PROGRAMA DE SALUD ANIMAL

INMUNOLOGÍA

Durante el 2000 se trabajó en tres líneas que se detallan a continuación:

1. Estudiar el efecto protector de los ß-glucanos. Cuando se planteó el estudio de inmunoestimulantes dentro del Plan de Investigación 1999-2002, se propuso realizar ensayos de desafío con bacterias. La aparición del WSSV motivó que se empleara este patógeno en los ensayos de desafío.
2. Estudio de la respuesta inmunitaria de camarones en piscinas afectadas por WSSV y evaluación del efecto de los ß-glucanos como inmunoestimulantes. Este trabajo se enmarcó en el programa "Estrategias de manejo para atenuar el impacto del WSSV". Este estudio no constaba dentro del Plan de Investigación 1999-2002, pero fue programado para el 2000 ante los problemas ocasionados por el WSSV. En este punto se trabajó en las camaroneras Veronessi, Predios Bonafide y Naturisa, en primer lugar se muestreó hemolinfa para estudiar la respuesta inmune de los camarones frente a la agresión viral. En segundo lugar, se programó las aplicaciones de ß-glucanos como inmunoestimulantes, evaluándose luego el efecto de los mismos sobre la respuesta inmune del camarón y sobre el desarrollo de las patologías.
3. Estudio de la respuesta inmune de familias (Proyecto BID 210). Este trabajo forma parte del proyecto "Generación y manipulación de la diversidad genómica en *Litopenaeus vannamei* para la acuicultura del Ecuador" y está financiado por FUNDACYT.

RESUMEN DE CONCLUSIONES

ß-glucanos como Inmunoestimulantes

1. En el ensayo de desafío los animales inmunoestimulados con ß-glucanos, presentaron menor carga viral que los del control infectado.
2. Ensayos de desafío en acuarios muestran que los camarones con WSSV mueren en postmuda, por lo que la eficacia de la inmunoestimulación se incrementa si se aplica durante la intermuda.
3. Es posible además hacer una pausa de 7 días entre aplicaciones de ß-glucanos sin afectar la respuesta inmune.

Estrategias de manejo para atenuar el impacto del WSSV

1. Durante el pico de WSSV en las piscinas camaroneras es posible encontrar animales con hemolinfa rosada, una fuerte actividad fenoloxidasa en el plasma y una elevada concentración de células hialinas.
2. Un bajo número de hemocitos y baja o ausente producción del anión superóxido preceden a la aparición de problemas en las piscinas.
3. En las camaroneras Veronessi y Predios Bonafide, la aplicación de ß-glucanos coincidió en la mayoría de los casos con descensos en la carga bacteriana y en el índice histológico.

Estudio inmunitario en familias

1. La concentración de proteínas plasmáticas y la fórmula hemocitaria son parámetros inmunitarios estables en diferentes condiciones de cultivos, pudiendo por lo tanto ser considerados en programas de selección.

.

PROYECTOS REALIZADOS Y RESULTADOS RELEVANTES

Los ß-glucanos como Inmunoestimulantes

En el año 1999 se iniciaron los estudios de los ß-glucanos para inmunoestimular a los camarones. Como resultado de estos trabajos se seleccionaron 2 dosis de estimulantes las cuales fueron capaces de incrementar la producción de anión superóxido (O_2) y de actividad fenoloxidasa (PO) en los animales. Los animales inmunoestimulados demostraron además tener menor carga viral que el control no estimulado (análisis de PCR). En el año 2000 estos trabajos continuaron, primero se realizó un ensayo de desafío por inmersión de animales inmunoestimulados y se estudió, por cuanto tiempo se puede dejar descansar a los animales entre estimulaciones. Segundo, se investigó si los efectos de la inmunoestimulación pueden mantenerse a largo plazo y si debe considerarse la muda para mejorar los resultados de la inmunoestimulación.

Resultados Relevantes

Sólo en la mitad de los acuarios inmunoestimulados y controles se presentaron mortalidades, indicando que el ensayo de desafío necesitaba aún ser estandarizado. Sin embargo de este bioensayo se obtuvo información valiosa. En primer lugar se determinó que los animales infectados con WSSV mueren en postmuda (estadíos A y B), (Figura 1). En segundo lugar, el agua puede actuar como vehículo del WSSV (los animales de todos los acuarios infectados, con

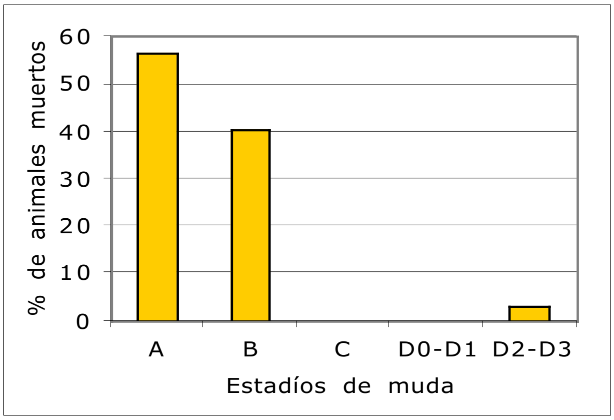


Figura 1. Mortalidades por estadío de muda en un ensayo de desafío con WSSV (A: Postmuda temprana; B: Postmuda tardía; C: Intermuda; D0-D1: Premuda temprana; D2-D3: Premuda tardía).

mortalidades y sin mortalidades, resultaron PCR positivos), sin embargo es la infección por ingestión, la que causaría fuertes mortalidades acumulativas (en acuarios del control donde hubo mortalidades, estas fueron totales, como posible producto del canibalismo). Adicionalmente se realizó una observación interesante, sólo en acuarios inmunoestimulados hubo sobrevivientes de mortalidades acumulativas masivas. Por PCR los animales inmunoestimulados tuvieron menor carga viral que los del control.

En otro bioensayo se determinó además, que se puede hacer una pausa de 7 días entre las aplicaciones de estimulante, sin afectar la respuesta inmune.

En el segundo trabajo de tesis iniciado en el año 2000 sobre el mismo tópico, se realizó un bioensayo en el que se consideró el estadío de muda para inmunoestimular a los camarones. Los resultados indicarían que el mejor período de estimulación se ubicaría del estadío B al estadío D0, siendo inútil inmunoestimular en estadíos más avanzados de premuda. Sólo en los animales estimulados de postmuda a intermuda se observó incremento de hemocitos hialinos. Cuando los hemocitos hialinos se incrementan disminuyen los semigranulosos, esta inversión de la fórmula hemocitaria ocurre en los momentos de excitación inmunitaria, ya que serían los hemocitos semigranulosos, los elementos más activos de la respuesta inmunitaria del camarón. Los hemocitos semigranulosos están implicados en fagocitosis, encapsulación y producción de péptidos antibacterianos.

