:

Utilizar medios no selectivos a fin de poder aislar bacterias difícilmente cultivables.

### 2.- A nivel de los laboratorios de diagnóstico:

Caracterizar bacterias en base a marcadores genéticos de tipo RAPD en complemento con criterios bioquímicos.

### 3.- A nivel de los laboratorios de investigación:

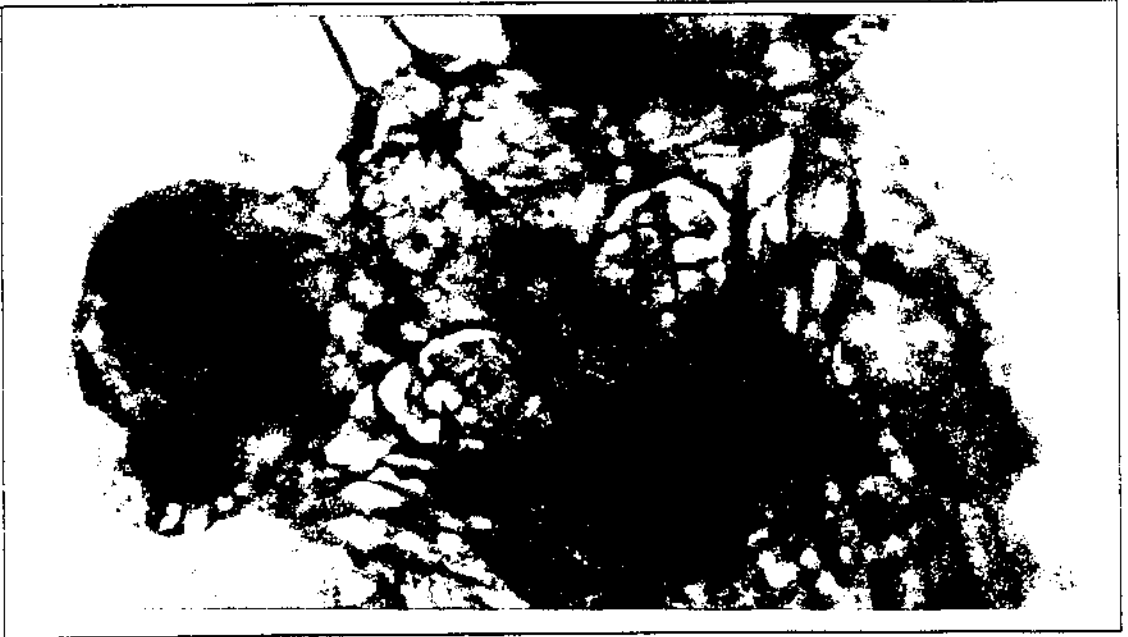
Caracterizar genéticamente el grupo de bacterias asociadas al síndrome de zoea II a fin de determinar marcadores de patogenicidad. Paralelamente a los marcadores de RAPD será útil caracterizar los genes de toxinas.

