



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**PATOGENICIDAD DE *Vibrio penaeicida* HACIA
CAMARONES *Litopenaeus vannamei* Y *L. stylirostris*
CON PARTICULAR ATENCIÓN EN LAS EXOTOXINAS
PROTEICAS COMO FACTORES DE VIRULENCIA**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

GABRIEL AGUIRRE GUZMÁN

La Paz, Baja California Sur, febrero del 2003

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 29 del mes de enero del 2003, se reunieron los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. para revisar la tesis del grado titulada:

“Patogenicidad de *Vibrio penaeicida* hacia camarones *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris* con particular atención en las exotoxinas proteicas como factores de virulencia”

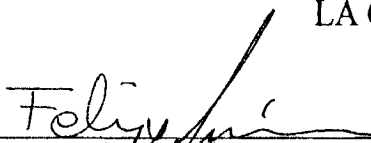
Presentada por el alumno:

Gabriel Aguirre Guzmán

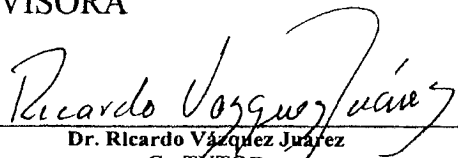
**Aspirante al grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO,
Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN** Acuicultura

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron la **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes

LA COMISIÓN REVISORA



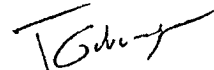
Dr. Felipe Ascencio Valle
DIRECTOR DE TESIS



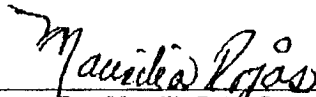
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Co-TUTOR



Dr. Roberto Civera Cerecedo
Co-TUTOR



Dr. François Joël Gatesoupe
Co-TUTOR



Dra. Maurilia Rojas Contreras
Revisor



Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Conformación del Comité

Esta tesis fue dirigida por:

- Dr. Felipe Ascencio Valle Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

El comité tutorial de tesis:

- Dr. Felipe Ascencio Valle Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
- Dr. Ricardo Vázquez Juárez Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
- Dr. Roberto Civera Cerecedo Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
- Dr. François Joël Gatesoupe Instituto Francés de investigación y Exploración del Mar
- Dr. José Luis Ochoa Ochoa Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

El comité revisor de tesis:

- Dr. Felipe Ascencio Valle Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
- Dr. Ricardo Vázquez Juárez Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
- Dr. Roberto Civera Cerecedo Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
- Dr. François Joël Gatesoupe Instituto Francés de investigación y Exploración del Mar
- Dra. Maurilia Rojas Contreras Universidad Autónoma de Baja California Sur

El comité sinodal:

- Dr. Felipe Ascencio Valle Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
- Dr. Ricardo Vázquez Juárez Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
- Dr. Roberto Civera Cerecedo Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
- Dra. Maurilia Rojas Contreras Universidad Autónoma de Baja California Sur
- Dr. Héctor Nolasco Soria Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
Directora de Estudios de Posgrado

RESUMEN GENERAL

Diversos países han visto afectada su producción camaronícola debido a enfermedades ocasionadas por diferentes especies de *Vibrio*. Se determinó la patogenicidad de dos cepas de *V. penaeicida*, KH-1 y AM101, provenientes de dos orígenes geográficos diferentes, en camarones juveniles de *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*. Además, se determinó la toxicidad de sus respectivos sobrenadantes libres de células (SLC) y de las fracciones proteicas obtenidas del medio de cultivo por medio de una precipitación al 40, 60, y 80% de saturación con sulfato de amonio (FP40, 60, o 80). Tanto las bacterias vivas, como el SLC y la FP40 de la cepa AM101, generaron una mortalidad significativamente superior ($P < 0.05$) al de su homónima. Tanto las bacterias vivas como el SLC y la FP40 de la cepa AM101 generaron una mortalidad significativamente superior al de la cepa KH-1, y sus correspondientes SLC y FP40, en camarones *L. vannamei* y *L. stylirostris*. Los camarones *L. vannamei* que fueron inyectados intra-muscularmente con la FP40 del medio de cultivo mostraron síntomas y daños histológicos semejantes a los observados en aquellos organismos que fueron infectados con bacterias vivas de la cepa AM101, sugiriendo que la FP40 y bacteria viva pueden actuar en forma parecida.

Se determinó en *L. vannamei*, la toxicidad y dosis letal media (DL_{50}) calculada de las principales subfracciones obtenidas por medio de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) a partir de la FP40 de la cepa AM101, encontrando una actividad tóxica en la subfracción A, que junto con la FP40 de la cepas AM101 y KH-1, presentaron una DL_{50} de 1.66, 5.61, y 15.43 μg de proteína camarón⁻¹. La subfracción A fue sometida a un nuevo proceso de purificación por medio de FPLC, en donde la subfracción A1 generó una mortalidad similar a la producida por la subfracción A y a la FP40. La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de estas tres muestras (A1, A, y FP40) muestran una banda proteica principal de un peso molecular aproximado de 38.5 kDa, la cual mostró actividad proteolítica sobre enzimogramas (gelatina). Por medio de pruebas *in vivo* y enzimogramas, se procedió a caracterizar parcialmente el tipo de exotoxina contenida en la subfracción A y la FP40 de la cepa AM101 mediante el uso de diferentes inhibidores de proteasas, observando una disminución significativa en la actividad de estas dos muestras al emplear proteinasa K, CuCl_2 , E-64, y tratamientos térmicos (60 y 100°C). Esta actividad no se vio afectada por el uso EDTA- Na_2 , aprotinina, e inhibidor de tripsina de soya. Estos hechos, aunados a que ambas muestras fueron obtenidas gracias a la precipitación con sulfato de amonio, sugieren que el factor tóxico producido por esta cepa de *Vibrio* es una proteasa termo-lábil que se comporta como una exotoxina de tipo cistein proteasa.

Palabras claves: Patogenicidad, *Vibrio*, Camarón

ABSTRACT

Different countries have been affecting the shrimp production for diseases originated by some *Vibrio* species. The pathogenicity of two *V. penaeicida* strains (KH-1 and AM101) from different geographic origin, were used in experimental challenges with juvenile *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris*. Also, the toxicity of cell-free supernatants (CFS), and some protein fraction obtained by 40, 60, and 80% of ammonium sulfate precipitation (PF40, 60, or 80) Live *Vibrio*, CFS, and PF40 from strain AM101 showed a significant ($P < 0.05$) higher mortality than strain KH-1 in both shrimps. *L. vannamei* infected with live *Vibrio* cell of AM101 strain showed a similar gross and histological signs of disease to those injected with PF40 from this strain. These evidences suggest that both, live *Vibrio* cell and PF40 function at similar level.

Toxicity and median lethal doses (LD_{50}) of FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) products were evaluated on *L. vannamei*. The first FPLC fraction sample (A) from PF40 of strain AM101 displayed toxic activity to shrimp. This fraction A, and PF40 from strains AM101 and KH-1 showed a LD_{50} of 1.68, 5.61, and 15.43 $\mu\text{g protein shrimp}^{-1}$, respectively. Second FPLC process from fraction A showed a peak A1 with similar toxic effect to shrimp to that of fraction A, and PF40. SDS-PAGE of PF40, fraction A, and peak A1 showed a similar molecular band of approximately 38.5 kDa, with proteolytic activity on zymogram test. PF40 and fraction A activity *in vivo*, and zymogram tests, were inhibited in presence of proteinase K, CuCl_2 , E-64, and heat (60 and 100°C) treatments, but were not inhibited by EDTA- Na_2 , aprotinin, and soy trypsin treatment. These results support the hypothesis of a proteinaceous exotoxin (cysteine protease-like) as dominant protease secreted by *V. penaeicida* strain AM101.

Key words: Pathogenicity, *Vibrio*, Shrimp.

A María Trinidad González Valdez

A mis hijos: Gabriel y Marco Antonio

Por todo el amor y apoyo que
siempre me brindaron

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Felipe Ascencio, al Dr. Ricardo Vázquez y al Dr. Roberto Civera por todo su apoyo y dirección en la realización del presente estudio, llegando a tener no solo el nivel de director o codirectores, sino además la de amigos.

Le agradezco al Dr. François Joël Gatesoupe del Instituto Francés de Investigación y Exploración del Mar por sus cometarios y consejos a lo largo de mi trabajo doctoral.

Le agradezco a todos aquellos doctores que con sus cometarios enriquecieron mi trabajo (Dr. Humberto Mejía, Dr. Héctor Nolasco, Dr. Denis Ricque, Dr. T. W. Flegel, etc.).

Le agradezco especialmente a la familia Sánchez Cantú y al Admón. Fernando Imaz Lira por todo su cariño, consejos, y consideraciones que tuvieron conmigo y mi familia a lo largo de mi estancia en la Paz, siempre serán parte de nosotros.

Le agradezco especialmente a la M. en C. Maria de Jesús Romero Geraldo, por todos sus consejos, consideraciones, y la paciencia que tuvo conmigo al enseñarme las técnicas que se emplean en el laboratorio de patogenicidad microbiana (CIBNOR).

Le agradezco al Dr. Denis Saulnier (Laboratoire d'Aquaculture Tropicale. Centre Océanologique du Pacifique, IFREMER, Tahití) por toda la ayuda que me brindó durante mi estancia de investigación en su institución y especialmente por su amistad.

Le agradezco al Dr. Marco Linné Unzueta (CIBNOR, Guaymas) por todo la ayuda que me brindó en la realización del trabajo de histología y por su amistad.

A todos mis compañeros del área de patología del CIBNOR, juntos realizamos muchos trabajos y hemos pasado por diversos problemas, no saben lo que han logrado hacer conmigo en todo el tiempo que hasta ahora hemos compartido, siempre serán parte de mí.

Agradezco especialmente a Jaime y Francisco Malagamba, Ricardo Dubost, Jorge Imaz, Oscar Soto, y al resto de la mesa directiva de APSA por ayudarme a tener un punto de vista más completo sobre lo que representa un investigador y de lo mucho que puede ayudar a la sociedad.

A todo el personal del laboratorio de cromatografía, histología, nutrición, bioensayos nutricionales, cultivo de camarón del CIBNOR, por todo el tiempo, ayuda y enseñanzas que me dieron durante el tiempo que duró mi estancia en sus laboratorios.

Agradezco especialmente al personal de posgrado, biblioteca, y computo por su ayuda a lo largo de mi trabajo.

Agradezco a las empresas de Acuacultores de la Paz, S.A. de C.V. y a la Sociedad Cooperativa de Acuacultura, Acuacultores de la Península de Baja California, por sus apoyo mediante el donativo de gran parte de lo organismos que se usaron a lo largo de este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, beca 132908, proyecto 28884-B), al Sistema de Investigaciones del Mar de Cortez (SIMAC, proyecto 980106033), al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, proyecto PAC11) y al International Foundation for Science (IFS, proyecto A/3229-1) por sus respectivos apoyos económicos en la realización de este proyecto.

Agradezco al Dr. Ira Fogel (CIBNOR) por su trabajo en la edición de la versión en inglés de los artículos generados durante este trabajo.

PREFACIO

El presente trabajo de tesis doctoral esta basado en los siguientes artículos, que habrán de ser referidos por sus números romanos (I – III), además de los siguientes productos de investigación (IV – VII).

A) Publicaciones en revistas internacional con arbitraje

- I.- Aguirre-Guzmán, Gabriel, Vázquez-Juárez, Ricardo and Ascencio-Valle, Felipe. 2001. Evaluation of pathogenic effect of four *Vibrio* species on larvae and postlarvae of the american white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Invertebrate Pathology. 78 (4): 215-219.
- II.- Gabriel Aguirre-Guzmán, Yannick Labreuche, Dominique Ansquer, Benoît Espiau, Peva Levy, Felipe Ascencio, and Denis Saulnier. Proteinaceous exotoxins of *Vibrio penaeicida* and *V. nigripulchritudo* with pathogenic effects on juvenile blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). Ciencias Marinas. 2002. Aceptado.
- III.- Gabriel Aguirre-Guzmán, Felipe Ascencio, and Denis Saulnier. Pathogenicity of *Vibrio penaeicida* to white shrimp *Penaeus vannamei*, a cysteine protease-like exotoxin as virulence factor. Diseases of Aquatic Organisms. 2002. En revisión.
- IV.- Gabriel Aguirre Guzmán, Humberto Mejia Ruíz, and Felipe Ascencio. Extracellular virulence products of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. Diseases of Aquatic Organisms. 2002. En revisión.

B) Capítulos de libro

- V.- Aguirre-Guzmán, Gabriel and Ascencio-Valle, Felipe. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. In: Pandalai S.G. (Ed). Resent Res. Devl. Microbiology, 4 (2000): 333-348. Research Signpost. T.C. 36/248 (2), Trivandrum 8, India. ISBN: 81-7736-041-0.

C) Publicaciones en revistas de divulgación internacional

- VI.- Gabriel Aguirre-Guzmán, Ricardo Vázquez-Juárez, Felipe Ascencio. 2002. Efecto de diferentes especies de *Vibrio* sobre la sobrevivencia larval de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Panorama Acuícola Magazine. 7:18-19.