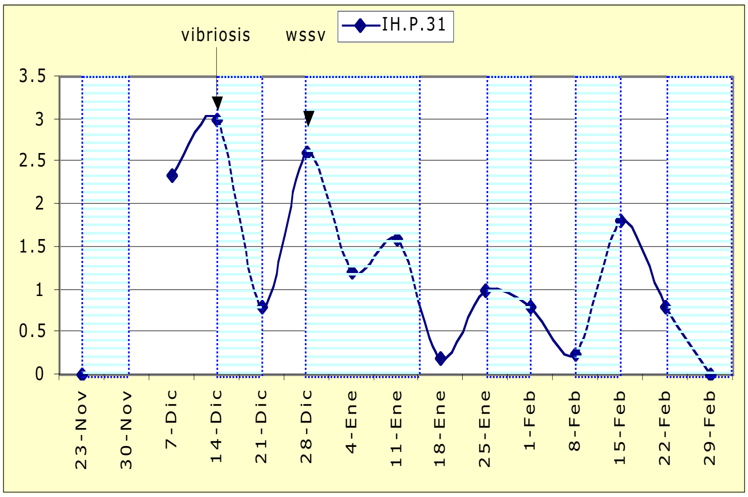


Figura 2. Series de tiempo del índice histológico (calculado en base a lesiones provocadas por vibriosis, WSSV, IHHNV, gregarinas) de los camarones de la piscina 31 de Veronessi. Las áreas sombreadas corresponden a los períodos de aplicación de ß-glucanos.

Estrategias de manejo para atenuar el impacto del WSSV.

Camaroneras Veronessi y Predios Bonafide

El área de Inmunología tomó muestras de hemolinfa de los animales para seguir la respuesta inmune del camarón durante la infección viral. En base a los resultados en laboratorio que indicaban que los animales mueren por WSSV en postmuda, se programó sobre la marcha de la corrida, suministrar los estimulantes desde temprana premuda hasta tardía premuda (D0, D3). Con la finalidad de simplificar este suministro, se muestreó en rutina el estadío de muda semanalmente.

Resultados Relevantes

Los resultados de los parámetros inmunitarios mostraron, disminución del total de hemocitos, caída de la producción del anión superóxido antes de iniciarse los problemas con WSSV. Se detectó actividad PO en el plasma del camarón, la cual dió origen a hemolinfas de color rosado. Durante los períodos críticos se observó incremento en la concentración de células hialinas, provocada posiblemente por la implicación de hemocitos semigranulosos en los procesos de defensa.

En cuanto a inmunoestimulación, la aplicación de inmunoestimulantes coincidió en la mayoría de los casos con descensos de carga bacteriana y de daños histológicos en los camarones de las piscinas 31 y 35 (Figura 2). Esto no pudo ser observado en la piscina 27. En lo que respecta a la observación de mudas, se sincronizó la aplicación del estimulante con el ciclo de muda constatando que durante cuadraturas (quiebras), los animales están en premuda y en intermuda durante la sicigia (aguaje), sin embargo entre estos dos momentos del ciclo lunar, no hubo sincronización.

Camaronera Naturisa

En esta camaronera se realizaron las mismas actividades que en las camaroneras Veronessi y Predios Bonafide.

Resultados Relevantes

En lo concerniente a parámetros inmunitarios, se confirmaron observaciones ya realizadas en la corrida anterior, caídas en la producción de superóxido precedieron a incrementos en la carga viral. Los animales de la piscina con más baja supervivencia tuvieron las más bajas producciones de superóxido. Alteraciones repentinas del ciclo de muda se presentaron antes de los períodos críticos con WSSV. Antes de las mortalidades un gran porcentaje de la población de las piscinas entra en premuda tardía, al parecer de manera brusca y rápida, observándose en un mismo urópodo hasta 3 estadíos de muda consecutivos (D0, D2, D3). Frotis teñidos de hemocitos mostraron que las células amorfas presentaron las siguientes anomalías, hemocitos hipertrofiados basófilos, hemocitos con fuerte picnosis, hemocitos fragmentados con cariorexis, hemocitos granulosos hipertrofiados y acidófilos.

Análisis inmunitario de familias

La segunda fase del proyecto "Generación y manipulación de la diversidad genómica en *Penaeus vannamei* para la acuicultura del Ecuador" (BID- 210), basó sus objetivos en obtener información inmunitaria de familias obtenidas en la primera fase. Reproductores con índices inmunitarios superiores, medios e inferiores de una compañía privada fueron cruzados a mediados de Diciembre de 1999. Las larvas fueron levantadas en CENAIM, hasta PL12. En esta etapa fueron transportadas a las instalaciones de la camaronera y mantenidas en jaulas en precriaderos hasta alcanzar 1 g. En esta talla fueron cosechadas y marcadas por familia con elastómeros. Cincuenta animales de cada familia fueron transportados al CENAIM e instalados en 2 tanques. Los animales restantes fueron distribuidos en tres precriaderos diferentes siguiendo un diseño de bloque. Los animales permanecieron en estos precriaderos hasta alcanzar la talla comercial, momento en que fueron tomadas las muestras de hemolinfa para análisis inmunitarios.

Resultados Relevantes

Los parámetros fisiológicos más estables en diferentes condiciones de cultivo, tanto en la camaronera de la compañía privada como en el CENAIM, fueron la concentración de proteínas plasmáticas y la fórmula hemocitaria, en particular la concentración de hemocitos hialinos (Figura 3). Estos resultados sugieren que estos parámetros podrían emplearse como marcadores inmunitarios en un programa de selección, ya que conservarían las mismas tendencia a pesar de las presiones ambientales, indicando que se trataría de caracteres heredables.

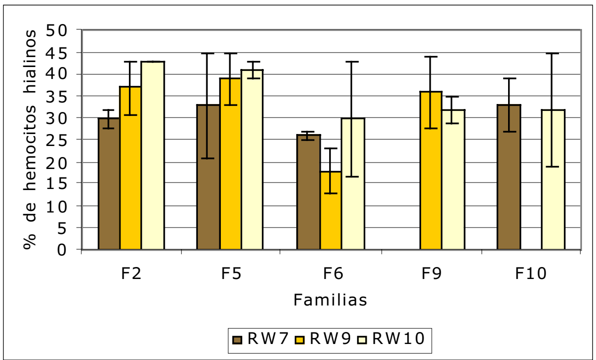


Figura 3. Concentración de hemocitos hialinos en 5 familias levantadas en 3 precriaderos de Isla Verde (RW7, RW9, RW10)

En lo concerniente a la evaluación de las familias, tanto en CENAIM como en la camaronera, la familia 6 tuvo la mayor ganancia de peso y una alta supervivencia. Esta familia tuvo la más alta respuesta inmune y un bajo porcentaje de hemocitos hialinos, por consiguiente esta familia tuvo altas concentraciones de hemocitos semigranulosos en los 3 precriaderos. .