# Anexos

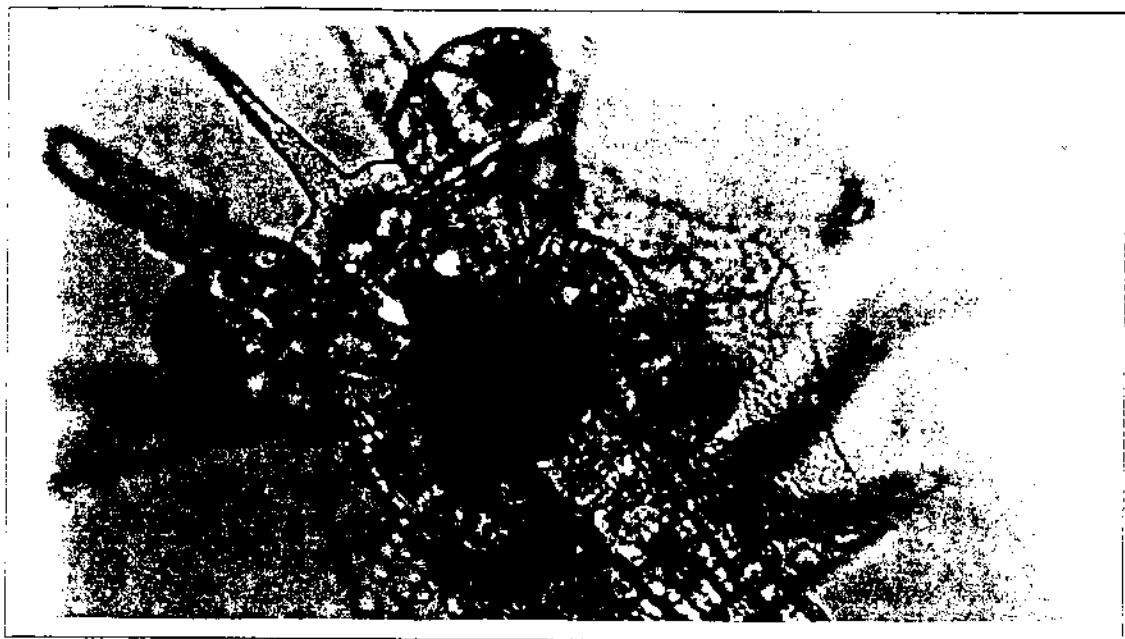
## Anexo I



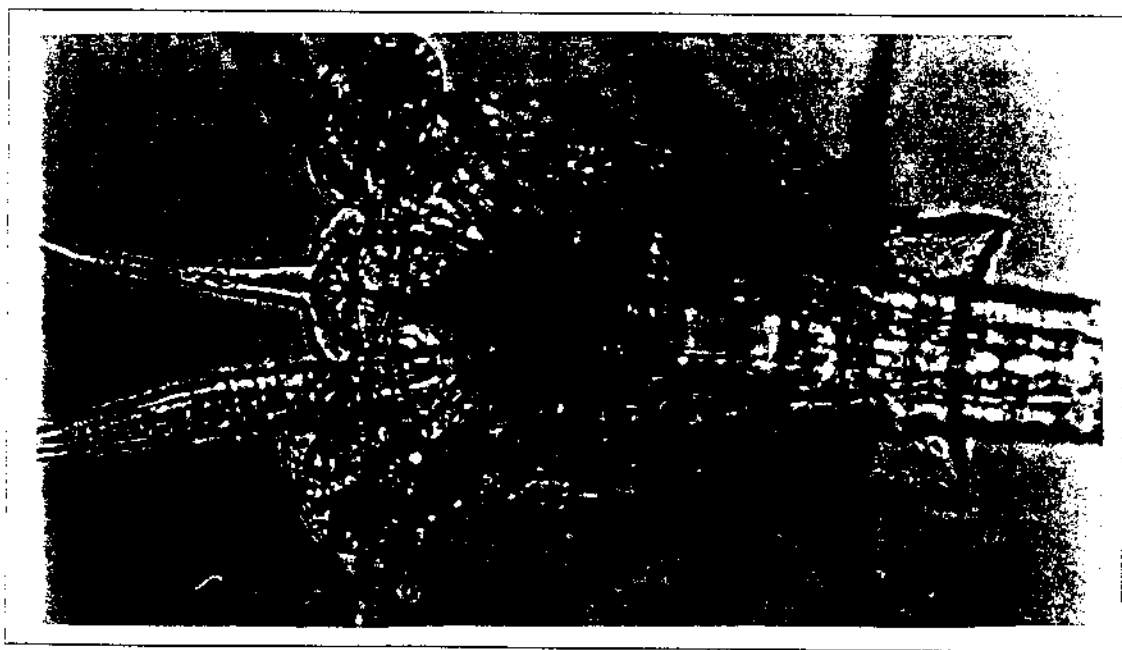
**Foto 9.** Zoea II con síndrome de bolitas infectada con cepa E 22. Presencia de bolitas en el tracto digestivo. Infección 1. Aumento 200X



**Foto 10.** Zoea II con síndrome de bolitas afectada con cepa E22. Presencia de bolitas dentro de los lóbulos superiores del hepatopáncreas. Infección 1.



**Foto 11.** Larva con típico sintoma asociado al síndrome de zoea II. Es muy difícil distinguir los lobulos del hepatopáncreas por su reducido tamaño y deformación.



**Foto 12.** Larva con signos de síndrome de zoea II. Tan solo se puede distinguir un solo lobulo y una mancha oscura.

## Anexo 2

**Tabla 9.** - Bacterias aisladas de macerados de nauplios, antes y después de su tratamiento a diferentes concentraciones de oxitetraciclina (15 y 20 ppm).

| Código | Origen                | Agar | Características            | Identificación bioquímica |
|--------|-----------------------|------|----------------------------|---------------------------|
| x1     | Nauplios (antes Atb.) | AM   | Redonda, vercosa           | Gram +                    |
| x2     | Nauplios (antes Atb.) | AM   | Amarillo, redonda, convexa | N.I.B.                    |
| x3     | Nauplios (15 ppm)     | AM   | Amarilla, redonda, convexa | N.I.B.                    |
| x4     | Nauplios (antes Atb.) | AM   | Amarilla, spreader         | N.I.B.                    |
| x6     | Nauplios (20 ppm)     | TCBS | Verde, cremosa             | N.I.B.                    |
| x7     | Nauplios (20 ppm)     | TCBS | Amarilla, redonda, convexa | <i>V. anguillarum</i>     |
| x8     | Nauplios (20 ppm)     | AM   | Anaranjada                 | N.I.B.                    |