D) Trabajos en extenso en congresos internacionales

- VII.- Gabriel Aguirre-Guzmán, Ricardo Vázquez-Juárez, Felipe Ascencio. 2002. Efecto de diferentes especies de *Vibrio* sobre la sobrevivencia y desarrollo larval del camarón blanco de acuicultura (*L. vannamei*). VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura y V Congreso Latinoamericano de Acuicultura, 24 al 27 de Octubre, 2001. Guayaquil, Ecuador.
-

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN GENERAL

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

.....	1
Especies de <i>Vibrio</i> patogénicos para camarón 1
Factores de virulencia extracelulares del género <i>Vibrio</i> 2
Papel de las exotoxinas en las enfermedades de camarón 3

OBJETIVO PRINCIPAL

.....	8
Objetivos específicos 8

METODOLOGÍA

.....	9
Diseño experimental 9

RESULTADOS

.....	10
Patogenicidad de diferentes cepas de <i>Vibrio</i> en larva de camarón 10
Patogenicidad de <i>V. penaeicida</i> en juveniles de camarón 10
Toxicidad y características de las fracciones proteicas extracelulares de <i>V. penaeicida</i> , como factores de virulencia. 12
Fraccionamiento de la FP40 13
Dosis letal media (DL ₅₀), inhibidores de proteasas, e histopatología 14
Enzimogramas e inhibidores de proteasas 15

DISCUSIÓN

.....	17
Patogenicidad de diferentes especies de <i>Vibrio</i> 17
Patogenicidad de <i>V. penaeicida</i> 18
Toxicidad del SLC y Fracciones proteicas 19
Dosis letal media (DL ₅₀) 21
Histología 21
Inhibidores, SDS-PAGE, y enzimogramas 22
Sumario 23

CONCLUSIONES

.....	25
RECOMENDACIONES 27

REFERENCIAS

.....	28
ANEXO I 33

ANEXO II

.....	39
ANEXO III 50

ANEXO IV

.....	64
ANEXO V 73

ANEXO VI

.....	90
ANEXO VII 93

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla I.- Productos extracelulares obtenidos de cepas virulentas para camarón.	5
Tabla II.- Porcentaje de mortalidad (\pm DE) de camarones juveniles de <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i> infectados con las células vivas de <i>V. penaeicida</i> , cepas KH-1 y AM101.	12
Tabla III.- Porcentaje de mortalidad (\pm DE) de camarones juveniles de <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i> (n = 40) inyectados intra-muscularmente con el SLC o fracciones proteicas de <i>V. penaeicida</i> , cepas KH-1 y AM101 (20 μ g org. ⁻¹).	12
Tabla IV.- Porcentaje de mortalidad (\pm DE) de camarones juveniles (<i>L. vannamei</i>) inyectados intra-muscularmente con 25 μ L (10 μ g de proteína mL ⁻¹) de la FP40 y subfracciones obtenidas a partir de la FPLC 1 y 2.	13
Tabla V.- Contenido de proteína de la FP40 y sus diversas subfracciones obtenidas a partir del SLC de <i>V. penaeicida</i> , cepa AM101, por medio de FPLC (Superosa 12).	13
Tabla VI.- Porcentaje de mortalidad (\pm DE) de camarones <i>L. vannamei</i> y <i>L. stylirostris</i> , inyectados intra-muscularmente con la FP40 o subfracción A de <i>V. penaeicida</i> , cepa AM101, en presencia de distintos inhibidores de proteasas.	15

FIGURAS

Figura 1.- Posibles vías por las cuales pueden entrar en contacto las exotoxinas bacterianas con el camarón y causar enfermedad (adaptado de Salyers y White 1994).	6
Figura 2.- Sobrevivencia de los subestadios larvales del camarón (<i>L. vannamei</i>) infectados con las cepas experimentales: <i>V. alginolyticus</i> (a), <i>V. harveyi</i> (b), <i>V. parahaemolyticus</i> (c), y <i>V. penaeicida</i> (d) en sus diferentes dosis.	11
Figura 3.- Perfil cromatográfico de la FP40 (A1) y subfracción A (A2) de <i>V. penaeicida</i> , cepa AM101, y sus correspondientes perfiles electroforéticos (B1 y B2). SDS-PAGE al 10%, teñido con nitrato de plata. UA: Unidades de absorbancia, PM: marcador de peso molecular.	14
Figura 4.- Enzimograma proteolítico de la FP40, subfracciones A, y A1 de <i>V. penaeicida</i> , cepa AM101 (A) y FP40 sujeto a distintos inhibidores de proteasas (B). SDS-PAGE al 10% con gelatina (10 mg mL ⁻¹), después de ser teñido con azul brillante coomassie R-250.	16

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje.	FPLC	Cromatografía líquida rápida para proteínas (siglas en inglés).
µg	Microgramo.	g	Gramos.
µL	Microlitro.	h	Horas.
µm	Micrómetro.	kDa	Kilodalton.
ADN	Acido desoxiribonucleico.	LPS	Lipopolisacárido.
ARN	Acido ribonucleico.	min	Minutos.
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (siglas en inglés).	mL	Mililitro.
UA	Unidad de absorbancia.	°C	Grados Celsius.
BHI	Caldo cerebro corazón (siglas en inglés).	PAGE	Electroforesis con gel de poliacrilamida (siglas en inglés).
CICESE	Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.	PEC	Productos extracelulares.
COP	Centro Oceanográfico del Pacífico, IFREMER, Tahití (siglas en francés).	pH	Potencial de hidrógeno.
DE	Desviación estándar.	SLC	Sobrenadante libre de células.
DL ₅₀	Dosis letal media.	ufc	Unidades formadoras de colonias.
<i>et al.</i>	y colaboradores (abreviación en latín).	UV	Ultravioleta.
FP40	Fracción proteica obtenida con sulfato de amonio (40%).	x g	Por gravedad.
		w/v	Peso / volumen (siglas en inglés).

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- Absceso:** Acumulación de células muertas en una área específica y previamente inexistente, revestida por un tejido de granulación denominado membrana piógena, que impide su propagación. Se forma a partir de un foco único o de varios pequeños (microabscesos) confluentes y que suele tener una causa bacteriana.
- Ácido ribonucleico:** Molécula formada por un poliribonucleótido de longitud variable que contiene uracilo en vez de tiamina. Hay tres tipos: ARN mensajero (mARN), ARN ribosomal (rARN), y ARN de transferencia (tARN).
- Acuicultura:** Estudio o técnica de cultivo de especies vegetales y animales en agua dulce o marina. La acuicultura estudia diversas formas de criar y cultivar especies de peces, crustáceos o moluscos.
- Ad libitum:** Al límite, cuando un organismo es alimentado al punto de saciedad.
- Adhesión:** Proceso de unión de dos superficies o partes, especialmente de las superficies opuestas de una herida.
- Adhesinas:** Molécula expresada sobre la superficie de las células y que se unen a sus receptores ubicados sobre la superficie de las células (linfocitos, bacterias, etc.) dirigiéndolos específicamente a los distintos órganos.
- Agente:** Sustancia o microorganismo que realiza una acción.
- Anorexia:** Trastorno caracterizado por la falta o pérdida del apetito. Las causas son numerosas y variadas y aparece en enfermedades que afectan a órganos y diversos aparatos.
- Anoxia:** Falta de oxígeno en la sangre, en las células o en los tejidos.
- Apoptosis:** Muerte celular programada con cambios morfológicos como la fragmentación nuclear, condensación de la cromatina, ruptura de la membrana plasmática y desintegración de la célula en pequeños fragmentos. Esta puede darse cuando en el microambiente no existen suficientes factores de crecimiento para todos los linfocitos presentes; cuando los linfocitos no expresen suficiente madurez y sus receptores antigénicos se muestren no funcionales.
- Bacteria:** Organismo formado por una sola célula procariótica y que se caracteriza porque su región nuclear, no está rodeada de membrana, consta de una sola molécula de DNA y su división no es mitótica. Carece de estructuras citoplásmicas, por lo que los ribosomas están repartidos por el citoplasma y le confieren un aspecto granular. Además, el citoplasma puede contener gránulos o inclusiones con material de reserva de lípidos, glucógeno, azufre, etc. La pared celular rodea a la membrana citoplasmática y da forma, rigidez y resistencia a la célula; también puede contener peptidoglicanos y lipopolisacáridos.
- Bacteriófago:** Virus que se replica en el interior de las células bacterianas.
- Branquias:** Órgano respiratorio de diversos organismos marinos y terrestres.
- Células:** Unidad funcional de los tejidos vivos. Está constituida por el núcleo y el citoplasma; en este se encuentran diversas organelas, como las mitocondrias, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y las ribosomas, encargadas de la síntesis y secreción de sustancias, cuyo control es ejercido por el núcleo.
- Cepa:** Punto de arranque de una serie filogenética.
- Etiología:** Ciencia que estudia las causas de las enfermedades como factores internos y externos.
- Exoesqueleto:** Es el esqueleto externo de los crustáceos.
- Exotoxina:** Proteína soluble liberada al exterior por algunas bacterias, con variadas actividades biológicas deletéreas. Únicamente afecta a las células que contengan receptores específicos.
- Exposición:** Es la oportunidad de un hospedero susceptible de adquirir una infección por transmisión directa o indirecta.
- Extracelular:** Localizada o que ocurre fuera de la célula.
- Fosfolipasa:** Enzima que desdobla a los fosfolípidos.
- Liofilización:** Método de deshidratación mediante la congelación y posterior sublimación a presión reducida del hielo formado, para dar lugar a un material esponjoso que se disuelve posteriormente con facilidad.
- Granuloma:** Nódulo formado por un tejido de granulación. Su estructura puede orientar hacia una etiología determinada.
- Granulomas sépticos:** Masa de tejido anormal formado por la destrucción de tejido o por gérmenes patógenos.
- Hemólisis:** Ruptura de los hemocitos con liberación de hemocianina al plasma. En determinadas situaciones patológicas hay un aumento en la destrucción de los hemocitos (lesiones mecánicas, trastornos osmóticos, enzimáticos, tóxicos, infecciones, etc.).
- Hemolinfa:** Sangre, líquido extracelular de los crustáceos.
-

-
- Hemocito:** Célula de la hemolinfa de los crustáceos.
- Hemolíticas:** Es la destrucción o disolución de las células rojas.
- Hepatopáncreas:** Glándula digestiva de crustáceos y moluscos.
- Herida:** Lesión o rotura de los tejidos de los seres vivos por incisión o contusión.
- Hidrólisis idiopática:** Destrucción de las células por causa desconocida.
- Huésped:** Son los organismos simples o complejos capaces de infectar a otro organismo.
- Hospedero:** Son los organismos que son capaces de ser infectados por un agente.
- Infección:** Invasión del organismo por gérmenes patógenos, que se establecen y se multiplican. Dependiendo de la virulencia del germen, de su concentración, y de las defensas del hospedero, se desarrolla una enfermedad infecciosa (causada por una lesión celular local, secreción de toxinas o por la reacción antígeno anticuerpo), una enfermedad subclínica o una convivencia inocua.
- Infectar:** Transmitir de un organismo a otro los gérmenes de una enfermedad.
- Inflamación:** Respuesta protectora de los tejidos del organismo ante una alteración patológica en una parte cualquiera del organismo, caracterizada por enrojecimiento, hinchazón, dolor y aumento de la temperatura.
- Kilobase (kb):** Unidad de longitud del ADN equivalente a 1000 (1k) nucleótidos.
- Lesión:** Daño corporal causado por un golpe, herida, o enfermedad.
- Letargia:** Estado de somnolencia o estupor profundo.
- Lipopolisacárido:** Estructura de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. También denominada endotoxina. Contiene una parte lipídica (lípidos A) inserta en la membrana y una región polisacárica expuesta al exterior (cadena O).
- Lisis:** Disolución, desaparición gradual, bien sea de una célula o de los síntomas de una enfermedad.
- Lumen:** Cavidad o canal dentro de un órgano en forma de tubo.
- Malacia:** Reblandecimiento anormal de una estructura.
- Membrana plasmática:** Estructura que envuelve a la célula, normalmente formada por una bicapa fosfolipídica, conteniendo además proteínas y otros constituyentes.
- Metabolismo:** Conjunto de procesos químicos y físicos que tienen lugar en los seres vivos. Unos procesos son anabólicos (crecimiento y reparación), y otros catabólicos (degradación y gasto de los materiales energéticos), ambos están regidos por el sistema endocrino y enzimático.
- Molino gástrico:** Órgano de los crustáceos en donde se tritura el alimento.
- Necrosis:** Muerte celular con rompimiento de la membrana nuclear y plasmática, y con liberación del contenido celular biológicamente activo dando lugar a una inflamación local.
- Núcleos cariorréxicos:** Fragmentación del núcleo celular.
- Núcleos picnóticos:** Colapso total del núcleo en una sola esfera densa.
- Órgano linfoide:** Tejido en que las células predominantes son hemocitos, o linfocitos, etc.
- Patogenicidad:** Capacidad de un microorganismo de infectar (invadir y multiplicarse en un ser vivo), produciendo unos síntomas (enfermedad) en un hospedero susceptible.
- Patogénico:** Capas de causar las condiciones para una enfermedad.
- Patógeno:** Es un agente capaz de causar enfermedad.
- Peneido:** Grupo de organismos marinos conocidos comúnmente como camarones.
- Periplasma:** Es la región cercana o inmediata a la bacteria o otra pared celular.
- Plasmido:** Una circular y doble unidad de ADN que se replica independientemente del ADN cromosomal. Estos se encuentran principalmente en bacterias y se usan en investigaciones con ADN recombinante para transferir genes a las células.
- Proteasas:** Enzima que disocia a las proteínas llevándolas primero a polipéptido y por último a aminoácido.
- Proteínas:** Macromolécula compuesta por una o varias cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales tiene una secuencia característica de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos.
- Proteolíticas:** promueve la proteólisis o hidrólisis de las proteínas en péptidos y aminoácidos.
- Reto por balneación:** Proceso por el cual un organismo es expuesto a un químico, microorganismo, etc. al ser suministrado en el agua por un tiempo determinado.
- Tejido:** Cada una de las estructuras celulares, con idéntica naturaleza y origen, que desempeñan en conjunto una determinada función en los organismos vivos.
- Tóxica:** Venenosa.
- Toxina:** Es una proteína o sustancia proteica conjugada, la cual es letal a otros organismos. Estas son producidas por algunas plantas, ciertos animales y bacterias patógenas.
- Virulencia:** Es el grado o expresión de la patogenicidad de un agente infeccioso.
-

INTRODUCCIÓN

El cultivo de organismos acuáticos (acuicultura) es un área que ha tenido un gran desarrollo en las últimas décadas. Sin embargo, estos organismos son susceptibles a enfermedades que pueden afectar considerablemente la producción. Diferentes especies de *Vibrio* han sido reportadas, a nivel mundial, como los agentes causantes de serias pérdidas en la producción del camarón de granja, generando mortalidades que pueden llegar a ser hasta del 100%, particularmente en postlarvas y juveniles (Hameed 1993, Karunasagar *et al.* 1994, Prayitne y Latchford 1995, Harris y Owens 1999). Estas bacterias han sido consideradas como una de los dos principales agentes patógenos que afectan al camarón cultivado en México y Ecuador (Scholz *et al.* 1999, Vandenberghe *et al.* 1999). Los vibrios pueden ser transportados de una región a otra gracias a las múltiples actividades, incluyendo aquellas del tipo acuacultural (transporte de reproductores, larvas, productos congelados, equipo y material, manejo de aguas de desecho), lo cual puede convertir a éstos agentes infecciosos en un problema global (Durand *et al.* 2000).