Glosario

Actividad Fenoloxidasa (PO): La actividad fenoloxidasa, es la responsable de la melanización observada en los procesos inflamatorios de los artrópodos (manchas negras en los animales), el fenoloxidasa (PO) es la enzima clave en la cascada enzimática celular denominada profenoloxidasa (proPO). La experiencia indica valores superiores a 250 m D.O. como ideales en animales saludables.

Cuantificación del anión superóxido (O_2^-). La fagocitosis (ingestión y degradación de microbios invasores por parte de células especializadas) es la reacción de defensa celular más común y constituye la primera línea de defensa una vez que un cuerpo extraño ha pasado la cutícula (Bayne C, 1990). Paralelo a este mecanismo se encuentra un proceso de destrucción llamado choque respiratorio que es propio de las células fagocitarias maduras , este proceso se manifiesta como un incremento en la actividad metabólica de la célula y una producción de radicales de oxígeno tóxicos (entre estos el anión superóxido: O_2^-, agua oxigenada: H_2O_2, hidroxilo: OH^-, singlet de oxigeno: $_1O^2$) (Klein J., 1982). Se consideran valores ≤1 como ausencia de generación de superóxido; valores > 1.2 son aceptables, los óptimos se encuentran sobre 1.5.

Cuantificación de Proteínas plasmáticas (Prot): determinación del número total de proteínas presentes en el plasma, el plasma es la parte líquida de la hemolinfa del camarón (análoga a la sangre). La concentración de proteínas plasmáticas es un indicador importante del estado fisiológico del animal. El método utilizado es el método de Lowry, se prepara una curva estándar con una proteína de concentración conocida, este estándar sirve como referencia para la determinación de la cantidad de proteínas en las muestras. La concentración de proteínas plasmáticas en animales saludables es ≥100 mg/ml.

Hemograma: Se realizan dos tipos de análisis en el hemograma, el primero conteo del número total de hemocitos por ml de hemolinfa (NTH). El segundo conteo diferencial de hemocitos o determinación de la fórmula hemocitaria, estos datos se expresan en porcentajes. Los tipos de hemocitos en camarón son tres, incluyendo: 1) hemocitos granulosos (G) que almacenan grandes cantidades de componentes del sistema profenolóxidasa, responsable de la melanización, intervienen además en encapsulación y nodulación. 2) Hemocitos Hialinos (H) que intervienen en fagocitosis y coagulación. Hemocitos semigranulosos (SG), los cuales son muy activos e intervienen en fagocitosis, liberación de profenolóxidasa, encapsulación y nodulación. Un juvenil saludable tiene alrededor de 20 millones de hemocitos por ml.

RAPD: Técnica de PCR que utiliza iniciadores aleatorios para obtener perfiles de amplificación de una especie o población. Tiene la ventaja de que no se requiere conocimiento previos de la secuencia del ADN que se va a utilizar.

Virología

El objetivo de este programa es evaluar la presencia de virus tales como: el virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV), el virus del Síndrome de Taura (TSV), el Baculovirus penaei (BP) y el Virus de la Mancha Blanca (WSSV), en camarones silvestres y de piscinas. Este programa enfatizó todo su trabajo en el estudio del WSSV, debido a la necesidad imperiosa de conocer cómo actúa y que mecanismos pueden influir en la supervivencia de *L. vannamei* afectados con este patógeno. Por ello, el estudio de otros virus quedó pospuesto.

Resumen de Conclusiones

Hipótesis de la Tolerancia

Los ensayos efectuados permiten inicialmente establecer la existencia de una estrecha relación entre el grado de infección viral y el nivel de estrés, lo cual indica el papel fundamental que tiene el manejo aplicado al estanque durante el proceso de producción para atenuar el impacto del virus sobre la población afectada. Por otro lado, la ingestión de alimento infectado bastaría para provocar mortalidad en una población de camarones.

El incremento de la temperatura y la reducción de oxígeno contribuirían de forma escasa a agravar el proceso de infección y la subsecuente mortalidad del cultivo, mientras que la reducción de temperatura es un potencial disparador de la infección.

Finalmente, este primer set de pruebas establece que nuevos ensayos habrán de realizarse antes de poder hacer conclusiones definitivas sobre el uso potencial de la *tolerina* como preventivo de infecciones virales. Variables tales como la determinación del período crítico para la aplicación de las *tolerinas*, así como el incremento del número de réplicas durante las pruebas de desafío, contribuirán a dilucidar si la Hipótesis de la Tolerancia es verdadera o no.

PROYECTOS REALIZADOS Y RESULTADOS RELEVANTES

Ensayos para verificar la hipótesis de la *Tolerancia* viral: Determinación del Protocolo

Según la Hipótesis de la Tolerancia propuesta por Tim Flegel y Tirasak Pasharawipas (1997), el camarón estaría en capacidad de tolerar o acostumbrarse a virus presentes en el medio, siempre que exista una exposición previa a él en sus estadíos larvarios iniciales. Asimismo, esta hipótesis sostiene que la causa fundamental de la muerte del hospedero sería el desencadenamiento de la Apoptosis, llamada también suicidio celular programado, y que la exposición temprana al virus la suprimiría. Esto se traduciría en una reducción de la mortalidad de poblaciones de camarones infectados por un patógeno viral. Para probar esta hipótesis se trabajo en la preparación y aplicación de tolerinas.

Elaboración de tolerinas

Se efectuaron varias pruebas preliminares para establecer la temperatura y tiempo de exposición requeridos para obtener virus de WSSV inactivado (*tolerinas*) de manera confiable. Estas pruebas incluyeron exposiciones de suspensiones virales a: 55, 60 y 70ºC, por periodos de 5, 10 y 15 minutos, las cuales luego se inyectaban a camarones PCR positivo muy leve. En aquellos casos donde se producía el deceso de los camarones inyectados, el análisis de PCR indicó que poseían un grado de infección severo con WSSV. Estos resultados mostraron que los grupos de camarones supervivientes fueron aquellos inyectados con suspensiones virales expuestas a 70 ºC, y que 5 minutos era un periodo suficiente para inactivar el virus.