## BIBLIOGRAFIA

1. BELL T.A., LIGHTNER D.V., 1991. Chemotherapy in Aquaculture today current practices in shrimp culture: available treatments and their efficacy. Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality. Symposium, Paris, 12-15 March 1991. pp. 50.
2. CALERO G., 1998. Enriquecimiento de agar Marino y TCBS con caldo de músculo y hepatopáncreas de camarón *Penaeus Vannamei*. Tesis Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador. 98 p.
3. CRIADO-FORNELO A., CHARDOT D., CONSTANTIN E., MIALHE E., & GRIZEL H., 1988. An outbreak of *Vibrio* caused disease in hatchery reared *Penaeus vannamei* larvae 3<sup>rd</sup> International Colloq. Pathol. Marine Aquaculture. 2-6 October 1988. Gloucester Point, VA U.S.A. pp. 19-20.
4. DIFCO MANUAL. 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Tenth edition. DIFCO Laboratories. Detroit Michigan USA.
5. DONOSO, E., 1996. Producción de anticuerpos monoclonales y desarrollos de inmunoensayos para la identificación de *vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico. Tesis Acuicultor, ESPOL., Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador. 123 p.
6. GARRIQUES, D. & AREVALO, G. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. En: Swimming through troubled water proceedings of the special session on shrimp farming. Papers presented at acuaculture'95. San Diego, California. February 1-4, 1995. 53-59.
7. GORDON, L. 1996. Tratamiento y profilaxis de las infecciones bacterianas. En: Principios de medicina interna. Harrison 13 ed. Vol. 1. pp. 692-700.

8. HAMEED, A. S. SAHUL. 1995. Susceptibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbellii* - like bacterium. En : Journal of the World Aquaculture Society, September, 1995. Vol. 26, No. 3, pp. 315-310.
9. JUAREZ, L.M. 1997. The Zoea-II Syndrome: A recently recognized problem in shrimp hatcheries. IV Simposio Centroamericano de Acuicultura. 22-24 de Abril de 1997. Tegucigalpa, Honduras. pp. 24-30.
10. LACHLAN H., OWENS L., SMITH S., 1996. A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. Appl. environ. microbiology., 62: 3548-3550.
11. LE BITOUX, J, F. 1988. Patología y terapia en las empresas de Acuicultura. Aquanet, vol. 2. No 1, pp. 39-44.
12. LIGHTNER, D.V. 1977. Virus disease of shrimp. In C.J. Sinderman (Ed.), Disease, Diagnosis and control in North American Marine Acuaquulture. Elsevier, New York. pp. 10-77.
13. LIGHTNER, D.V. 1988. Diseases of cultured penaeid shrimp and praws. In C.J. Sindermann and D.V. Lightner (Eds.), *Disease diagnosis and control in North American marineaquaculture*, 2nd ed. Elsevier, New York. pp. 8-127.
14. LIGHTNER, D.V. 1993. Shrimp pathology: Major diseases of concern to the farming industry in the Americas. En Calderón, J.V., Sandoval, V.C.(Ed.). Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. pp. 177-195.
15. LIGHTNER, D.V. & LEWIS, D.H. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Rev.*, 37 (5-6), pp. 25-28.
16. MAEDA, M. & LIAO, I.C. 1992. Effect of bacterial population on the growth of prawn larvae, *Penaeus monodon*. Bulletin of the National Research Institute of Aquaculture. 21, 25-29.



17. MORALES I., 1992. Observaciones sobre el Síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 18-23 de Octubre de 1992. Guayaquil, Ecuador. pp. 203-207.
18. MOTTE E., 1997. Apports des techniques de biologie moleculaire pour le controle des maladies en *Penaeus Vannamei*. Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes; Paris, pp 1-104
19. MUNIENSA-PEREZ M., JOFRE J., BLANCHI A.R., 1996. Identification of *Vibrio proteolyticus* with a defferencial medium a especific probe. Appl. environ. Microbiology, 62: 2673-2675.
20. PANTOJA C.R., LIGHTNER, D.V., & REDMAN, R.M. 1997. Morphological pathology of the Zoea-III syndrome of penaeid shrimp. IV Simposio Centroamericano de Acuicultura. 22-24 de Abril de 1997. Tegucigalpa, Honduras. pp. 182-184.
21. SALYERS A.A. & WHITT D.D., 1994. Bacterial Patogenesis. A Molecular Approach. Department of Microbiology, University of Illinois, USA 8, 97-110.
22. 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 Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Maritima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador. 123 p.
23. SERRANO, J. 1996. Optimización de un modelo experimental en larvas de camarón *Penaeus vannamei* para el control de infecciones por *Vibrio harveyi* (Cepa E22). Mediante la utilización de *Vibrio alginolyticus* (Cepa IL1). Tesis Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Maritima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador. 63 p.
24. SIAVICHAY, K. 1997. Aplicación de nuevas técnicas para el seguimiento bacteriológico en un laboratorio de larvas de camarón. Tesis Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Maritima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador. 64 p.

25. SMORAGIEWICZ, W., BIELECKA, M., BABUCHAWOWSKI, A., BOUTARD, A., DUBEAU, H. 1993. The probiotics. *Canadian Journal of Microbiology*. 39, 1089-1095.
26. SOLIS, A. 1996. Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas de bacterias marinas asociadas al camarón. Tesis Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil, Ecuador. 65 p.
27. YASUDA, K. & KITAO, T. 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus*. *Bate. Acuaculture*, 19,229-234.