Las enfermedades generadas por este tipo de bacterias han sido descritas como: vibriosis, enfermedad bacterial, septicemia bacteriana de los peneidos, vibriosis de los peneidos, vibriosis luminiscente, y enfermedad de las patas rojas. Los camarones que han sido afectados por alguna especie patógena de *Vibrio* spp., muestran diferentes signos de enfermedad como la letargia, necrosis en tejidos y apéndices, malformaciones, crecimiento lento y/o baja metamorfosis larval, bioluminiscencia, músculo opaco, intestino semi-vacío, anorexia, y melanización de los apéndices (Karunasagar *et al.* 1994, Muroga *et al.* 1994, Robertson *et al.* 1998, Smith 2000). Además, se pueden observar un gran número de bacterias en la hemolinfa durante una septicemia bacteriana, por medio de microscopia de muestras frescas. Necrosis, granulomas, malacia, e inflamación de órganos (órgano linfoide, branquias, corazón, hepatopáncreas, etc.) son fáciles de evaluar por medio de histología (Lightner 1996, Smith 2000).

Especies de *Vibrio* patogénicos para camarón

Las especies de *Vibrio* que han sido involucradas en las enfermedades observadas en camarón son: *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. penaeicida*, *V. anguillarum*, *V. nereis*, *V. tubiashi*, y *V. fluvialis* (Lightner 1996, Van-

denberghe *et al.* 1998, Sudheesh y Xu 2001, Saulnier *et al.* 2000a). Diversos trabajos de investigación se han enfocado en determinar la patogenicidad que poseen estas especies de *Vibrio* sobre camarón, empleando para este fin métodos de infección como los retos por inmersión, balneación o baños, aplicación oral, e inyecciones intra-musculares o en seno venoso del camarón (Hammed 1993, Muroga *et al.* 1994, Lee *et al.* 1996, Alapide y Dureza 1997, Saulnier *et al.* 2000a, Sudheesh y Xu 2001, Alday *et al.* 2002). Estos trabajos claramente muestran que existe una gran variación en el grado de patogenicidad que produce las diferentes especies de *Vibrio* spp., además de que ésta se genera por medio de un proceso complejo en donde interactúan la especie hospedada, su estadio de desarrollo y condición fisiológica, estrés ambiental, especie de *Vibrio*, cepa, dosis, tiempo y forma de infección (de la Peña *et al.* 1993, 1995, Karunasagar *et al.* 1994, Muroga *et al.* 1994, Hameed 1995, Le Groumellec *et al.* 1996, Alapide y Dureza 1997, Goarant *et al.* 1998, Cassadevall y Pirofski 1999, Saulnier *et al.* 2000a, b). Por ejemplo, *Litopenaeus monodon* fue más sensible que *Penaeus indicus* y *P. semisulcatus* al ser expuestos a diferentes dosis (10^6 , 10^7 , 10^8 , y 10^9 unidades formadoras de colonias o ufc mL^{-1}) de *V. campbellii* (Hameed 1995). Este *Vibrio* pudo causar hasta un 100% de mortalidad, dependiendo de la dosis y tiempo de la exposición. Además, los subestadios de nauplio y protozoa fueron más sensibles que los de mysis y postlarva. *Vibrio harveyi*, cepa LT, resistente a cloranfenicol y estreptomina y que fue aislada de larvas de *L. monodon*, mostró una dosis letal media (DL_{50}) inferior a *V. harveyi*, cepa SW1, que fue aislada de agua marina (10^3 y 10^5 ufc mL^{-1} , respectivamente) (Karunasagar *et al.* 1994).

Factores de virulencia extracelulares del género *Vibrio*

A partir del cultivo de diversas especies y cepas de *Vibrio* spp., aisladas de organismos enfermos y del medio ambiente marino, se han obtenido productos extracelulares (PEC) con características tóxicas para el camarón, los cuales han sido identificados como importantes factores de virulencia para el mismo (Tabla I). Toxinas marinas como la surogatoxina y tetrodotoxina son conocidas por tener un origen bacteriano (Simidu *et al.* 1987, Yasumoto y Murata 1993, Matsumura 1995). Otros PEC como las quitinasas, hemolisinas, y proteasas (metaloproteasas, serin y cistein proteasas, alcalin proteasas) han sido obtenidas a partir del sobrenadante libre de células (SLC) de *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. alginolyti-*

cus, entre otros (Stensvag *et al.* 1993, Liu *et al.* 1996, 1997, Lee *et al.* 1997, Svitil *et al.* 1997, Harris y Owens 1999, Hörmansdorfer *et al.* 2000).

El PEC de *V. penaeicida*, cepa AM101, y *V. nigripulchritudo*, cepa AM102, cultivadas a 20°C generaron un 100% de mortalidad cuando estos fueron inyectados a juveniles de *L. stylirostris* (Goarant *et al.* 2000). La inestabilidad ante el calor del factor citotóxico contenido en el PEC de *V. penaeicida*, lo hace diferir de las endotoxinas de tipo lipopolisacárido (LPS). Dos fracciones tóxicas termolábiles (10 min a 70°C) para camarón *L. monodon* fueron identificadas y obtenidas a partir del PEC (DL₅₀, 8 µg proteína por camarón) de *V. parahaemolyticus*, cepa 25C, la cual fue aislada durante la crisis de enfermedad de patas rojas de *P. orientalis* (Sudheesh y Xu 2001). Estos y otros trabajos (Tabla I) demuestran que la selección de algunas cepas de *Vibrio* spp. con PEC tóxicos para camarón y la caracterización de sus componentes (exotoxinas), son elementos clave que pueden ayudar a tener un mejor entendimiento de las enfermedades infecciosas producidas por *Vibrio* spp. y sus mecanismos de acción, lo cual permitirá establecer estrategias para controlar y/o disminuir los daños que pueden ocasionar los miembros de este género.

Papel de las exotoxinas en las enfermedades de camarón

En las últimas décadas ha existido un progreso considerable en el cultivo de camarón, el cual a sido acompañado por la descripción de un conjunto de enfermedades producidas por los vibrios, en donde las exotoxinas juegan un papel muy importante en los procesos patogénicos generados por estas bacterias (Tabla I). Una amplia variedad de bacterias gram positivas y negativas pueden producir diversas exotoxinas que son secretadas al medio de cultivo bacteriano, mientras que otras son temporalmente almacenadas en el citoplasma o periplasma, siendo liberadas durante la lisis de la célula bacteriana (Salyers y White 1994). Un tipo de exotoxina puede ser producida por varias especies de *Vibrio* spp., mientras que otras son solo producidas por una sola especie.

Diversas exotoxinas bacterianas pueden alterar el metabolismo normal de las células hospederas, afectando la matriz extracelular o la membrana nuclear del mismo, mientras que otras pueden alterar el metabolismo proteico e interactuar con algunos elementos de la maquinaria del hospedero (Salyers y White 1994, Harris y Owens 1999, Schmitt *et al.*

1999) o pueden matar a las células intoxicadas (Casadevall y Pirofski 1999, Young y Schauer 2000). El efecto de las exotoxinas se produce a fin de generar una lisis celular que facilita la distribución de las bacterias a través de los tejidos. Algunas exotoxinas pueden originar una hidrólisis enzimática o la formación de poros celulares que destruyen la selección y equilibrio del flujo de iones a través de la membrana plasmática. Otras exotoxinas interactúan con factores de elongación y ARN ribosomal, afectando a la célula hospedera durante la síntesis de proteínas. Sin embargo, aún no son claramente entendidas las interacciones entre *Vibrio* y las células del hospedero, virulencia, estrés, y factores ambientales (Harris y Owens 1999).

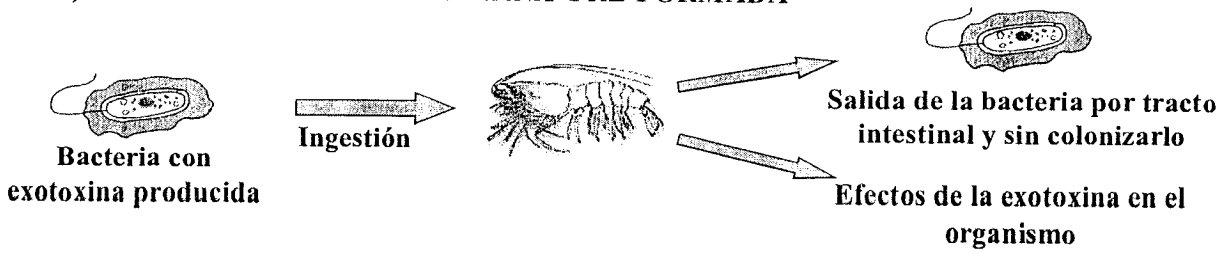
Las exotoxinas bacterianas pueden entrar en contacto con los camarones cultivados por medio de tres posibles vías (Fig. 1). i) Las bacterias producen las exotoxinas fuera del camarón (alimento, sedimento, agua, detritus, etc.) siendo ingeridas indirectamente por el mismo. Los síntomas de enfermedad se presentan sin adhesión, colonización, o infección bacteriana (Harris y Owens 1999, Wang y Leung 2000). ii) Otra forma de entrada, se da cuando los vibrios colonizan las heridas o la superficie de las mucosas, principalmente en el tracto intestinal, branquias o cutícula (Takahashi *et al.* 1998, Wang y Leung 2000). Las bacterias no invaden los tejidos circundantes o entran en el torrente circulatorio, pero causan los síntomas de enfermedad por la acción local de las exotoxinas o porque estas entran al torrente circulatorio y actúan en los órganos y tejidos susceptibles. de la Peña *et al.* (1995) encontraron que *Vibrio* sp. (PJ), posteriormente llamado *V. penaeicida*, tienen un primer estado de multiplicación en el estómago de *M. japonicus*, y uno secundario en el hepatopáncreas y órgano linfoide. Lavilla *et al.* (1998) encontraron que el órgano blanco de infección de un *V. harveyi* luminiscente fue el hepatopáncreas de *L. monodon*. iii) Otra vía de entrada de las exotoxinas se da cuando los vibrios crecen en las heridas o abscesos, lugar en donde se producen las exotoxinas que causan daños locales a los tejidos del hospedero. La exotoxina es usada por los vibrios como una ayuda para su crecimiento y distribución en el tejido. Jiravanichpaisal *et al.* (1994) reportaron la multiplicación de un *V. harveyi* patógeno en el lumen del hepatopáncreas de los camarones, anterior a su diseminación sistémica con una marcada necrosis en el corazón y órgano linfoide.

Tabla I.- Productos extracelulares obtenidos de cepas virulentas para camarón.