Protocolo de aplicación de las tolerinas

Con el protocolo establecido para la producción de *tolerinas*, se inició la etapa de utilización y evaluación de *tolerinas* en larvas de camarón, las cuales serían sometidas posteriormente a desafíos con WSSV. Para tal efecto, se utilizaron postlarvas de *L. vannamei* procedentes de una larvicultura levantada en CENAIM. Se evaluaron los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1: WSSV inactivo (*tolerinas*) por inmersión

Tratamiento 2: WSSV inactivo (*tolerinas*) por ingestión

Tratamiento 3: WSSV activo por ingestión

Control: Sin exposición previa a WSSV activo o inactivo.

Para estandarizar la dosis de viriones que habría de suministrarse en los tratamientos, se utilizó la información de ensayos hechos en CENAIM, donde se encontró que larvas de *L. vannamei* se infectaban por inmersión en agua con una concentración de 2000 viriones/ul. Este valor se estimó mediante diluciones en serie, analizadas por PCR, hechas a partir del extracto viral. Para el tratamiento 1 por inmersión se aplicó al agua una vez al día. En el caso del tratamiento 2 por la vía de ingestión, se utilizó artemias expuestas al virus o a tolerinas. Las fases de suministro del WSSV activo o inactivo fueron: Zoea 1, Mysis 1, PL 1 y PL 12, de acuerdo a lo sugerido por Tim Flegel, aplicando la dosis antes mencionada en cada fase.

Protocolo de desafío

Se realizaron dos ensayos para comparar dos formas de realizar el desafío

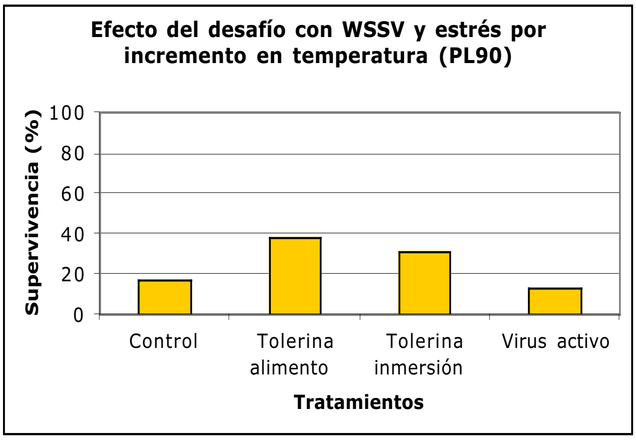
1) Suministrando como alimento camarón infectado en forma natural proveniente de una camaronera comercial
2) Suministrando como alimento camarón infectado en forma artificial, por inyección intramuscular, realizado en CENAIM

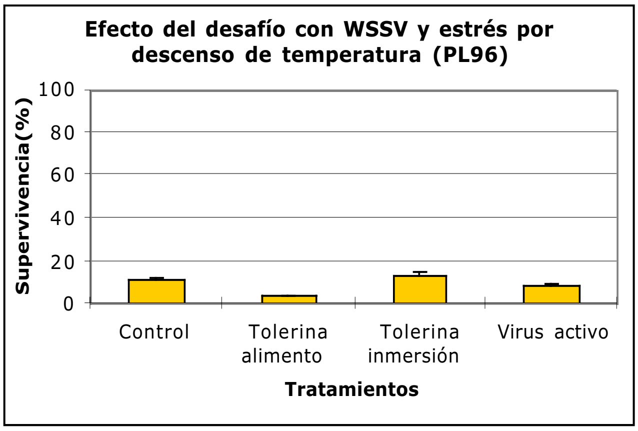
No se observaron diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, se encontró que el uso de alimento infectado por inyección intramuscular causó una mayor mortalidad (80%) que la registrada por el suministro de camarón infectado proveniente de una piscina (50%). La razón primordial de la diferencia entre las mortalidades alcanzadas posiblemente radica en el incremento de la carga viral en el alimento infectado, puesto que la evidencia del PCR señaló que la mortalidad menor estuvo vinculada con un grado de infección medio o leve de los supervivientes, mientras que la mortalidad mayor, se presentó con un grado severo de infección de los otros supervivientes.

Considerando la utilidad de disponer de poblaciones de camarones tratados con WSSV activo o con *tolerinas*, se elaboraron una serie de pruebas que incorporaron estrés por factores ambientales como parte de las pruebas de desafío, para tratar de establecer su rol como posible detonador de la infección y la mortalidad.

Desafío y estrés

Se realizaron 6 ensayos (70 días) para definir la metodología y evaluar el efecto combinado del desafío y el estrés ambiental. Se evaluaron varios tipos de estrés incluyendo alta y baja temperatura y reducción del oxígeno disuelto, a diferentes niveles y por diferentes períodos de tiempo. También se evaluó la duración del ensayo y diferentes densidades. Se compararon los mismos tratamientos antes descritos y se incluyó un control para evaluar el efecto sólo del estrés. Con base en todos los resultados se determinó que hay un efecto sinergístico con un descenso de temperatura mientras que el incremento en temperatura y anoxia no afectan tanto.





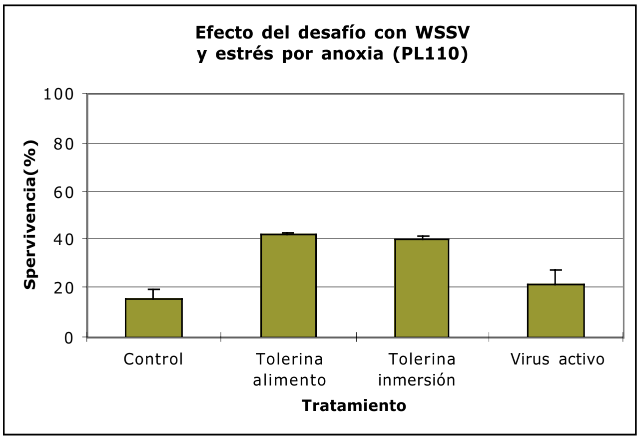


Figura 4. Supervivencia de animales expuestos a tolerina (en el alimento y por inmersión) y a virus activo sometidos a diferentes pruebas de desafío y estrés.

Resultados Relevantes

Esta fase de ensayos han permitido determinar un protocolo efectivo para evaluar el efecto de tolerinas en camarones, estableciendo el uso de PL30-35 a una densidad de 1.75 PL/L, un número mínimo de réplicas de 7, un período mínimo de 3 días de exposición a estrés post infección y una duración total de 12 días por ensayo. Todo esto constituirá el protocolo de trabajo en ensayos posteriores.

