



INSTITUTO SUPERIOR TECNOLÓGICO
LUIS ARBOLEDA MARTÍNEZ
MANTA – MANABÍ – ECUADOR

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR,
CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

1



INSTITUTO SUPERIOR TECNOLÓGICO

LUIS ARBOLEDA MARTÍNEZ

Trabajo de Titulación

Previo a la obtención del título de

Tecnólogo Acuicultor

TEMA:

**Estandarización de la prueba de desafío de post-larvas de camarón *Penaeus*
(*Litopenaeus*) *vannamei* con bacterias patógenas *Vibrio parahaemolyticus***

Autor:

Juan Carlos Muñoz Reyes

Tutor:

PhD. Bonny N. Bayot Arroyo.

Cotutor:

MSc. Jorge Figueroa

Abril 2022



INSTITUTO SUPERIOR TECNOLÓGICO
LUIS ARBOLEDA MARTÍNEZ
MANTA – MANABÍ – ECUADOR

EDUCACIÓN SUPERIOR
CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

2

**CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE REVISIÓN Y EVALUACIÓN DEL
TRABAJO DE TITULACIÓN**

Tesis de grado sometida a consideración del tribunal de revisión y sustentación, como requisito previo a la obtención del título de Tecnólogo en Acuicultura.

TEMA: “Estandarización de la Prueba de Desafío de Post-larvas de Camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* con Bacterias Patógenas *Vibrio parahaemolyticus*”.

Realizada por: Juan Carlos Muñoz Reyes.



Firmado digitalmente por:
**CESAR ALEJANDRO
ESTAY MOYANO**

MSc.: César Estay M.

CI.: 0954489654

LIMBER JOSE Firmado digitalmente
por LIMBER JOSE
ALCIVAR ALCIVAR MENDOZA
MENDOZA Fecha: 2022.03.30
08:57:42 -05'00'

Blgo.: Limber Alcívar M.

CI.: 1313362202

GEORMERY Firmado digitalmente
por GEORMERY BELEN
BELEN MERA MERA LOOR -
LOOR - 1314730787
1314730787 Fecha: 2022.03.30
08:11:37 -06'00'

Blgo.: Geormery Mera L.

CI.: 1314730787



CERTIFICADO DEL TUTOR

PhD. Bonny Narcisa Bayot Arroyo.
Tutor de Tesis

Certifica: Que el trabajo de investigación titulado: “Estandarización de la prueba de desafío de Post-larvas de camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* con bacterias patógenas *Vibrio parahaemolyticus*” realizada por el señor Juan Carlos Muñoz Reyes, con CI # 0918885005, egresado de la especialidad de Tecnología en Acuicultura, ha sido revisada, corregida y aprobada bajo mi dirección, cumpliendo con las disposiciones reglamentarias del Instituto Superior Tecnológico Luis Arboleda Martínez.

Santa Elena, 15/12/2021

PhD. Bonny N. Bayot Arroyo.
CI #090898464-4



INSTITUTO SUPERIOR TECNOLÓGICO

LUIS ARBOLEDA MARTÍNEZ

MANTA – MANABÍ – ECUADOR

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR,
CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

4

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Juan Carlos Muñoz Reyes con CI # 0918885005, egresados de la carrera de Acuicultura, acepto que los derechos de autoría y las publicaciones le corresponde a nuestra persona y la titularidad al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL), de acuerdo con, lo que dispone la Ley de Propiedad Intelectual.

Manta, 30/11/2021

Atentamente.

Sr. Juan Carlos Muñoz Reyes

C.I.: 091888500-5



INSTITUTO SUPERIOR TECNOLÓGICO
LUIS ARBOLEDA MARTÍNEZ
MANTA – MANABÍ – ECUADOR

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR,
CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

5

AUTORÍA

Juan Carlos Muñoz Reyes, con CI # 0918885005, soy el responsable de las ideas, doctrinas (enseñanzas) y resultados expuestos en esta Tesis de grado y el patrimonio intelectual de la misma pertenecen al “Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas” (CENAIM-ESPOL). Y al Instituto Superior Tecnológico Luis Arboleda Martínez.

Sr. Juan Carlos Muñoz Reyes

C.I.: 0918885005



DEDICATORIA

Este proyecto de tesis se la dedico a Dios porque él es el único que me permite vivir y conseguir mis triunfos, me da fuerzas para seguir adelante y no detenerme en los obstáculos.