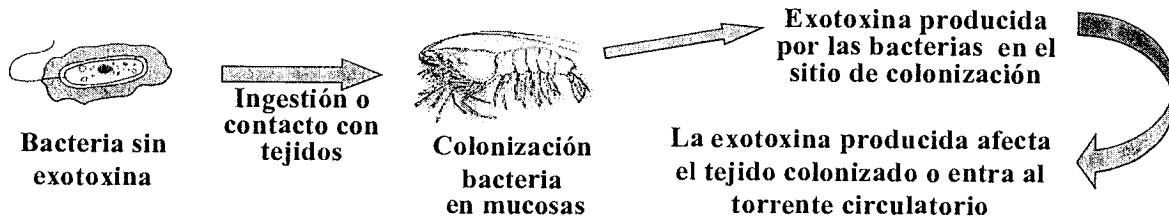
Vibrion	Origen	Virulencia	Producto, Actividad y Características	DL ₅₀ ^a	Autor
<i>V. harveyi</i>					
- cepa 820514	<i>L. monodon</i>	<i>L. monodon</i>	PEC tóxico (proteolítica, hemolítica, fosfolipasas)	1.2-1.51	Liu <i>et al.</i> 1996
"	"	"	Cistein proteasas	0.3	Liu <i>et al.</i> 1999
"	"	"	Cistein proteasas		Lee <i>et al.</i> 1999a
- ATCC 25919	Agua Marina	<i>L. monodon</i>	Alcalin cistein proteasas, 38 kDa		Liu <i>et al.</i> 1997
- ATCC 14226	<i>Talorchestia</i> sp	<i>L. monodon</i>	PEC tóxico (proteolítica, hemolítica, fosfolipasas)	2.7	Liu <i>et al.</i> 1996
			"	2.34	"
- cepa 47666-1	<i>L. monodon</i>	<i>L. monodon</i>	SLC tóxico	3.5	Harris y Owens 1999
- cepa 47666-1	<i>L. monodon</i>	<i>L. monodon</i>	Exotoxina proteica (T1) de 55 y 45 kDa.	1.8	"
- ACIMM 642	<i>L. monodon</i>	<i>L. monodon</i>	SLC tóxico	3.3	"
- ACIMM 642	<i>L. monodon</i>	<i>L. monodon</i>	Exotoxina proteica (T2) con bandas proteicas de 58, 48, 47, 46, 45, 39, 21 kDa.	2.2	"
<i>V. alginolyticus</i>					
- cepa Val	<i>L. monodon</i>	<i>L. monodon</i>	PEC tóxico	0.23	Lee <i>et al.</i> 1996
"	"	<i>M. japonicus</i>	PEC tóxico	0.63	"
- cepa Swy	<i>M. japonicus</i>	<i>M. japonicus</i>	PEC tóxico	0.27	Lee <i>et al.</i> 1997
"	"	"	Alcalin serin proteasa, 33 kDa,	0.3	"
			Alcalin serin proteasa. Hemolinfa incapaz de coagular. 33 kDa, pH 8 a 11	0.29	Chen <i>et al.</i> 1999
- cepa SF 5		<i>L. stylirostris</i>	PEC citotóxico		Goarant <i>et al.</i> , 2000
<i>V. penaeicida</i>					
- cepa AM101	<i>L. stylirostris</i>	<i>L. stylirostris</i>	PEC citotóxico inactivado por calor		"
<i>V. nigripulchritudo</i>					"
- cepa AM102	<i>L. stylirostris</i>	<i>L. stylirostris</i>	PEC citotóxico		"
<i>V. parahaemolyticus</i>					
- cepa 25C	<i>P. orientalis</i>	<i>L. monodon</i>	Fracciones tóxicas proteolíticas (F1 y FII), no inactivadas con calor	8	Sudhesh y Xu 2001

^aAg proteína por g⁻¹ de peso del camarón (a), μ g de proteína por camarón (b) *Marsupenaeus japonicus*

i) INGESTION DE LA EXOTOXINA PRE-FORMADA



ii) COLONIZACION DE HERIDAS Y MUCOSAS SEGUIDO DE LA PRODUCCION DE LA EXOTOXINA



iii) COLONIZACION DE HERIDAS SEGUIDO DE LA PRODUCCION LOCAL DE LA EXOTOXINA

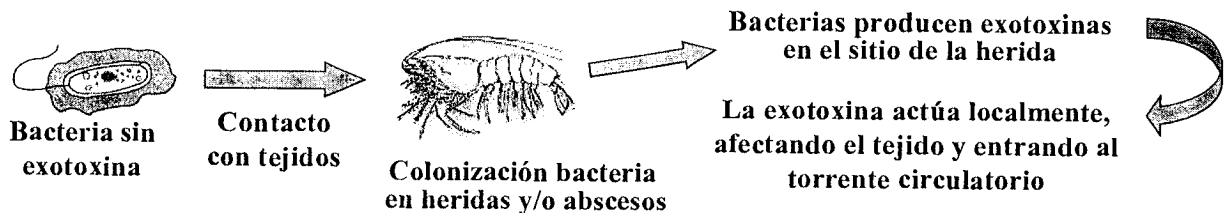


Figura 1.- Posibles vías por las cuales pueden entrar en contacto las exotoxinas bacterianas con el camarón y causar enfermedad (adaptado de Salyers y White 1994).

La acuicultura crea un medio ambiente artificial que favorece la selección, adaptación, y crecimiento de diversos agentes infecciosos, que son parte de la microbiota acuática y del organismo en sí (Jiravanichpaisal *et al.* 1994). Este fenómeno no representa un riesgo para la salud del mismo, excepto cuando éste posee alguna deficiencia nutricional, inmunológica, o genética, y/o que esté bajo estrés ambiental (Wang y Leung 2000).

Los vibrios son agentes patógenos oportunistas que pueden tomar ventaja de los cambios ecológicos generados por la acuicultura, constituyendo además un importante elemento de la población bacteriana del camarón y del medio ambiente que los rodea (Gomez *et al.* 1998, Vandenberghe *et al.* 1999), siendo por lo tanto una fuente constante de posibles infecciones para estos organismos. Es limitado el número de especies de *Vibrio sp.* que afectan al camarón de cultivo; sin embargo, las múltiples actividades antropogénicas relacionadas con la acuicultura ha propiciado el traslado de diversos agentes infecciosos hacia

nuevos ambientes, convirtiendo a algunos de ellos en un problema global de alto impacto (Durand *et al.* 2000). Agentes bacterianos como *V. penaeicida* han sido responsables de grandes pérdidas económicas en la producción de camarón *M. japonicus* y *L. stylirostris* de países como Japón (1985) y Nueva Caledonia (1993), respectivamente. Aunado al hecho de que reproductores de *L. stylirostris* fueron transportados desde Nueva Caledonia a México para su uso en el mercado nacional (CCAAN 1998). *Vibrio penaeicida* puede llegar a ser un agente patogénico importante para las principales especies de camarón empleadas en la acuicultura mexicana (*L. vannamei* y *L. stylirostris*), por lo cual resulta de gran interés establecer el grado de patogenicidad que posee *V. penaeicida* en estas especies de camarón, determinando además sus posibles mecanismos patogénicos. Esto permitirá a establecer estrategias adecuadas para prevenir y remediar los daños que pueda llegar a ocasionar esta especie de *Vibrio* en la acuicultura nacional.

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar el grado de patogenicidad de *V. penaeicida* en el camarón (*Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*) y determinar la existencia de exotoxinas de tipo proteico, como uno de los mecanismos de virulencia que posee este microorganismo.

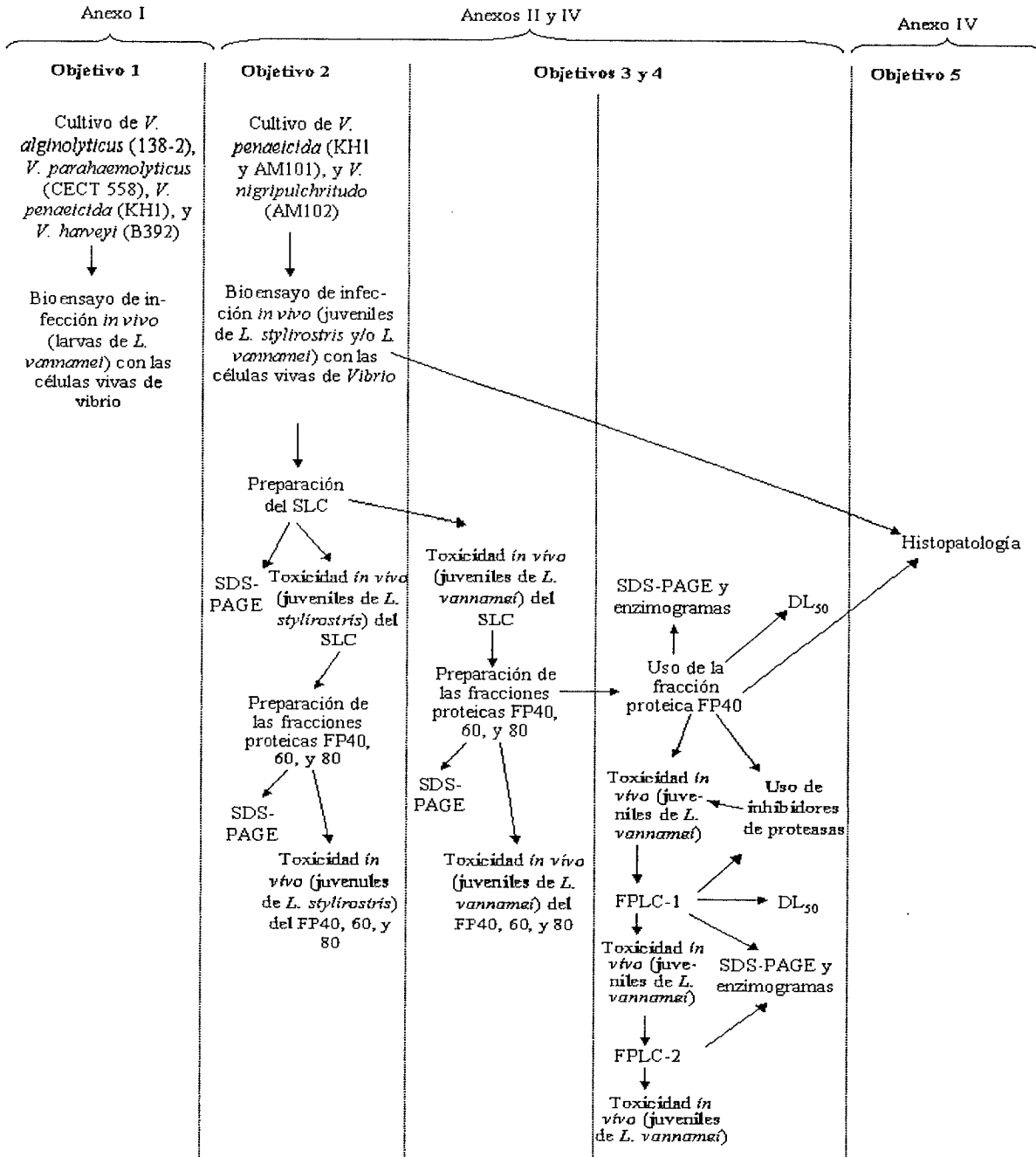
Objetivos específicos

1. Determinar la patogenicidad que poseen diferentes cepas de *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. penaeicida*, y *V. harveyi*) en distintos subestadios larvales del camarón blanco *L. vannamei*.
 2. Determinar la patogenicidad de las principales cepas de *V. penaeicida* reportadas, KH-1 y AM101, y la toxicidad de sus sobrenadantes libres de células (SLC) en juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*.
 3. Evaluar la toxicidad de diferentes fracciones proteicas obtenidas a partir del SLC de *V. penaeicida*, cepa KH-1 y AM101, y calcular la DL₅₀ de la fracción que resulte tóxica en juveniles de camarón blanco *L. vannamei*.
 4. Caracterizar parcialmente las fracciones proteicas obtenidas del SLC de *V. penaeicida* y que presenta toxicidad para camarón.
 5. Determinar el efecto histopatológico que genera *V. penaeicida* y las fracciones proteicas con toxicidad en juveniles de camarón *L. vannamei*.
-

METODOLOGÍA

Una descripción completa de los materiales y métodos empleados a lo largo del presente trabajo a fin de desarrollar y cubrir los objetivos planteados en el mismo, están descritos en los Anexos I, II, y III.

Diseño experimental



RESULTADOS

I.- Patogenicidad de diferentes cepas de *Vibrio* en larva de camarón (Anexo I)

La sensibilidad de todos los subestadios larvales del camarón *L. vannamei* (nauplio, protozoa I-III, mysis I-III, y postlarva 1) hacia *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, y *V. penaeicida*, fue evaluada bajo condiciones experimentales. Las infecciones fueron realizadas por medio de retos por balneación (30 min) a dosis de 10^3 , 10^5 , y 10^7 ufc mL⁻¹ (Fig. 2). Una sobrevivencia similar al control fue observada en todos los subestadios del camarón que fueron infectados con *V. alginolyticus*, en todas las dosis bacterianas probadas, siendo esta significativamente mayor ($P < 0.01$) en las infecciones realizadas con las otras cepas de *Vibrio*, en todas sus dosis. *Vibrio penaeicida* produjo una mortalidad significativa en todos los subestadios larvales desde la dosis más baja (10^3 ufc mL⁻¹). *Vibrio harveyi* y *V. parahaemolyticus* indujeron una mortalidad significativa en las larvas ($P < 0.01$) pero solo en las dosis más altas. Los subestadios larvales del camarón demostraron tener una sensibilidad derivada de la especie de *Vibrio*, la dosis, y el subestadio larva (Anexo 1).

II.- Patogenicidad de *V. penaeicida* en juveniles de camarón (Anexos II y III)

La patogenicidad de dos cepas de *V. penaeicida*, KH-1 y AM101, con diferente origen geográfico, fue investigada en camarones juveniles de *L. stylirostris* (Anexo II) y *L. vannamei* (Anexo III).

Las bacterias vivas, el SLC, y las fracciones proteicas (FP40, FP60, FP80) obtenidas del SLC por medio de precipitación con sulfato de amonio fueron evaluadas usando retos experimentales. Las cepas KH-1 y AM101 se usaron a una dosis de 10^4 ufc mL⁻¹ mediante un reto de balneación (1 h). Los camarones *L. stylirostris* y *L. vannamei* infectados tuvieron una mortalidad acumulada de 12 y 60%, y 27 y 58% post-infección (120 h) (Tabla II).

El SLC y FP40 de la cepa AM101 mostraron tener efectos tóxicos sobre los camarones juveniles, en donde solo la FP40 de la cepa KH-1 generó éste efecto (Tabla III). A las 48 h post-inyección de cada SLC, se observó una mortalidad de 98 y 5% para *L. stylirostris*, y 78 y 15% para *L. vannamei*, respectivamente. Para ambas cepas de *V. penaeicida*; y para las dos especies de camarón, la FP60 y FP80 generaron una mortalidad desde 0 hasta 15%, mientras que la FP40 generó una mortalidad mayor del 90% (Tabla III).