Monitoreo Epidemiológico

Durante el año 2000 se desarrollaron varios estudios. El primero consistió en la participación en un monitoreo de la epidemiología del estanque y análisis de la información en un grupo de piscinas que tuvieron un manejo orientado a mantener un ecosistema estable. El segundo estudio consistió en la ejecución de tres monitoreos de patologías de camarón. Esta actividad tuvo una doble finalidad, ya que a más de observar la evolución espacial y temporal de las patologías del camarón, la información generada está sirviendo para construir un sistema de alerta epidemiológico para la acuicultura del camarón, por medio del desarrollo de un Sistema de Información Geográfico (GIS), cuya terminación está previsto ocurra en el 2002.

Resumen de Conclusiones

Seguimiento a nivel de estanque

1. Los resultados sugieren que la carga bacteriana del animal presenta un patrón similar a la carga bacteriana del ambiente (agua y suelo).
2. Las variaciones ambientales (cambios repentinos de temperatura, reposición de agua y precipitaciones) influyeron sobre la presencia microbiana en los camarones y la severidad de las infecciones.
3. La aparición de lesiones histopatológicas relacionadas a vibriosis fue observada antes de la aparición de lesiones relacionadas a WSSV.

Seguimiento a nivel ragional

1. Las prevalencias de WSSV e IHHNV fueron altas en las tres estaciones climáticas estudiadas en el 2000.
2. La prevalencia (promedios ponderados) de WSSV e IHHNV se incrementó de marzo/abril (época húmeda) a agosto/septiembre (época seca) y decreció ligeramente de agosto/septiembre a noviembre/diciembre (transición climática).
3. Durante la tercera campaña de monitoreo del 2000, se observó que el nivel de infección no estuvo relacionado con el nivel de producción de las piscinas.

Proyectos Realizados y Resultados Relevantes

Seguimiento a nivel de estanque

Este monitoreo fue un estudio multidisciplinario que se realizó conjuntamente entre los programas de Monitoreo y Epidemiología, bajo el marco del proyecto "Estrategias de manejo en piscinas camaroneras para atenuar el impacto del WSSV". En el mencionado proyecto se muestrearon 4 piscinas de la camaronera Veronessi (Chongón) y 2 piscinas de la Camaronera Predios Bonafide (El Morro). Debido a que el objetivo fundamental era estudiar la evolución en tiempo de los problemas patológicos de las piscinas, el estudio se concentró en las piscinas donde había mayor información (piscinas 27, 31 y 35 de la camaronera Veronessi). Los muestreos se realizaron semanalmente en camarones, agua y suelo, durante un ciclo de producción en cada una de las tres piscinas. La recolección de las muestras se realizó del 23 de noviembre de 1999 al 29 de febrero del 2000. Sin embargo, el análisis de la información se realizó principalmente en los meses posteriores a la cosecha (marzo del 2000). Adicionalmente, se estudió la relación entre los problemas patológicos y los parámetros ambientales y de manejo; y la dinámica de la aparición y evolución del WSSV y su relación con otras patologías del camarón.

Los resultados sugieren que hay una relación entre la carga bacteriana del animal y la del agua y del suelo (Figura 5). Este aspecto es interesante tomarlo en consideración para el manejo de las piscinas. Las variaciones ambientales (cambios repentinos de temperatura, reposición de agua y precipitaciones) influyeron sobre la presencia microbiana en los camarones y la severidad de las infecciones (Figura 6), estando relacionadas a incrementos de vibrios y vibriosis (lesiones observadas en histología). Un análisis de multivariables mostró un sinergismo entre vibrios en el animal y la presencia de WSSV, sin embargo, en las piscinas se observó la aparición de lesiones histopatológicas relacionadas a vibriosis, antes de lesiones relacionadas al virus. Las mortalidades observadas en las piscinas podrían atribuirse a vibriosis y WSSV, que en forma general, se presentaron de forma severa entre la cuarta y novena semana de cultivo. Desde la novena semana de cultivo, el WSSV no causó serios problemas. Durante los períodos de aplicación de ß-glucanos se observó disminución de vibrios en los camarones. Dentro de las medidas para controlar la carga microbiológica del

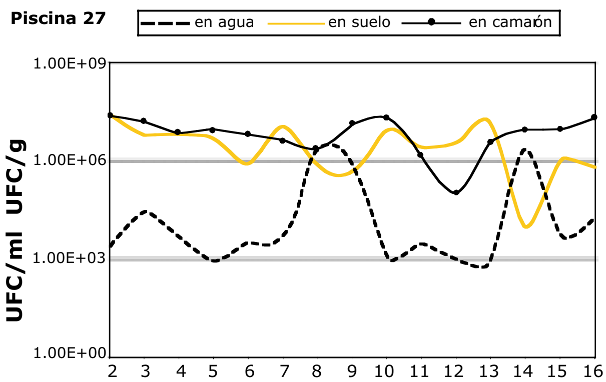


Figura 5. Niveles de bacterias del a piscina 27 de Veronessi recuperadas en agra marino de agua, suelo y camarón, (UFC/g de camarón o suelo y en UFC/ml de agua) durante 16 semanas

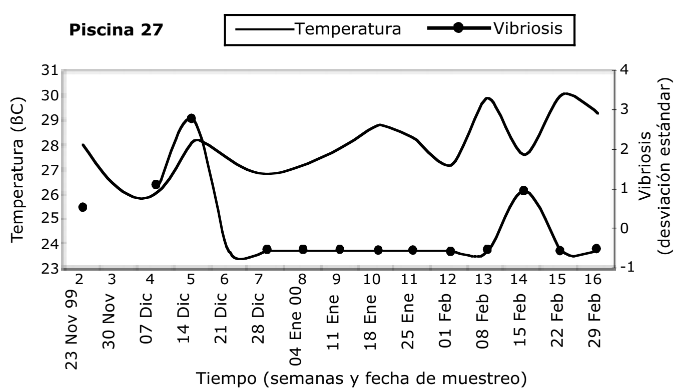


Figura 6. Serie de tiempo de temperatura del agua y vibriosis (histología) en el camarón en la piscina 27 de Veronessi. Los valores de vibriosis están normalizados y expresados como diferencias estandarizadas. Se incluyen las fechas de muestreo

estanque se observó que la aplicación de antibióticos coincidió con un incremento del WSSV (PCR) y una detención del crecimiento en el camarón.

Seguimiento a nivel ragional

Durante el 2000 se realizaron tres monitoreos de patologías en camaroneras, con el objeto de observar las variaciones geográficas y temporales de las principales patologías en las cuatro provincias costeras del país. En total, las tres campañas cubrieron 41 camaroneras. La mayoría de las camaroneras tienen la disposición a seguir colaborando con este tipo de monitoreo, prueba de esto es que de todo el grupo, 24 camaroneras que fueron muestreadas en la segunda campaña del 2000, también fueron muestreadas en la tercera campaña. En las camaroneras de Esmeraldas, Manabí y algunas de Guayas y El Oro, las muestras fueron colectadas por el personal de las camaroneras y enviadas al CENAIM para su posterior análisis. Los resultados de este sistema de muestreo han sido positivos y sugieren que con estas camaroneras se podría armar una red de muestreo sin necesidad que el personal de CENAIM se movilice a las camaroneras.

