CENAIM INFORMA

Boletín Informativo No 111 31 de Agosto del 2004

Por Ricardo Cedeño, M.Sc.
InvestigadorMicrobiología

Selección de una cepa Patógena para pruebas de desafío en post-larvas de *Litopenaeus vannamei*

INTRODUCCION

Las enfermedades bacterianas ocasionan elevadas mortalidades en los laboratorios de cultivo de larvas de camarón, razón por la cual existen varios estudios y protocolos de infecciones experimentales con bacterias para determinar entre otros aspectos: a) la virulencia del patógeno, b) el tratamiento curativo y profiláctico, y c) entender los mecanismos de defensa del huésped. Estos ensayos experimentales requieren sin embargo de protocolos con una o varias cepas patógenas en dosis o concentraciones que simulen los efectos (mortalidad, afección de órganos, etc) observados en el campo y que a su vez puedan ser replicados en el tiempo con los mismos efectos.

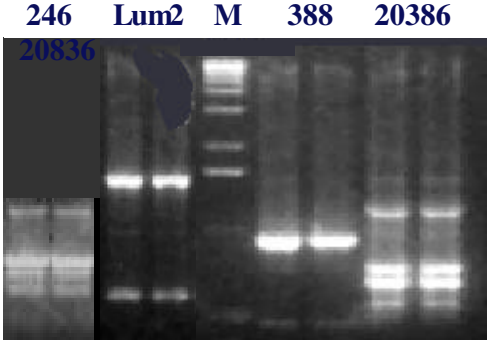
El CENAIM ha venido trabajando en esta línea hace varios años. Entre los principales problemas registrados durante el desarrollo de esta metodologías podemos mencionar a) pérdida de patogenicidad de las cepas producto de mutaciones favorecidas por el continuo cultivo "*in vitro*" en el laboratorio, b) la capacidad de colonización de las bacterias empleadas en la infección puede ser menor que aquellas presentes naturalmente en el agua y en las larvas, y c) problemas de preservación de las bacterias en el laboratorio.

En el presente trabajo reportamos los resultados de los bioensayos de selección de cepas patógenas existentes en el Laboratorio de Microbiología para la estandarización de los protocolos de infección con larvas de camarón y su caracterización molecular mediante perfiles rep-PCR.

METODOLOGIA

Se seleccionaron 40 cepas del cepario del CENAIM para un primer experimento de infección en larvas comerciales *L. vannamei* (PL3) por vía de inmersión.

Las concentraciones de infección fueron de 10^7 UFC ml^{-1}. En un segundo experimento se seleccionaron unicamente aquellas cepas que habían ocasionado una mortalidad superior o igual a 30% ± 10% en larvas con respecto a un tratamiento control.



Fig#1. Perfiles de rep-PCR en geles de agarosa 2% por duplicado para cada una de las 4 cepas seleccionadas en el experimento 2.

Cepa	Dosis de infección	Mortalidad (%)
246	1.0E+07UFC/ml $^{-1}$	*20.42 ^{a}
246	1.0E+08UFC/ml $^{-1}$	*43.33 ^{b}

Tabla#1. Resumen del porcentaje de mortalidad de larvas *L. Vannamei* con respecto al control provocado por la cepa 246 a dos dosis de infección. Experimento 3.

La concentración de infección de las cepas seleccionadas para el segundo experimento fueron de 10^6, 10^7 y 10^8 UFC ml^{-1}. Los parámetros experimentales fueron similares en todos los experimentos (agua de mar filtrada y esterilizada con UV, aireación constante y temperatura de 32ºC. La dosis y cepa seleccionados en el ensayo dos fueron evaluados en los experimentos 3 y 4. Se realizó el análisis microbiológico y caracterización molecular de las cepas utilizadas en los ensyaos mediante la técnica de rep-PCR con el objeto de detectar y cuantificar las bacterias que ingresaron en las postlarvas producto de la infección experimental.

RESULTADOS

Las cepas que causaron las mayores mortalidades de larvas a una concentración de 10^7 UFC ml^{-1} con respecto al control en el primer experimento fueron las cepas Lum 2 (*Photobacterium leiognathi*), 246 (*Vibrio splendidus I*), 388 y 20836 (no identificada bioquímicamente). En la figura 1 se presentan los perfiles de rep-PCR en geles de agarosa de las cepas seleccionadas.

En el segundo experimento se determinó que la cepa 246 ocasionaba la mayor mortalidad en larvas principalmente en las concentraciones 10^7 y 10^8 UFC ml^{-1} (Figura 2).

La mortalidad provocada por la cepa 246 en dosis de infección de 10^8 UFC ml^{-1} en los experimentos 3 y 4 mostró ser significativamente diferente ($p < 0.05$) de las demás cepas evaluadas (Tabla 1).

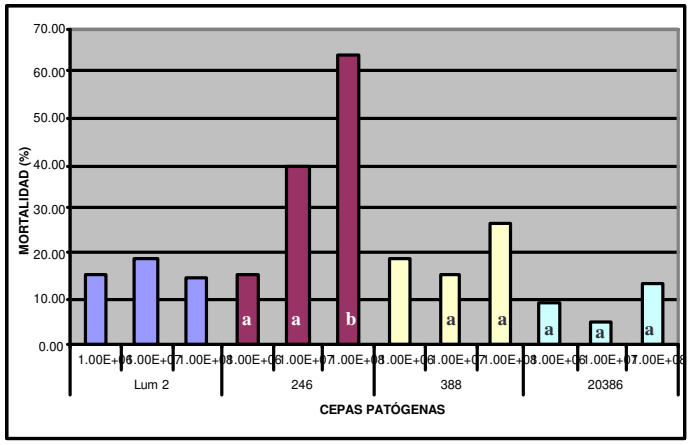
CONCLUSIONES

La cepa 246 (IB: *V. splendidus I*) es un patógeno importante en PI-3 de *L. vannamei*.

Mediante análisis microbiológico y rep-PCR se observó que el potencial patógeno demostrado por la cepa 246 está vinculado con una característica colonizadora importante.

La técnica rep-PCR mostró ser eficaz para la caracterización molecular de aislados bacterianos en el presente estudio.

Los resultados sugieren que aplicando este modelo de infección con la cepa 246 a concentraciones de 10^8 UFC ml^{-1} se pueden obtener resultados reproducibles con mortalidades sobre el 30% con respecto al control.



Fig#2. Porcentajes de mortalidad provocados por las 4 cepas bacterianas a tres diferentes dosis de infección.