A mis padres María Reyes F. y Jorge Muñoz S. Y hermanos y sobrinos que me apoyaron, guiaron para alcanzar mis anhelos, ofreciéndome el amor y la calidez de familia, todo se lo debo a ellos.

A mi tutora PhD. Bonny Bayot que es parte del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL). Pilar fundamental de enseñanza y motivación para finalizar este estudio.

De igual manera a mi cotutor MSc. Jorge Figueroa y a todos mis docentes que me brindaron su apoyo, conocimientos y experiencia de tal forma que, vi la vida desde otra faceta.

De manera muy especial a mi amiga y compañera de trabajo la Blga. Karina Reyes que, con sus virtudes infinitas, su gran corazón me llevan admirarla cada día más. Gracias por brindarme su amistad y ese enorme apoyo.

Al director del CENAIM-ESPOL, el PhD Stanislaus Sonnenholzner S. y también al jefe de operaciones Ing. Andrés Pedrazzoli Reyes, gracias por el gran apoyo al brindarnos las facilidades para culminar esta etapa de estudio.

A mis compañeros de trabajo y estudios que me apoyaron en todo momento, que me supieron brindar toda su ayuda y conocimientos.

A mis primos Blgo. Alfonso, Joe Muñoz y la Blga. María de los Ángeles Villacís gracias por ese espíritu colaborador, fueron de mucha ayuda, gracias a todos.



Agradezco a Dios por cada uno de los obstáculos, en el cual me dio fuerza para superarlo, por permitirme tener buena experiencia dentro Instituto Superior Tecnológico Luis Arboleda Martínez, gracias por permitirme convertirme en ser un profesional en lo que me apasiona.

A mis padres y hermanos que a pesar de todo confiaron en mis conocimientos, que han estado conmigo y también agradezco a mi familia entera que me dio fuerza y motivación para seguir adelante y superar este largo camino. A todos ellos mis más profundos agradecimientos.

Agradezco a mis profesores y a mis compañeros que supusieron guiarme y brindarme conocimientos en cada de una de las materias impartidas gracias a cada maestro que hizo parte del proceso de formación.

Debo reconocer el aporte de conocimientos a la MSc. Guadalupe Bravo Montesdeoca, coordinador de la carrera de Acuicultura, sin los cuales el aprendizaje sobre mi estadía en el Instituto Superior Tecnológico Luis Arboleda Martínez no hubiese sido muy provechoso.

A mi tutora PhD. Bonny Bayot, gracias por brindarme su valioso tiempo y conocimientos, sin duda alguna fue un pilar fundamental para la culminación de este estudio realizada en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL).



Resumen

La necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) es una enfermedad bacteriana emergente del cultivo de camarón. La eficacia de los productos antibacterianos es probada en condiciones de infección a través de experimentos de desafío estandarizados que generen distintos rangos de supervivencia. En el presente trabajo se estudió la relación entre la supervivencia de post-larvas de camarón infectadas con *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND y la concentración bacteriana, tiempo de exposición al patógeno y protocolo de recambio de agua, con el objetivo de encontrar combinación de estas variables que produzca el 50% de supervivencia. Se realizaron cinco experimentos combinando distintas concentraciones, recambios de agua y tiempo de exposición mediante infecciones experimentales de post-larvas *Penaeus vannamei* (PL7-PL9) infectadas con una cepa *V. parahaemolyticus* positiva a AHPND. La supervivencia de las post-larvas de camarón fue afectada en forma significativa y directa por la concentración bacteriana. Se observó la presencia de interacciones entre la concentración bacteriana y el protocolo de recambio, así como entre la concentración bacteriana y el protocolo de inmersión sobre la supervivencia. Las combinaciones de las variables explicativas que produjeron una supervivencia alrededor del 50% fueron: a) inoculación directa a los tanques de cultivo de 10^3 UFC/mL con recambio a las 24 h post-infección o sin recambio durante las 48 horas y b) una sola inoculación directa a los tanques de cultivo de 10^4 UFC/mL con recambiando ya sea a las 4, 8 o 12 h post-infección, durante las 48 horas de experimentación.

Palabras clave: AHPND, *Penaeus vannamei*, post-larvas de camarón, pruebas de desafío, *Vibrio parahaemolyticus*.