Monitoreo de marzo–abril del 2000 (época húmeda)

La etapa del monitoreo exploratorio de virus en el medio silvestre fue suspendido debido a la marcada escasez de larvas y reproductores silvestres, debido principalmente a las condiciones climáticas frías. Para el monitoreo en las camaroneras se colectaron muestras de camarón de 33 piscinas en 17 camaroneras en todo el país que presentaron o que estaban situadas en zonas con problemas.

De las 33 piscinas con problemas, el 44 % de todos los camarones analizados por histología estaba infectado con alguna patología. De este grupo de camarones infectados, la mayor causa de patología en las cuatro provincias fue la presencia de WSSV (43% de los camarones), seguido de una patología desconocida de picknosis y kariorrhexis con el 39% de los camarones infectados, y gregarinas con el 18%. IHHNV, zoothamium, melanización en branquias, bacterias, vibriosis y protozoarios representaron en cada caso, entre el 8 y 2% de los animales infectados. Se observó picknosis y kariorrhexis (por histología) en forma dispersa en todas las provincias, especialmente en las camaroneras del Golfo de Guayaquil. En ciertos casos, un mismo camarón presentó lesiones producidas por más de un tipo de virus, lo cual indicaría que el debilitamiento del huésped provocado por la presencia de un patógeno viral, favorecería el ingreso de un virus diferente. WSSV e IHHNV (por PCR) se presentaron en las cuatro provincias costeras de Ecuador. Por análisis de PCR, el 86 y 69% (promedios ponderados) de las piscinas presentaron patologías de WSSV e IHHNV, respectivamente (Tabla 1).

Monitoreo de agosto/septiembre (época seca)

Se colectaron muestras de camarón para análisis de histología y PCR (WSSV e IHHNV) en 36 camaroneras distribuidas en todo el país. En general, el muestreo se realizó en dos piscinas de cada camaronera, que según el camaronero, presentaban "problemas". De 54 piscinas muestreadas para PCR, el 93% y el 82% resultaron PCR positivas para WSSV e IHHNV, respectivamente. La mayoría de los casos de WSSV por PCR fueron positivos severos. El análisis de histología de 67 piscinas reveló que el 78% de las piscinas presentaron picknosis y kariorrhexis. Guayas y Esmeraldas tuvieron la más alta y baja incidencia, respectivamente. En Esmeraldas y Manabí se presentó con intensidades entre muy leve y leve. Sin embargo, en Guayas se observó picknosis y kariorrhexis con intensidades entre muy leve y medio. En la Provincia de El Oro, se observó picknosis y kariorrhexis con intensidad muy leve. En general, se observó que las intensidades de WSSV e IHHNV (por análisis de PCR) se incrementaron de abril a agosto/septiembre.

Monitoreo de noviembre/diciembre (época de transición climática)

Las camaroneras muestreadas en esta campaña, también fueron muestreadas en agosto-septiembre, exceptuando tres camaroneras localizadas en Esmeraldas, Manabí y Guayas. Adicionalmente, durante esta campaña se muestrearon piscinas que en producción fueron ejemplos de resultados "buenos", "regulares" y "malos" con el objeto de estudiar las relaciones entre los niveles de infección y la producción en las piscinas.

Tabla 1. Porcentaje de piscinas positivas a WSSV e IHHNV por análisis de PCR en las 3 campañas de muestreo

Provincia	% de positivos a WSSV (por PCR)			% de positivos a IHHNV (por PCR)		
	Mar/abr	Ago/sep	Dic	Mar/abr	Ago/sep	Dic
Esmeraldas	100	100	100	50	100	60
Manabí	67	100	88	100	92	75
Guayas	82	93	89	68	74	75
El Oro	100	57	91	17	57	91
Promedio ponderado	86	93	90	69	82	**77**

Aunque el promedio ponderado en diciembre de positivos para WSSV y IHHNV disminuyó respecto a agosto/septiembre, la prevalencia de ambos virus siguió siendo alta. En diciembre, de 71 piscinas, el 90% y el 77% resultaron PCR positivas para WSSV e IHHNV, respectivamente. Se determinó que el nivel de infección no estuvo relacionado con el nivel de producción de las piscinas. El análisis de histología de 71 piscinas mostró que el 64% (promedio ponderado) de las piscinas presentaron picknosis y kariorrhexis. Se observó que la intensidad de las infecciones de WSSV e IHHNV (por análisis de PCR) decreció ligeramente con respecto al muestreo de agosto-septiembre.

Sistema de alerta epidemiológico para la acuicultura del camarón

Durante el 2000 se empezó a crear el Sistema de Información Geográfica, cuya construcción está a cargo del Centro de Estudios Medio Ambientales (CEMA) de la ESPOL. El objetivo del proyecto es desarrollar un sistema de alerta capaz de detectar cualquier brote de enfermedad en las camaroneras del Golfo de Guayaquil. Específicamente, la actividad es desarrollada como parte de la componente 4.3: "Desarrollo de un sistema de alerta en acuicultura por medio del uso de un sistema de información geográfica" del proyecto de VLIR-ESPOL, que se lleva a cabo entre la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) y el Consejo de Universidades Flamencas – Bélgica (VLIR). El apoyo técnico proviene de la Universidad Libre de Bruselas (VUB) y del Centro de Estudios Medio Ambientales de la ESPOL (CEMA). Este proyecto empezó en el 2000 y culminará en el 2002. Por tanto, todavía no se han obtenido resultados. Sin embargo, a continuación se resume las actividades realizadas:

Se seleccionaron las variables que alimentarán el GIS: enfermedades (resultados de histología y PCR); ambientales (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y turbidez); manejo (resultado del PCR de las larvas, densidad de siembra, origen de la larva, tipo de siembra, tamaño de las piscinas, incremento en peso del camarón, tasa de conversión alimenticia promedio, días de cultivo, supervivencia y producción final).

Se realizaron los monitoreos de patologías de camarón en las provincias del Guayas y El Oro, durante la estación seca (agosto/septiembre) y en el período de transición climática (noviembre/diciembre) y la información (enfermedades, ambiente, manejo y producción) fue enviado al CEMA a medida que se fue generando.