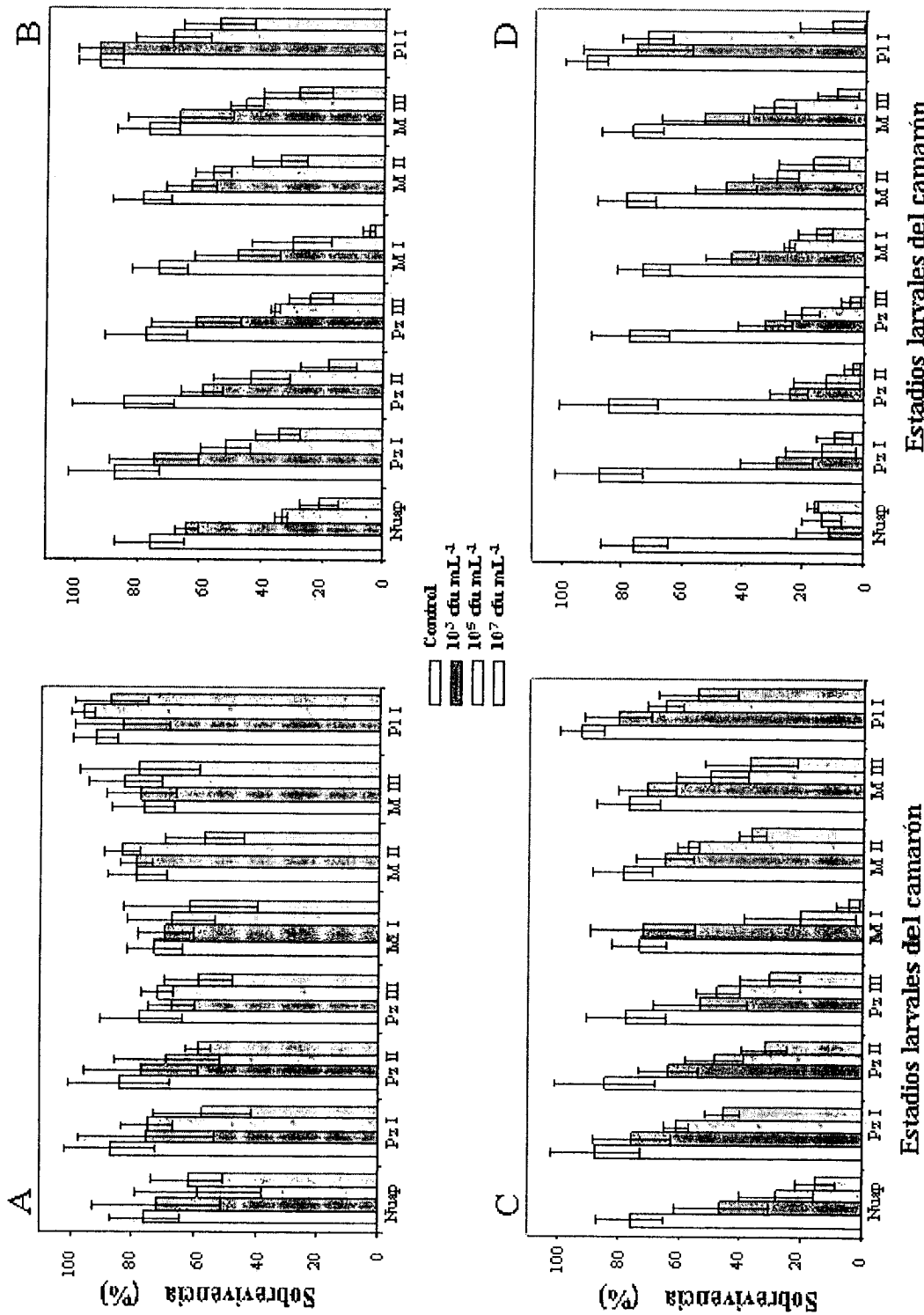


Figura 2.- Sobrevivencia de los subestadios larvales del camarón (*L. vannamei*) infectados con las cepas experimentales: *V. alginolyticus* (a), *V. harveyi* (b), *V. parahaemolyticus* (c), y *V. penaeicida* (d) en sus diferentes dosis.

Tabla II.- Porcentaje de mortalidad (\pm DE) de camarones juveniles de *L. vannamei* y *L. stylirostris* infectados con las células vivas de *V. penaeicida*, cepa KH-1 y AM101.

Tratamientos	<i>L. vannamei</i> (n = 45)	<i>L. stylirostris</i> (n = 50)
Cepa AM101	58 \pm 7 ^a	60
Cepa KH-1	27 \pm 7 ^b	12
Control 1	11 \pm 4	5

Control 1: Camarones no infectados

^{a, b} Las letras diferentes indican los grupos con significancia definida por Duncan ($P < 0.05$).

Tabla III. Porcentaje de mortalidad (\pm DE) de camarones juveniles de *L. vannamei* y *L. stylirostris* (n = 40) inyectados intra-muscularmente con el SLC o fracciones proteicas de *V. penaeicida*, cepa KH-1 y AM101 (20 μ g org⁻¹).

Tratamientos	<i>L. vannamei</i>				<i>L. stylirostris</i>			
	SLC	Frac. proteicas			SLC	Frac. proteicas		
		40	60	80		40	60	80
Cepa AM101	78 \pm 10 ^a	98 \pm 5 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	98	90	15	0
Cepa KH-1	15 \pm 8 ^b	60 \pm 8 ^a	0 \pm 0	0 \pm 0	5	60	10	15
Control 1	5 \pm 5 ^b	3 \pm 5 ^b	0 \pm 0	0 \pm 0	3	4	5	5
Control 2	8 \pm 5 ^b							
Control 3	0 \pm 0				5			

Control 1: Caldo cerebro corazón (BHI, siglas en inglés); Control 2: Camarones inyectados con agua marina artificial estéril; Control 3: Camarones no inyectados

^{a, b} Las letras diferentes indican los grupos con significancia definida por Duncan ($P < 0.05$).

III.- Toxicidad y características de las fracciones proteicas extracelulares de *V. penaeicida*, como factores de virulencia (Anexos II y III).

La FP40 de *V. penaeicida*, cepa AM101, fue fraccionada por medio de cromatografía en gel (FPLC, fast protein liquid chromatography) con Superosa 12, determinando posteriormente la toxicidad de las subfracciones obtenidas mediante pruebas *in vivo* en camarones juveniles de *L. vannamei* (Anexo III). De igual forma, se calculó la DL₅₀ y se analizaron las características de las principales subfracciones tóxicas mediante el uso de inhibidores de proteasas (Anexos II y III) y enzimogramas (Anexo III), determinando además los efectos histopatológicos propiciados por la bacteria viva de *V. penaeicida*, cepa AM101, y su FP40 en camarones juveniles *L. vannamei* (Anexo III).

Fraccionamiento de la FP40

A partir de la FP40 se obtuvieron las subfracciones denominadas A, B, C, y D (FPLC 1). De éstas muestras, solamente la subfracción A mostró tener una toxicidad significativa ($P < 0.05$) para camarones *L. vannamei*, a las 42 h post-inyección (Tabla IV). Esta muestra fue nuevamente fraccionada al aumentar la sensibilidad del equipo de FPLC (Superosa 12), obteniendo cinco subfracciones denominadas como A1 - A5 (Anexo III). Solamente la subfracción A1 mostró tener un toxicidad significativa ($P < 0.05$) para camarones *L. vannamei*, a las 42 h post-inyección (Tabla IV, Anexo III). Para ambos casos, se necesitaron varias corridas consecutivas para obtener la suficiente proteína para las diversas pruebas. Estas proteínas fueron dializados en agua destilada estéril a 4°C, y concentrados por medio de liofilización. La tabla V muestra el contenido de proteína, tiempo de retención, y número de fracciones obtenidas a partir de la FP40 y la subfracción A, cuyos perfiles cromatográficos y electroforéticos pueden observarse en la figura 3.

Tabla IV.- Porcentaje de mortalidad (+ DE) de camarones juveniles (*L. vannamei*) inyectados intra-muscularmente con 25 μ L (10 μ g de proteína mL⁻¹) de la FP40 y subfracciones obtenidas a partir de la FPLC 1 y 2.

Tratamientos	FPLC 1	Tratamientos	FPLC 2
FP40	100 \pm 0 ^a	FP40	98 \pm 5 ^a
A	100 \pm 0 ^a	A	100 \pm 0 ^a
B	0 \pm 0	A1	95 \pm 6 ^a
C	0 \pm 0	A2	0 \pm 0
D	0 \pm 0	A3	15 \pm 6 ^b
Control 1	0 \pm 0	A4	3 \pm 5 ^b
Control 2	0 \pm 0	A5	3 \pm 5 ^b
		Control 1	5 \pm 6 ^b
		Control 2	3 \pm 5 ^b

Control 1: Camarones inyectados con agua marina artificial estéril; Control 2: Camarones no inyectados
^{a, b} Las letras diferentes indican los grupos con significancia definida por Duncan ($P < 0.05$).

Tabla V.- Contenido de proteína de la FP40 y sus diversas subfracciones obtenidas a partir del SLC de *V. penaeicida*, cepa AM101, por medio de FPLC (Superosa 12).

	FP40 cruda	FPLC 1				FPLC 2				
		A	B	C	D	A1	A2	A3	A4	A5
Proteína (μ g mL ⁻¹)	1296	3.21	7.77	26.11	16.63	32.10	5.15	20.89	22.15	17.38
Núm. de fracciones	---	4	6	10	4	3	2	4	2	4
Retención (min)	---	32	42	61	75	32	51	67	78	84

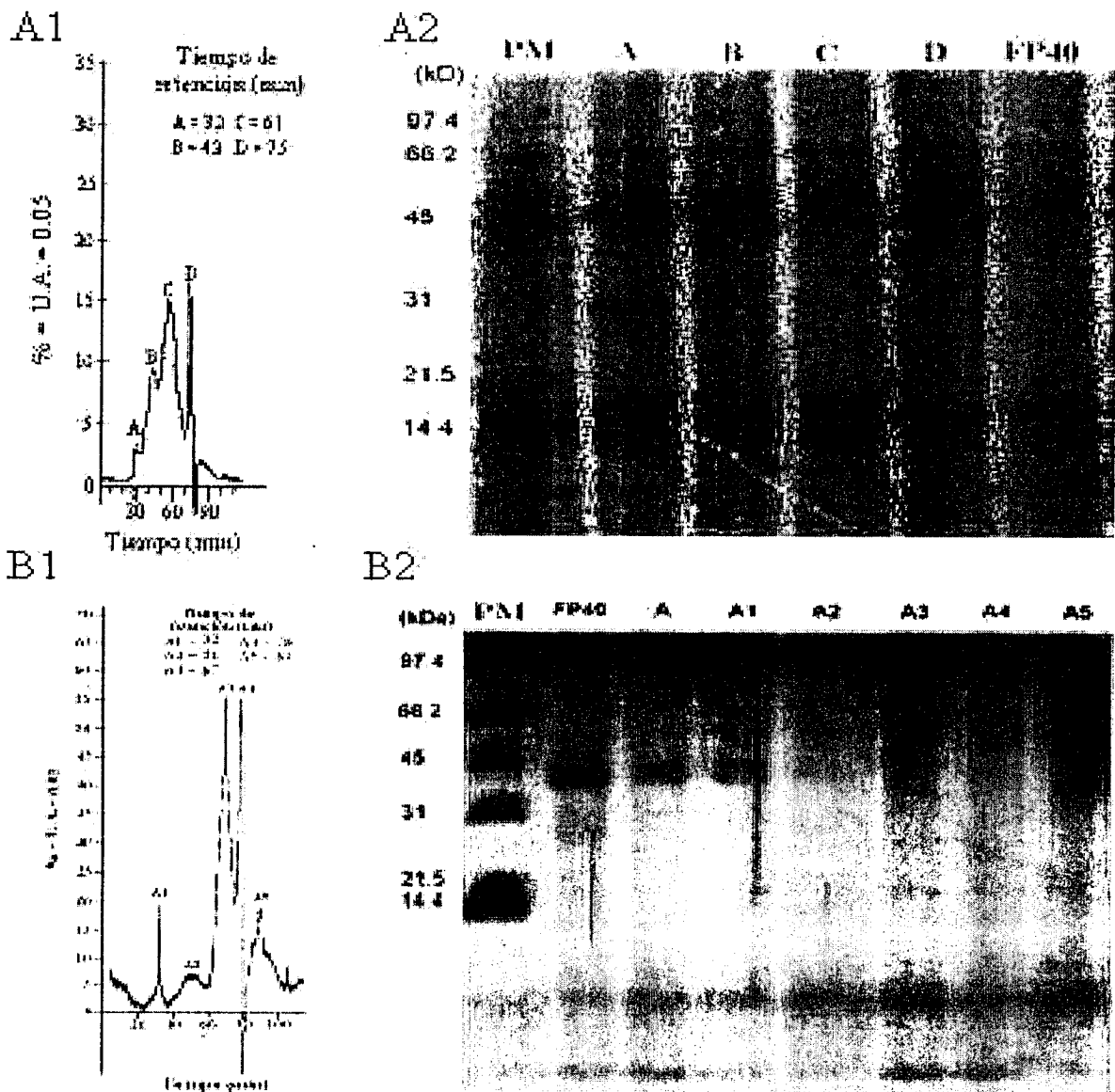


Figura 3.- Perfil cromatográfico de la FP40 (A1) y subfracción A (A2) de *V. penaeicida*, cepa AM101, y sus correspondientes perfiles electroforéticos (B1 y B2). SDS-PAGE al 10%, teñido con nitrato de plata. UA: Unidades de absorbancia, PM: marcador de peso molecular.

Dosis letal media (DL₅₀), inhibidores de proteasas, e histopatología

La FP40 de *V. penaeicida*, cepa AM101, presentó una DL₅₀ de 5 y 5.61 μg proteína org⁻¹ en *L. stylirostris* y *L. vannamei*, respectivamente, siendo éstos valores menores al observado para la cepa KH-1 (15.43 μg de proteína org⁻¹).