Se posicionó geográficamente a las camaroneras y piscinas participantes en las dos campañas anteriormente mencionadas. Se seleccionaron los elementos cartográficos. Al momento se está utilizando la cartografía que se implementó en el GIS del Estero Salado-Río Guayas realizado por CEMA VUB y el Instituto Oceanográfico de la Armada (INOCAR).

PROBIÓTICOS

El objetivo general para el período 1999 -2002 es el de obtener cepas probióticas en el camarón y conocer sus mecanismos de acción mediante el establecimiento de pruebas experimentales, utilizándolas como medio alternativo para combatir enfermedades bacterianas en los sistemas de producción.

RESUMEN DE CONCLUSIONES

Probióticos como inmunoestimulantes

1. Se seleccionaron 5 de 80 cepas bacterianas por sus cualidades colonizadoras y se determinó su perfil RAPD.

Uso de probióticos en larvicultura

1. El uso del probiótico "*Vibrio alginolyticus*" en larvicultura es justificable como medio de manejo para la no utilización de antibióticos, pues no interfiere en la supervivencia de las larvas e impide la proliferación de bacterias patógenas.
2. Los cambio de estadío mysis 2-3 y PL 2-3 son críticos en larvicultura, y son cuando la cepa probiótica debe ser manejada adecuadamente para mantener la normalidad en el cultivo.
3. La cepa debe ser administrada entre las 5 y 7 horas de producción, no antes o después, para mantener su calidad.

4. Se observó mejores resultados en los ciclos de producción de larvas que mantuvieron un conteo superior de 10^4 bacterias/g de animal de la bacteria probiótica.

Proyectos Realizados y Resultados Relevantes

Probióticos como inmunoestimulantes

Este proyecto tuvo como objetivo aislar bacterias probióticas con cualidades inmunoestimulantes. El patógeno utilizado para probar y seleccionar los probióticos fue *Vibrio vulnificus* cepa S2. Esta bacteria causa mortalidades en larvas y lesiones en sistema digestivo de juveniles. Además el CENAIM cuenta con las herramientas moleculares para detectarla específicamente, situación que facilita los bioensayos de exclusión competitiva *in vivo*.

Las actividades programadas incluyeron, a) aislamiento de bacterias del tracto digestivo de animales de apariencia sana (verificación por histología y PCR). b) Ensayos *in vitro* para determinar si esos aislados inhiben el crecimiento de S2. c) Determinar el perfil RAPD (Técnica de PCR que utiliza iniciadores aleatorios para obtener perfiles de amplificación de una especie o población. Tiene la ventaja de que no se requiere conocimiento previos de la secuencia del ADN que se va a utilizar) con 3 iniciadores, de las bacterias seleccionadas, a fin de disponer de una herramienta confiable y rápida de detección. d) Determinar *in vivo,* las cualidades colonizadoras de esas bacterias. e) Determinar su capacidad de inhibir o limitar la colonización de S2 *in vivo*. f) Determinar *in vivo* e *in vitro* las propiedades inmunoestimulantes de esas bacterias. Este proyecto está siendo desarrollado por una estudiante de maestría, durante el período 2000-2001.

Resultados Relevantes

Se aislaron 80 cepas bacterianas de animales silvestres. Se seleccionaron 14 cepas aisladas de animales saludable (sin lesiones histopatológicas). Se determinó *in vitro* las cualidades antagónicas sobre S2 de 6 aislados (Figura 7). Antes de proceder con el bioensayo para estudiar las cualidades colonizadoras de estas bacterias se determinó el perfil RAPD con dos iniciadores. Los resultados del bioensayo de colonización indicaron fuertes cualidades colonizadoras, en 5 de los 6 aislados bacterianos utilizados. Otros trabajos concernientes a esta tesis se están realizando en el año 2001.

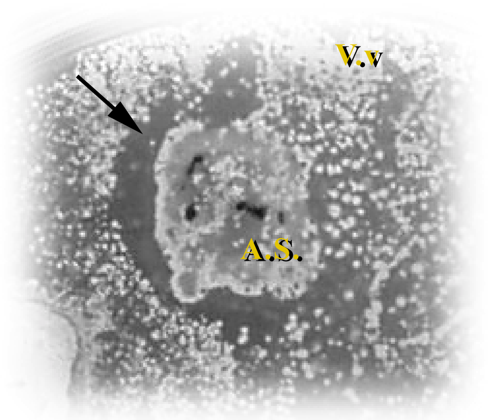


Figura 7. Efecto *in vitro,* de un aislado bacteriano de camarón (A.S.) sobre el patógeno *V. vulnificus (V.v)*. Con la flecha se señala el halo de inhibición. Las dos bacterias están creciendo en medio LB Agar.

Antibióticos

El programa de Salud Animal busca el mejoramiento de herramientas de control y prevención de enfermedades para obtener cambios positivos hacia el manejo sostenible de la industria. Para cumplir con este objetivo, se contempla la sensibilización del sector productor en cuanto al uso y abuso de antibióticos en los cultivos de camarón. Consciente el CENAIM de la problemática nacional e internacional que conlleva el uso de este tipo de drogas en la industria camaronera; propone dentro de sus trabajos de investigación afrontar en el 2000 las pérdidas y la residualidad de los mismos. Bajo esta perspectiva a finales de 1999 se implanta dentro de sus análisis para la investigación y servicios a terceros, la determinación de residuos de oxitetraciclina (antibiótico mayormente empleado por la industria) en tejidos de camarón y dietas artificiales mediante cromatografía. Posteriormente a principios del 2000 se implementa un nuevo método para el análisis de enrofloxacina mediante HPLC.

Resumen de Conclusiones

1. Las pérdidas obtenidas como efecto del proceso de manufactura aplicado en los antibióticos ensayados mostraron resultados distintos. La oxitetracilina (OTC) mostró mayor estabilidad, sus pérdidas fueron bajas, siendo las temperaturas de 60ºC (secado) el principal factor que degradó el antibiótico. Caso contrario, la estabilidad de la enrofloxacina (EF) se vió afectada por factores desconocidos durante el proceso. Un valor de pérdida acumulada cercano al 81% se obtuvo durante las pruebas.
2. La lixiviación de la OTC en el agua estuvo altamente influenciada por la salinidad. El comportamiento de lixiviación de la EF, demuestra pérdidas elevadas (80%) en un corto lapso de tiempo (30 min.).
3. El incremento de las concentraciones de OTC y EF en tejido, no fue paralelo al aumento de la dosis suministrada, originándose con cada una de las dietas una meseta de concentración en músculo y hepatopáncreas.
4. Niveles inferiores a los tolerados por la FDA, fueron cuantificados 4 días después de suspender el tratamiento con las dietas de 1 y 5 ppt OTC. La dieta con 10 ppt requirió de 7 días.

Proyectos Realizados y Resultados Relevantes

Pérdidas, acumulación y eliminación de oxitetraciclina

La aplicación indiscriminada de antibióticos en laboratorios de larvas y piscinas camaroneras debido a prácticas profilácticas constantes, así como, al pobre o inexistente control estatal; es motivo de análisis por parte del sector privado, académico y científico del país (El Mundo Acuícola, 1998). En la actualidad este tipo de manejos bajo evaluación demuestran la creciente preocupación internacional sobre la calidad de los productos acuícolas y el establecimiento de regulaciones tales como límites máximos de residuos (LMR). El objetivo de este estudio fue establecer valores reales de concentración del antibiótico en el tejido del animal, así como en el alimento utilizado durante el tratamiento. Se realizaron dos trabajos de laboratorio y uno en tanques experimentales con animales juveniles.

Resultados Relevantes

Pérdidas de OTC por manufactura

A diferencia del mayor porcentaje de pérdida (13.1%) observado durante el paso final de preparación del pellet (secado), en promedio los valores de pérdida en cada una de las etapas de manufactura estudiados mostraron valores bajos. El promedio en porcentaje de pérdida acumulada, luego del proceso de manufactura del pellet no fue mayor al 20%.

Pérdidas de OTC por lixiviación

Los porcentajes de pérdida de OTC por lixiviación mostraron ser dependientes de la salinidad presente en el medio. Se observaron pérdidas promedio del 31.6% (35 ups) del fármaco para las tres dietas medicadas en un tiempo de 2 horas.

Acumulación y eliminación de OTC

Juveniles de *L. vannamei* tratados con dietas medicadas mostraron doso-dependencia en la acumulación y eliminación de la droga (Figura 8). Niveles de acumulación promedios de 2.6, 9.1 y 14.1 µg OTC/g de tejido animal fueron identificados dentro de los 14 días de tratamiento, con las dietas medicadas de 1, 5, 10g OTC/kg dieta respectivamente. Todos los tratamientos mostraron una rápida acumulación del antibiótico. Luego del período de exposición, los niveles de OTC en músculo decrecieron rápidamente. Pocos días después de la supresión del tratamiento (5.3 días en promedio), los niveles cayeron hasta valores por debajo de los 2 ppm -nivel tolerado por la FDA para muestras de camarón cultivado.

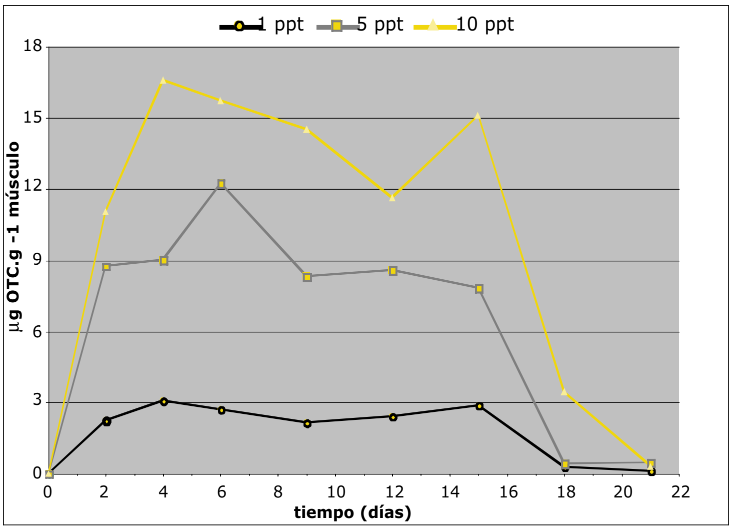


Figura 8. Curvas de acumulación-eliminación de OTC en tejido de camarón *L. vannamei*

Relación consumo de alimento *vs* nivel de medicación

Como resultado de los diferentes tratamientos, se observó una relación inversa entre el consumo de alimento y el nivel de OTC en las dietas aunque los valores no presentaron diferencias significativas.

Distribución de los residuos de enrofloxacina en el camarón

Hasta 1998 la oxitetraciclina fue uno de los antibióticos mayormente empleados en el control de las enfermedades bacterianas, presentes en el cultivo de camarones. Hoy en día, la enrofloxacina (EF), fluoroquinolona de amplio espectro de acción, se ha empezado a utilizar en el cultivo de camarones. Sin embargo, pocos o ninguno son los reportes que dan cuenta del comportamiento y/o dosificación para el uso adecuado de esta droga. El objetivo de este estudio fue proveer una herramienta analítica que sirva para cuali-cuantificar el componente, identificar los niveles de pérdidas durante los procesos de manufactura y lixiviación, establecer valores reales de concentración del antibiótico en el tejido del animal, así como determinar el tiempo de eliminación. Se realizaron dos trabajos de laboratorio y uno en tanques experimentales con animales juveniles.

Resultados Relevantes

Pérdidas por manufactura

Se analizó la concentración de EF presente en muestras de diferentes etapas del proceso de manufactura de tres plantas procesadoras; identificándose un valor promedio de pérdida acumulada, independiente del tipo de proceso utilizado, cercano al 81%.

Pérdidas por lixiviación

Al igual que en pérdidas por manufactura, se observaron valores elevados e independientes de la concentración del fármaco en la dieta. Las mayores pérdidas fueron identificadas en los primeros 30 minutos de contacto con el medio acuoso. Durante este tiempo, pérdidas cercanas al 80% del valor nominal de la dieta fueron establecidas.

Niveles de EF en la hemolinfa

Valores promedios de EF en hemolinfa fueron: 0.18, 0.75 y 1.36 µg EF/ml a 30, 300 y 600 ppm de enrofloxacina en la dieta, respectivamente.

Niveles de EF en hepatopáncreas

Un nivel máximo de acumulación fue determinado para los tratamientos de mediana y mayor concentración a un valor promedio de 4.57 µg EF/g hepatopáncreas.

Luego de la supresión del tratamiento, una rápida movilización de las reservas de la droga se aprecia en un período de tiempo corto (2 días) lográndose cuantificar niveles promedios de 0.45, 0.90 y 1.57 µg EF/g tejido. Luego de este tiempo, la eliminación de las reservas de EF se realiza en forma lenta, requiriéndose un total de 10 días para cuantificar niveles no detectables de la droga (≤ 2 ng).

Niveles de EF en tejido muscular

Un rápido desplazamiento con niveles variables de máximos y mínimos se observaron para cada tratamiento. Niveles máximos de 2.3, 1.6 y 0.2 µg EF/g músculo fueron registrados para cada una de las dietas respectivamente.