Los tratamientos con EDTA-Na₂, aprotinina, e inhibidor de tripsina de soya no disminuyeron la toxicidad de la FP40 y subfracción A obtenida a partir del SLC de *V. penaeicida*, cepa AM101, hacia camarones *L. vannamei*. Mientras que la digestión con proteinasa K, los tratamientos térmicos, y el uso de CuCl₂ y E-64 generaron una pérdida significativa ($P < 0.05$) en la toxicidad de estas mismas muestras. Resultados similares fueron observados al inyectar intra-muscularmente camarones *L. stylirostris* con la FP40 (Tabla VI).

Signos externos e histológicos de enfermedad semejantes fueron observados en los camarones *L. vannamei* que fueron inyectados intra-muscularmente con la FP40 de *V. penaeicida*, cepa AM101, o infectados con las células viva de ésta (Anexo III).

Tabla VI.- Porcentaje de mortalidad (\pm DE) de camarones *L. vannamei* y *L. stylirostris*, inyectados intra-muscularmente con la FP40 o subfracción A de *V. penaeicida*, cepa AM101, en presencia de distintos inhibidores de proteasas.

	<i>L. vannamei</i>				<i>L. stylirostris</i>	
	Inhibidor de proteasas		Grupo Control	Grupo Control	Inhibidor de Proteasas	Grupo control
	FP40	Frac. A				
CuCl ₂	40 \pm 8 ^a	38 \pm 5 ^a	CuCl ₂	2.5 \pm 5	5 \pm 6	
E-64	37 \pm 10 ^a	38 \pm 11 ^a	E-64	0 \pm 0	3 \pm 5	
Aprotinina	93 \pm 10 ^b	98 \pm 5 ^b	Aprotinina	0 \pm 0	3 \pm 5	
Prot. K	3 \pm 5 ^a	5 \pm 6 ^a	Prot. K	0 \pm 0	0 \pm 0	14
EDTA-Na ₂	75 \pm 13 ^b	95 \pm 6 ^b	EDTA-Na ₂	2.5 \pm 5	0 \pm 0	100
Tripsina	90 \pm 8 ^b	98 \pm 5 ^b	Tripsina	2.5 \pm 5	0 \pm 0	100
40°C	95 \pm 6 ^b	93 \pm 10 ^b	No inyec.	0 \pm 0	0 \pm 0	0
60°C	18 \pm 15 ^a	10 \pm 9 ^a	Agua	0 \pm 0	3 \pm 5	16
100°C	8 \pm 10 ^a	3 \pm 5 ^a	FP40	95 \pm 6 ^b	98 \pm 5 ^b	0
			Frac. A		100 \pm 0 ^b	0

Agua: Camarones inyectados con agua marina artificial estéril; No inyec.: Camarones no inyectados, Prot. K: Proteínasa K. Tripsina : Inhibidor de tripsina de soya.

^{a, b} Las letras diferentes indican los grupos con significancia definida por Duncan ($P < 0.05$).

Enzimogramas e inhibidores de proteasas

Una actividad proteolítica en el SDS-PAGE con gelatina (10 mg mL⁻¹) fue observada en la FP40, y las subfracciones A, y A1 de *V. penaeicida*, cepa AM101, en donde las subfracciones A y A1 muestran una sola banda proteolítica (Fig. 4A). Los tratamientos con EDTA-Na₂, aprotinina, e inhibidor de tripsina de soya no surtieron efecto alguno en la acti-

vidad proteolítica de la FP40 (Fig. 4B), mientras que el uso de CuCl_2 , E-64, y de tratamiento a 60°C generaron la pérdida de actividad proteolítica de diversas bandas de la FP40 y en particular de la misma banda contenida en las subfracciones A y A1 (Fig. 4A).

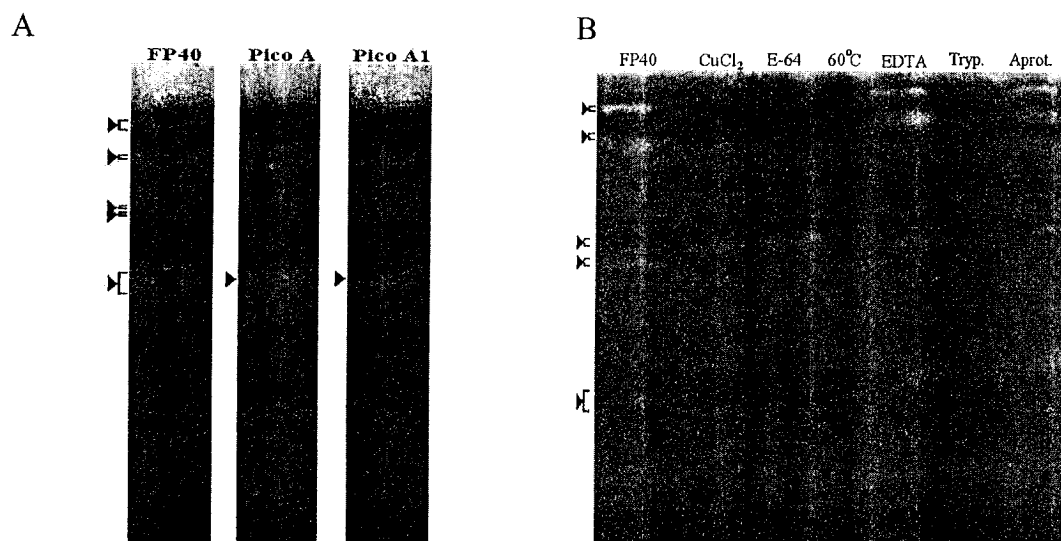


Figura 4.- Enzimograma proteolítico de la FP40, subfracciones A, y A1 de *V. penaeicida*, cepa AM101 (A) y FP40 sujeto a distintos inhibidores de proteasas (B). SDS-PAGE al 10% con gelatina (10 mg mL^{-1}), después de ser teñido con azul brillante coomassie R-250.

DISCUSIÓN

Patogenicidad de diferentes especies de *Vibrio*

Los vibrios son agentes patógenos que afectan a un amplio rango de organismos invertebrados (Lightner 1996) y que poseen una gran variación en lo que a patogenicidad se refiere. La causa de esta variación no son entendidos del todo, pero la evidencia señala que ésta depende de distintos factores relacionados con el hospedero (especie, edad, estado fisiológico, etc.), la especie y cepa de *Vibrio*, dosis, y método de infección (Prayitno y Latchford 1995, Hameed 1995, Costa *et al.* 1998, Harris y Owens 1999, Saulnier *et al.* 2000b).

Las larvas y postlarvas infectadas con *V. penaeicida*, cepa KH-1, mostraron signos de enfermedad tales como opacidad del cuerpo, lesiones, necrosis en los apéndices, letargia, y malformaciones. Signos similares fueron observados en otras especies de camarones que fueron infectados con *V. harveyi*, y *V. parahaemolyticus* (Hameed 1993, Karunasagar *et al.* 1994, Muroga *et al.* 1994, Robertson *et al.* 1998). *Vibrio penaeicida*, produjo una mayor mortalidad comparada con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*, en todos los subestadios larvales del camarón (Fig. 2), siendo además los subestadios desde nauplio hasta protozoa III los que presentaron la mayor sensibilidad hacia estos agentes patógenos. Una progresiva resistencia de las larvas de *M. japonicus*, *P. indicus*, *L. monodon* y *P. semisulcatus* hacia especies de *Vibrio* patógenas ha sido observada conforme estos organismos avanzan en su desarrollo (Muroga *et al.* 1994, Hameed 1995). La disminución en la susceptibilidad de las larvas puede deberse a modificaciones fisiológicas e inmunológicas que se dan durante la metamorfosis (Goarant *et al.* 1998) o bien al establecimiento y balance de una microflora intestinal, la cuál disminuye los efectos de los agentes patógenos (Yasuda y Kitao 1983, Rengpipat *et al.* 1998).

No se detectó una diferencia significativa en la sobrevivencia de las larvas que fueron infectadas con *V. alginolyticus* con las dosis de $10^3 - 10^7$ ufc mL⁻¹, comparado con sus correspondientes homólogas del grupo control (Fig. 2). El efecto observado en este trabajo sobre los subestadios larvales del camarón, además de los reportados por Austin *et al.* (1995) y Vandenberghe *et al.* (1998), sugieren la necesidad de realizar mayores estudios sobre la influencia e interacción que se presenta entre *V. alginolyticus* y las larvas, a fin de evaluar su potencial como un agente probiótico.

Vibrio harveyi y *V. parahaemolyticus* tuvieron un efecto similar en las larvas de camarón *L. vannamei*, en donde las dosis de 10^5 y 10^7 ufc mL⁻¹ causaron una alta mortalidad en todos los subestadios larvales del camarón (Fig. 2), resultados similares fueron reportados para *L. monodon* (Alapide y Dureza 1997). Una mayor mortalidad fue observada en larvas de *L. monodon* y *P. chinensis* infectadas con *V. harveyi*, a las dosis de 10^3 - 10^5 , y 10^4 ufc mL⁻¹ (Vandenberghé *et al.* 1998, Karunasagar *et al.* 1994), mientras que *V. harveyi* (BP04) y *V. splendidus* causaron una mortalidad significativa ($P < 0.05$) en larvas de *L. monodon* y *P. indicus* a dosis desde 10^3 hasta 10^4 ufc mL⁻¹ (Prayitno y Latchford 1995). Esto confirma que la patogenicidad de *Vibrio* spp. esta relacionada con la cepa del mismo.

La superficie de las larvas, las branquias, apéndices de alimentación, molino gástrico, y tracto intestinal pueden ser colonizados por bacterias que pueden establecerse en los tejidos del hospedero (Lightner 1996, Vandenberghé *et al.* 1998). Estas pueden llegar a ser ruta de infección factible para protozoa, mysis, y postlarva porque su forma de alimentación favorece este proceso. Sin embargo, los nauplios poseen reservas vitelinas y la infección oral no es posible ya que la boca aún no está presente en el organismo. Esto sugiere que algunos factores virulentos extracelulares pudieron participar en el proceso de infección ocasionado por *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, y *V. penaeicida* en los nauplios de *L. vannamei*.

Patogenicidad de *V. penaeicida*

Vibrio penaeicida ha demostrado ser un agente patógeno primario para camarón (Saulnier *et al.* 2000a) que ha sido involucrado en el mayor declive de la producción de *M. japonicus* en Japón y *L. stylirostris* en Nueva Caledonia, destacando en esta especie de *Vibrio* las cepas KH-1 y AM101, respectivamente (Ishimaru *et al.* 1995, Costa *et al.* 1998, Takahashi *et al.* 1998). Una DL₅₀ de 1.3×10^4 ufc mL⁻¹ fue determinada al infectar juveniles de *L. stylirostris* con la cepa AM101, 48 h post-infección (Saulnier *et al.* 2000b). Mientras que juveniles de *M. japonicus* infectados con la cepa KH-1 mostraron una DL₅₀ de 10^2 y 10^3 ufc org⁻¹, 72 h post-inyección intra-muscular (de la Peña *et al.* 1993, Takahashi *et al.* 1998). Los resultados muestran que la mortalidad generada por la cepa KH-1, a 120 h post-infección (10^4 ufc mL⁻¹) en *L. stylirostris* y *L. vannamei*, es significativamente inferior (12 y 26.7%) a la cepa AM101 (60 y 57.8%, respectivamente)(Tabla II). Esto puede sugerir que ambas cepas de *V. penaeicida*, KH-1 y AM101, poseen una patogenicidad específica en

contra de su hospedero original, tal como lo reporta Saulnier *et al.* (2000a).

La patogenicidad de *V. penaeicida*, cepa KH-1 y AM101, en juveniles *L. stylirostris* (3.5 – 5g, Anexo II) y *L. vannamei* (1 - 1.2 g, Anexo III) fue evaluada usando el mismo protocolo, siendo además observados sus efectos a las 97 y 120 h, respectivamente. Contrariamente a lo reportado por Lotz (1997) quien sugiere que la resistencia de *L. vannamei* hacia los agentes patógenos aumenta con el peso, este trabajo muestra que los camarones con menor peso fueron los que más resistieron a la mortalidad producida por ambas cepas de *V. penaeicida*. Estos resultados pueden sugerir una mayor resistencia a este agente patógeno por parte de *L. vannamei* que de *L. stylirostris*, la cuál puede estar relacionada con alguna variable (inmunológica, genética) que determina esta resistencia. Cabe destacar que el proceso de domesticación al que están sujetos algunas líneas de camarones, como los empleados en éste trabajo (Anexo II y III), puede traer consigo una disminución en el estatus genético general de los mismos (Berzie 1998, 2000). La mortalidad observada entre las dos líneas de camarón usadas en este trabajo, sugiere la posibilidad de que este factor pueda estar involucrado en los resultados producidos por *V. penaeicida* sobre *L. stylirostris*.

Existen diversos factores específicos (toxinas, receptores, bacteriófagos) relacionados con la patogenicidad, siendo algunos de estos dependientes de la bacteria y otros del hospedero (Salyers y White 1994, Brumell y Finlay 2000). Es conocido que los bacteriófagos pueden conferir virulencia e incrementar la diversidad genética de *Vibrio* spp. (Kellogg *et al.* 1995, Harris y Owens 1999, Ruangpan *et al.* 1999). Estos han sido involucrados en la patogenicidad de *V. harveyi*, cepa 47666-1, hacia camarones *L. monodon* (Oakey y Owens 2000, Harris 2002). Un bacteriófago fue detectado en *V. penaeicida*, cepa AM23, la cuál fue aislada de camarones moribundos durante el episodio de mortalidad de Nueva Caledonia en 1995 (Saulnier Com. personal). Esto podría ayudarnos a explicar la diferencia en la patogenicidad que existe entre las cepas de *V. penaeicida*, KH-1 y AM101.

Toxicidad del sobrenadante libre de células (SLC) y Fracciones proteicas

La toxicidad del SLC de cepas patogénicas de *Vibrio* sobre organismos marinos ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro* (Liu *et al.* 1996, Lee *et al.* 1997, Harris y Owens 1999, Montero y Austin 1999, Goarant *et al.* 2000), pero aún no está bien entendido el papel que juegan los factores tóxicos contenidos en el SLC en la patogenicidad de estas bacterias. La

mortalidad (5 y 15%) que se observa en los juveniles de *L. stylirostris* y *L. vannamei* que fueron inyectados con el SLC de la cepa KH-1 es inferior al mostrado por el SLC de AM101 (98 y 78%)(Tabla III).

A fin de caracterizar los componentes involucrados en la toxicidad, las proteínas del SLC de las cepas de *V. penaeicida*, KH-1 y AM101, fueron precipitadas por la adición de sulfato de amonio (FP40, FP60, y FP80). Solo las FP40 aisladas de los cultivos a 20°C mostraron una actividad tóxica sobre camarones *L. stylirostris* (Anexo II) y *L. vannamei* (Tabla III), siendo significativamente superior (< 90%) la actividad tóxica mostrada por la FP40 de AM101 que la desplegada por su homóloga (60%). La distinta toxicidad que generan los SLC de *V. penaeicida*, cepa KH-1 y AM101, sobre *L. stylirostris* y *L. vannamei* puede sugerir que los dos *Vibrio*, geográficamente aislados, poseen alguna diferencia específica (genética) a nivel de tipo de toxina contenida en el SLC o en la cantidad de la misma. Sin embargo, los resultados de mortalidad expuestos por el FP40 de la cepa KH-1 y el hecho de que la precipitación con sulfato de amonio es un proceso que favorece la concentración de los factores extracelulares tóxicos de tipo proteico que son producidos por las bacterias, refuerza la hipótesis de que la diferencia en la mortalidad observada (Anexo III) con el SLC y la FP40 de la cepa KH-1 se debe a una mayor concentración del factor tóxico en la muestra.

Los juveniles *L. stylirostris* presentaron el mismo comportamiento de mortalidad que *L. vannamei*, cuando fueron inyectados intra-muscularmente con la FP40 de las cepas KH-1 y AM101 (Anexo II), con un pico máximo de mortalidad a las 16 y 48 h, respectivamente. Estos resultados nuevamente sugieren que de alguna forma que *L. vannamei* poseen una mayor resistencia a los efectos generados por el SLC y la FP40 que *L. stylirostris*.

La producción de factores tóxicos de *Vibrio* spp. es controlada por elementos reguladores que son sensibles a los factores estresantes, tales como alta y baja temperatura (Pelczar *et al.* 1982). En este estudio se usó el SLC y la FP40 producidas por las cepas *V. penaeicida*, KH-1 y AM101, cultivadas a 30 y 20°C. Esta última mostró tener un efecto letal sobre *L. stylirostris* (Anexo II), lo cual indica que la virulencia del SLC está relacionada con una condición dependiente de la temperatura, como es sugerido por Finlay y Falkow (1997).

Este es el primer reporte que evidencia la presencia de un factor(es) tóxico(s) extracelular(es) obtenido mediante la precipitación con sulfato de amonio en las dos cepas de *V. pe-*

penaeicida, KH-1 y AM101, las cuales tienen un perfil electroforético (SDS-PAGE) parecido (Anexo II). La similitud entre los dos perfiles electroforéticos y el hecho que estos fueron obtenidos por medio de precipitación con sulfato de amonio, hace pensar en la presencia de un componente tóxico o un conjunto de elementos tóxicos en común y de tipo proteico, el cual puede llegar a generar mortalidad en los camarones *L. stylirostris* y *L. vannamei*.

Dosis letal media (DL₅₀)

La DL₅₀ calculada en juveniles de *L. vannamei* para la FP40 del SLC de *V. penaeicida*, cepa KH-1 y AM101, fue estimada en 15.43 y 5.61 µg de proteína org⁻¹ (Anexo III), siendo este valor último valor similar al encontrado para *L. stylirostris* (5 µg proteína org⁻¹) (Tabla VI). Estos valores pueden ser comparados con la DL₅₀ para el SLC preparado de *V. parahaemolyticus*, cepa 25C (8 µg de proteína org⁻¹) y *V. harveyi*, cepa E2 (4.4 µg de proteína org⁻¹) en *L. monodon* y *Nephrops norvegicus* (Montero y Austin 1999, Sudheesh y Xu 2001). Por otra parte, la DL₅₀ calculada de la subfracción A de la FP40 de la cepa AM101 fue de 1.68 µg de proteína org⁻¹ (Anexo III). Este valor de DL₅₀ es menor al reportado por Haris y Owens (1999) para las subfracciones T1 y T2 (1.8 y 2.2 µg de proteína g⁻¹ peso del camarón *L. monodon*) obtenidas a partir del SLC de *V. harveyi*. Sugiriendo que la especie y cepa de *Vibrio* es un factor importante en lo que respecta al tipo y cantidad de las toxinas producidas, y que estas pueden actuar en forma diferente dependiendo del hospedero.

Histología

Signos externos no específicos de enfermedades originados por miembros del género *Vibrio* han sido reportados en *L. vannamei*, *L. monodon*, *L. stylirostris*, y *M. japonicus* (Jiravanichpaisal *et al.* 1994, Lightner 1996, Smith 2000). Signos externos tales como nado errático, aletargamiento, tracto intestinal vacío o semi-vacío, decoloración del cuerpo, y mortalidad fueron observados en los camarones *L. vannamei* que fueron infectados con *V. penaeicida*, cepa AM101, y FP40 proveniente de esta misma cepa (Anexo III). Por medio de histología, se observa en camarones infectados con bacterias vivas, placas bacterianas en el lumen de los túbulos del hepatopáncreas, inflamación y ausencia de vacuolas lipídicas, los cuales son signos característicos de camarones infectados con *Vibrio* (Jiravanichpaisal *et al.* 1994, Lavilla *et al.* 1998, Ruangpan *et al.* 1999). Presencia ideopática de núcleos pic-

nóticos y cariorréticos en las glándulas antenales tenían, aunado a una infiltración hemocítica severa en los sinus intertubulares se observa en camarones infectados con la bacteria viva, y en los inyectados con la FP40. Granulomas sépticos, hidrólisis idiopática de los túbulos del hepatopáncreas, e infiltraciones hemocíticas fueron observados solamente en los cortes histológicos provenientes de camarones inyectados con la FP40. Estos signos de enfermedad también han sido reportados para camarones *L. monodon* infectados con *V. harveyi* (Jiravanichpaisal *et al.* 1994, Lavilla *et al.* 1998, Ruangpan *et al.* 1999). Estos resultados permiten suponer que tanto la bacteria, como los productos contenidos en la FP40, puedan actuar de forma parecida (Anexo III).

Inhibidores, gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), y enzimogramas

Los tratamientos con calor (60 y 100°C) y proteinasa K inhibieron la actividad proteolítica (gelatina) y la toxicidad *in vivo* de la FP40 y la subfracción A obtenidas a partir del SLC de *V. penaeicida*, cepa AM101 (Anexo III). La actividad proteolítica, la pérdida de toxicidad de las muestras después de la digestión con la proteinasa K, y los tratamientos térmicos aunado al hecho de que la FP40 fue obtenido por precipitación con sulfato de amonio, sugiere la naturaleza proteica y termolábil del factor tóxico generado por *V. penaeicida*, cepa AM101. Resultados similares fueron observados para la FP40 de *V. penaeicida*, cepa AM101, cuando fue inyectada intra-muscularmente a camarones *L. stylirostris* (Tabla VI y Anexo II). Sudheesh y Xu (2001) observan el posible papel que juega en la patogenicidad, una proteasa obtenida por precipitación con sulfato de amonio a partir del PEC de *V. parahaemolyticus*, la cual fue afectada por el calor (70°C por 10 min) y mostró una alta actividad proteolítica hacia gelatina y caseína. Por otra parte, Montero y Austin (1999) sugieren la naturaleza no proteica de una exotoxina producida por *V. harveyi* debido a que esta no fue afectada por los tratamientos térmicos (60 y 100°C), ni es digerida por la proteinasa K.

Los resultados expuestos por los tratamientos con EDTA-Na₂, inhibidor de tripsina de soya, y aprotinina, durante los ensayos *in vivo* (*L. vannamei* y/o *L. stylirostris*) y en los enzimogramas, sugieren que el factor tóxico contenido en la FP40 y subfracción A no es una metaloproteasa, serin proteasa, o proteasa de tipo tripsina (Anexo III, Fig. 4B). Solo los tratamientos que utilizaron CuCl₂ y E-64 tuvieron un efecto inhibitorio significativo ($P < 0.05$)

en la toxicidad *in vivo* que presentan estas dos muestras. Los resultados de toxicidad *in vivo* detectados en estos dos últimos tratamientos, no presentaron diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ellos, lo cual parece deberse a que la FP40 y subfracción A contienen el mismo factor tóxico, el cual se comporta como una exotoxina de tipo cistein proteasa. Liu *et al.* (1997 y 1999) purifican y caracterizan una cistein proteasa obtenida a partir del SLC de un *V. harveyi* patógeno para *L. monodon*. Ellos reportan a CuCl_2 como un inhibidor de cistein proteasas que actúa completamente sobre este tipo de exotoxina, inhibiendo su capacidad de generar mortalidad cuando es inyectada intra-muscularmente a *L. monodon*.

Las subfracciones A y A1 fueron las únicas que generaron mortalidad a los camarones *L. vannamei* (Tabla IV) de forma similar a la FP40 (Anexo III). La subfracción A muestra distintas bandas proteicas de pesos moleculares aproximados de 54, 38.5, 31-25, 21, y 15.5-10.8 kDa (Anexo III), mientras que la subfracción A1 muestra bandas de proteínas con un peso molecular aproximado de 54, 38.5 kDa (Anexo III). Cabe destacar la similitud que presenta la banda de 38.5 kDa que se observa entre la FP40 y las subfracciones A y A1 (Anexo III) y que es la banda con actividad proteolítica que es inhibida por CuCl_2 y E-64 (Fig. 4A y B). Liu *et al.* (1997), Lee *et al.* (1999b) detectan una exotoxina de tipo de las cistein proteasa que es producida por un *V. harveyi* aislado de camarones enfermos (*L. monodon*), la cual tiene un peso molecular de 38 kDa y es totalmente inhibida por CuCl_2 .

Sumario

Este es el primer trabajo que evidencia los efectos que puede generar *V. penaeicida*, cepa KH-1 y AM101, en larvas o juveniles de *L. vannamei* y *L. stylirostris*. Este agente patógeno ha demostrado que puede producir una mortalidad significativa en los organismos, desde dosis de $10^3 - 10^4$ ufc mL^{-1} , lo cual lo convierte en un agente patógeno con un alto potencial de impacto en la acuicultura, si es que llega y se establece en América.

Las infecciones realizadas con *V. penaeicida*, cepa KH-1, causaron opacidad del cuerpo, lesiones, necrosis en los apéndices, letargia, y malformaciones en las larvas de *L. vannamei*, generando además una mayor mortalidad que *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, y *V. alginolyticus* desde la dosis mas baja (10^3 ufc mL^{-1}). Las infecciones realizadas con *V. penaeicida*, cepa AM101, causaron una mayor mortalidad en juveniles de *L. stylirostris* y *L. vannamei* que la cepa KH-1. Esto confirma que ambas cepas de *V. penaeicida* son agentes

patógenos importantes, tanto para larvas como juveniles. Además, estos hechos sugieren la existencia de una posible patogenicidad específica hacia el hospedero original, como lo reporta Saulnier *et al.* (2000a), o una diferencia genética entre las dos cepas que propicia estos resultados.

Se investigó la producción de factores tóxicos extracelulares para juveniles *L. vannamei* y *L. stylirostris* contenidos en el SLC de las dos cepas de *V. penaeicida*, a fin de establecer su papel como uno de los posibles mecanismos de patogenicidad que puede emplear este agente patógeno. Los resultados *in vivo* demostraron que el producto obtenido a partir del SLC por medio de precipitación con sulfato de amonio, a un 40% de saturación, permitía obtener una fracción proteica con actividad tóxica para los camarones. Sin embargo, estos resultados también establecieron que la FP40 proveniente de la cepa AM101 generaba una mayor mortalidad que la proveniente de la cepa KH-1, tanto en *L. vannamei*, como *L. stylirostris*. Esto sugiere una diferencia genética entre las dos cepas de *V. penaeicida* que puede observarse a nivel de la producción de los factores tóxicos contenidos en la FP40.

La FP40 obtenida del SLC de *V. penaeicida*, cepa AM101, fue fraccionada por medio de FPLC-1 y su subfracción tóxica pasó por un segundo proceso de FPLC-2. Las características de la FP40 y las subfracciones A y A1 fueron evaluadas *in vivo*, SDS-PAGE, enzimogramas, y mediante el uso de inhibidores de proteasas. Las pruebas *in vivo* mostraron que la FP40 y las subfracciones A y A1 fueron las únicas que generaban mortalidad en los juveniles *L. vannamei*, además de presentar una actividad proteolítica (enzimogramas) y una gran banda proteica en común de aproximadamente 38.5 kDa (SDS-PAGE). El uso de inhibidores de proteasas en la FP40 y subfracción A reveló que los tratamientos con calor (60 y 100°C), proteinasa K, CuCl₂ y E-64 tuvieron un efecto inhibitorio significativo ($P < 0.05$) en la toxicidad *in vivo*, dato que se confirmó en la actividad proteolítica (enzimogramas) de la FP40 sujeta a los mismos inhibidores. Esto nos sugiere que la FP40 y subfracciones A y A1 contienen el mismo factor tóxico, el cual se comporta como una exotoxina de tipo cistein proteasa.

CONCLUSIONES

- La mortalidad registrada tanto en larvas, como juveniles de camarón *L. vannamei* y/o *L. stylirostris* después de ser infectados con *V. penaeicida*, cepa KH-1 y AM101, demuestran que las dos cepas son agentes patógenos importantes que puede tener un gran impacto en la camaronicultura mexicana.
- Una concentración de 10^4 ufc mL⁻¹ de *V. penaeicida* generó mortalidad significativa en camarones juveniles *L. vannamei* y *L. stylirostris*, mientras que 10^3 ufc mL⁻¹ fue suficiente para generar el mismo efecto en las larvas de *L. vannamei*.
- La mortalidad larval observada después de ser expuestas a *V. penaeicida*, cepa KH-1, fue significativamente superior al de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. Las cuales produjeron la mortalidad más alta en las dosis de 10^5 y 10^7 ufc mL⁻¹.
- La mortalidad observada en los diferentes subestadios larvales del camarón, sugiere que la resistencia de éstas hacia los agentes patógenos aumenta con el desarrollo larval, pero que esto depende de la especie de bacteria y dosis de infección.
- La mortalidad observada en los camarones juveniles de *L. vannamei* al usar la bacteria viva, el SLC, y la fracción FP40 de *V. penaeicida*, cepa AM101 y KH-1, sugieren que existe alguna diferencia entre las dos cepas, misma que fue evidenciada mediante los diferentes resultados obtenidos en estas tres variables.
- La DL₅₀ calculada para la FP40 de *V. penaeicida*, cepa AM101, es menor que la observada para la cepa KH-1 (5.61 y 15.43 µg de proteína org⁻¹), pero superior al obtenido para la subfracción A de la cepa AM101 (1.68 µg de proteína org⁻¹).
- Los signos externos e histológicos no específicos de enfermedad similares fueron observados en los camarones juveniles de *L. vannamei* que fueron infectados o inyectados con la bacteria viva o la FP40 de *V. penaeicida*, cepa AM101.
- La mortalidad observada en *L. vannamei* al aplicarles la FP40, subfracciones A y A1 provenientes del SLC de *V. penaeicida*, cepa AM101, aunados a sus perfiles electroforéticos (SDS-PAGE), sugieren que el factor tóxico producido por este *Vibrio* está contenido en éstas muestras y que éste fué identificado como una gran banda proteica de aproximadamente de 38.5 kDa con actividad proteolítica (enzimogramas).

- La obtención del factor tóxico por medio de precipitación con el sulfato de amonio, aunado a la pérdida de su toxicidad y actividad proteolítica, después del uso de la proteinasa K, tratamientos térmicos, CuCl_2 , y E-64, sugieren fuertemente que la exotoxina producida por *V. penaeicida*, cepa AM101, es una proteasa termolábil de tipo cistein proteasa.
-

RECOMENDACIONES

1. Producción de la exotoxina.

- Establecer qué factores pueden potenciar la producción de la exotoxina en *V. penaeicida*.
- Optimizar el proceso de extracción y purificación de la exotoxina de *V. penaeicida*, por medio de cromatografía de afinidad.
- Establecer la secuencia de aminoácidos de la exotoxina (secuenciación).
- Definir el o los genes que codifican para esta exotoxina.

2. Patogenicidad de *V. penaeicida*.

- Uso de marcadores como la proteína verde fluorescente para determinar la o las rutas de entrada de la bacteria al camarón.
- Establecer el efecto de la temperatura sobre la patogenicidad de *V. penaeicida*, sobre camarón.
- Establecer los órganos blancos de la bacteria y la exotoxina (criohistología, inmunohistoquímica).
- Establecer la posibilidad de la presencia de bacteriófagos en *V. penaeicida*, cepa AM101.

3. Variaciones interespecíficas.

- Realizar estudios sobre la variabilidad genéticas y procesos de domesticación, tanto a nivel de *V. penaeicida*, cepa KH-1 y AM101, como de *L. vannamei* y *L. stylirostris*.

REFERENCIAS

- Alapide-Tendencia E.V., Dureza L.A. 1997. Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. *Aquaculture* **154**:105-112.
- Alday-Saez A., Roque A., Turnbull. 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* **48**:91-99.
- Austin B., Stuckey L.F., Robertson P., Effendi I., Griffith D. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. *J. Fish. Dis.* **18**:93-96.
- Berzie J.A.H. 1998. Penaeid genetics and biotechnology. *Aquaculture* **164**:23-47.
- Berzie J.A.H. 2000. Population genetic structure in penaeid prawn. *Aquacult. Res.* **31**:95-119.
- Brumell J.H. Finlay, B.B. 2000. Bacteril adherences, colonization, and invasion of mucosal surfaces. In: Brogden K.A., Roth J.A. Stanton T.S. Bolin C.A. Minion F.C. y Wanne-muehler M.J. (Eds) Virulence mechanisms of bacterial pathogens. ASM press, Washington, D.C. p 3-17.
- Cassadevall A., Pirofski L.A. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infec. Immune.* **67**:3703-3713.
- CCAAN (Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte). 1998. Aquanova. A14/SEM/98-006/07/SUB.
- Chen F.R., Liu P.C., Lee K.K. 1999. Purification and partial characterization of a toxic serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus*. *Microbios* **98**:95-111.
- Costa R., Mermoud I., Koblavi S., Morlet B., Haffner P., Berthe F., Legroumellec M., Grimont P. 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* **164**:297-309.
- de la Peña L.D., Tamaki T., Momoyama K., Nakai T., Muroga, K. 1993. Characteristics of causative bacterium of vibriosis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* **115**:1-12.
- de la Peña L.D., Nakai T., Muroga K. 1995. Dynamics of *Vibrio* sp. PJ in organs of orally infected kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.* **30**:39-45.
- Durand S.V., Tang K.F.J., Lightner D.V. 2000. Frozen commodity shrimp: potential ave-
-

- nue for introduction of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV). *J. Aquat. Anim. Health* **12**:128-135.
- Finlay B.B., Falkow S. 1997 Common terms in microbial pathogenicity revised. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:136-169.
- Goarant C., Régnier F., Brizard R., Marteau A.L. 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture* **169**:291-296.
- Goarant C., Herlin J., Brizard R., Marteau A.L., Martin C., Martin B. 2000. Toxic factors of *Vibrio* stains pathogenic to shrimp. *Dis. Aquat. Org.* **40**:101-107.
- Gomez-Gil B., Tron-Mayén L., Roque A., Turnbull J.F., Inglis V., Guerra-Flores A.L. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **163**:1-9.
- Hameed A.S.S. 1993. A study of the aerobic heterotrophic bacteria flora of hatchery-reared eggs, larvae and postlarvae of *Penaeus indicus*. *Aquaculture* **117**:195-204.
- Hameed A.S.S. 1995. Susceptibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbellii*-like Bacterium. *J. World Aquaculture Soc.* **26**:315-318.
- Harris L.J., Owens L. 1999. Productions of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. *Dis. Aquat. Org.* **38**:11-22.
- Harris L. 2002. The role of virulence in the pathogenicity of *Vibrio harveyi*. VI congreso ecuatoriano de acuicultura y V congreso latinoamericano de acuicultura, 24 al 27 de Octubre, 2001. Guayaquil, Ecuador.
- Hörmansdorfer S., Wentges H., Neugebauer-Büchler K., Bauer J. 2000. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria. *Inter. J. Hyg. Environ. Health* **203**:169-175.
- Ishimaru K.M., Akagawa M., Muroga K. 1995. *Vibrio penaeicida* sp nov. A pathogen of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Int. J. Sys. Bacteriol.* **1**:134-138.
- Jiravanichpaisal P., Miyazaki T., Limsuwan C. 1994. Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Aquat. Anim. Health* **61**:27-35.
- Karunasagar I., Pai R., Malathi G.R., Karunasagar I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* **128**:203-

128:203-209.

- Kellogg C.A., Rose J.B., Jiang S.C., Thurmond J.M., Paul J.H. 1995. Genetic diversity of related vibriophages isolated from marine environments around Florida and Hawaii, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **120**:89-98.
- Lavilla-Pitogo C.R., Leaña E.M., Paner M.G. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture* **164**:337-349.
- Le Groumellec M., Goarant C., Haffner P., Mermoud I., Costa R. 1996. Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia: IV Investigation of the bacterial hypothesis by experimental infections, with reference to stress-induced mortality. Annual Meeting of the World Aquaculture Society. January 29-February 2, 1996. Bangkok, Thailand, p 144.
- Lee K.K., Yu S.R., Chen F.R., Yang T.I., Liu P.C. 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Curr. Microbiol.* **32**:229-231.
- Lee K.K., Yu S.R., Liu P.C. 1997. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.* **34**:110-117.
- Lee K.K., Chen Y.L., Liu P.C. 1999a. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products and a toxic cysteine protease. *Blood Cel. Mol. Dis.* **25**:180-192.
- Lee K.K., Liu P.C., Chen Y.L. 1999b. Electrophoretic characterization of a novel cysteine protease produced by *Vibrio harveyi*. *Electrophoresis* **20**:3343-3346.
- Lightner D.V. 1996. Disease of culture penaeid shrimp. In: McVey, J.P. (Ed), Handbook of mariculture. Crustacean Aquaculture. 2a Edic. CRC. Press. Boca Raton. Fl. pp 1-78.
- Liu P.C., Lee K.K., Chen S.N. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Let. Appl. Microbiol.* **22**:413-416.
- Liu P.C., Lee K.K., Tu C.C., Chen S.N. 1997. Purification and characterization of cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. *Curr. Microbiol.* **35**:32-39.
- Liu P.C., Lee K.K. 1999. Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Let. Appl. Microbiol.* **28**:426-430.
- Lotz J.M. 1997. Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Dis. Aquat. Org.* **30**:45-51.

- Matsumura K. 1995. Reexamination of tetrodotoxin production by bacteria. *Appl. Envir. Microbiol.* **61**:3468-3470.
- Montero A.B., Austin B. 1999. Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). *J. Fish Dis.* **22**:377-386.
- Muroga K., Suzuki K., Ishimaru K., Nogami K. 1994. Vibriosis of swimming crab *Portunus trituberculatus* in larviculture. *J. World Aquaculture Soc.* **25**:50-53.
- Oakey H.J., Owens L. 2000. A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *J. Appl. Microbiol.* **89**:702-709.
- Pelczar M.J., Reid R.D., Chan E.C.S. 1982. Microbiología. McGraw-Hill. Mexico. pp 1-120.
- Prayitno S.B., Latchford J.W. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture* **132**:105-112.
- Rengpipat S., Phianphak W., Piyatirativorakul S., Menasveta P. 1998. Effects of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* **167**:301-313.
- Robertson P.A.W., Calderon J., Carrera L., Stark J.R., Zherdmant M., Austin B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Dis. Aquat. Org.* **32**:151-155.
- Salyers A.A., White D.D. 1994. Bacterial pathogenesis, a molecular approach. ASM Press. Washington, D.C. pp 47-62.
- Saulnier D., Haffner P., Goarant C., Levy P., Ansquer D. 2000a. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* **191**:133-144.
- Saulnier D., Avarre J.C., Le Moullac G., Ansquer D., Levy P., Vonau V. 2000b. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia. *Dis. Aquat. Org.* **40**:109-115.
- Schmitt C.K., Meysick K.C., O'Brien A.D. 1999. Bacterial toxins: friends or foes. *Emer. Infec. Dis.* **5**:1-13.
- Scholz U., Garcia Diaz G., Ricque D., Cruz Suarez L.E., Vargas-Albores F., Latchford J. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture* **176**:271-283.

- Simidu U., Noguchi T., Hwang D.F., Shida Y., Hashimoto K. 1987. Marine bacteria which produce tetrodotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1714-1715.
- Smith P.T. 2000. Diseases of the eye of farmed shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* **43**:159-173.
- Stensvag K., Jorgensen T.O., Hoffman J., Hjelmeland K., Bogwald J. 1993. Partial purification and characterization of extracellular metalloproteases with caseinolytic, aminopeptidolytic, and collagenolytic activities from *Vibrio anguillarum*. *J. Fish Dis.* **16**:525-539.
- Sudheesh P.S., Xu H.S. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture* **196**:37-46.
- Svitil A.L., Chadhain S.M.N., Moore J.A., Kirchman D.L. 1997. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:408-413.
- Takahashi Y., Itami T., Maeda M., Kondo M. 1998. Bacterial and viral diseases of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) in Japan. *Fish Pathol.* **33**:357-364.
- Vandenberghe J., Li Y., Verdonck L., Li J., Sorgeloos P. 1998. Vibriosis associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture.* **169**:121-132.
- Vandenberghe J., Verdonck L., Robles-Arozarena R., Rivera G., Bolland A., Balladares M., Gomez-Gil B., Calderon J., Sorgeloos P., Swings J., 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2592-2597.
- Wang X.H., Leung K.Y. 2000. Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. *Microbiol.* **146**:989-998.
- Yasuda K., Kitao T. 1983. Bacterial flora in the digestive tract on prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture* **19**:229-234.
- Yasumoto T., Murata M. 1993. Marine toxins. *Chem. Rev.* **93**:1897-1909.
- Young V.B., Schauer D.B. 2000. Cytolethal distending toxin: a bacterial toxin which disrupts the eukaryotic cell cycle. *Chem. Res. Toxicol.* **13**:936-939.
-