Abstract

Acute hepatopancreatic necrosis (AHPND) is an emerging bacterial disease of cultured shrimp. The efficacy of antibacterial products is proven under infection conditions through standardized challenge tests that generate different survival rates. In the present work, the relationship between survival of *P. vannamei* post-larvae infected with *V. parahaemolyticus* causing AHPND, and bacterial concentration, time of exposure to the pathogen and water exchange protocol was studied. The aim was to find combinations of these variables that produce 50% of post-larvae survival. Five experiments were performed combining different bacterial concentrations, water exchanges and exposure time, through experimental infections of post-larvae *P. vannamei* (PL7-PL9) infected with an AHPND-causing *V. parahaemolyticus* strain. Shrimp post-larvae survival was significantly and directly affected by bacterial concentration. The presence of interactions between bacterial concentration and exchange protocol was observed, as well as between bacterial concentration and bacterial immersion protocol on survival. The combinations of the explanatory variables that produced a survival around 50% were: a) direct inoculation to the culture tanks of 10^3 UFC/mL with water exchange at 24 h post-infection or without water exchange during 48 hours, and b) a single direct inoculation to the culture tanks of 10^4 UFC/mL with the first water exchange performed at 4, 8 or 12 h post-infection, during the 48 hours of experimentation.

Keywords: AHPND, *Penaeus vannamei*, shrimp post-larvae, challenge tests, *Vibrio parahaemolyticus*.



Índice

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE REVISIÓN Y EVALUACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	2
CERTIFICADO DEL TUTOR.....	3
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS.....	4
AUTORÍA	5
DEDICATORIA	6
RECONOCIMIENTO	7
Resumen	8
Abstract	9
Índice.....	10
Contenido de tablas.....	13
Contenido de figuras	15
Introducción	17
Antecedentes	20
Planteamiento del Problema	22
Justificación.....	23
Alcance	24
Objetivos.....	25
Objetivo General.....	25
Objetivos Específicos	25
Hipótesis	25
Variables.....	25



Variable Independiente:	25
Variable Dependiente:	25
Marco Teórico	26
Camarón <i>Penaeus (Litopenaeus) vannamei</i>	26
Bacterias Patógenas del Género <i>Vibrio</i>	27
Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND)	27
Diagnóstico de AHPND.....	28
Materiales y Métodos	31
Obtención de Post-larvas.....	31
Cultivo Bacteriano	32
Condiciones Experimentales	33
Experimentos 1 y 2. Pruebas de Desafío Para Determinar el Número de Exposiciones Con Cultivo Bacteriano.....	34
Experimento 3. Prueba de Desafío Para Determinar el Efecto de la Concentración Bacteriana y Tipo de Recambio	37
Experimento 4. Prueba de Desafío Para Determinar el Efecto de la Concentración Bacteriana y Tiempo Para el Primer Recambio.....	38
Experimento 5. Pruebas de Desafío Para Determinar el Efecto de la Concentración Bacteriana y Tiempo de Inmersión Corta	39
Modelaje de la Supervivencia Acumulada y Tiempo Medio en Morir.....	40
Análisis de datos	41
Análisis de Muestras.....	42
<i>Análisis Microbiológico</i>	42
<i>Detección de Genes Codificantes Para las Toxinas PirA y PirB</i>	43



<i>Análisis Histopatológico</i>	44
Resultados.....	46
Experimentos 1 y 2. Pruebas de Desafío Para Determinar el Número de Exposiciones con Cultivo Bacteriano	46
Experimento 3. Prueba de Desafío Para Determinar el Efecto de la Concentración Bacteriana y Tipo de Recambio	50
Experimento 4. Prueba de Desafío Para Determinar el Efecto de la Concentración Bacteriana y Tiempo Para el Primer Recambio.....	51
Experimento 5. Pruebas de Desafío Para Determinar Efecto de la Concentración Bacteriana y Tiempo de Inmersión Corta	52
Modelaje de la Supervivencia Acumulada y Tiempo Medio en Morir.....	53
Análisis Microbiológico.....	56
Análisis de PCR.....	57
Análisis de Histopatología.....	58
Discusión	63
Conclusiones	69
Recomendaciones	72
Financiamiento	73
Bibliografía	74
Anexos.....	84



Contenido de tablas

Tabla 1. Principales hallazgos histopatológicos en camarones afectados con AHPND (Morales-Covarrubias y Gómez-Gil, 2014).	30
Tabla 2. Descripción de los tratamientos evaluados en el Experimento 1.	36
Tabla 3. Descripción de los tratamientos evaluados en el Experimento 2.	36
Tabla 4. Descripción de los tratamientos evaluados en el Experimento 3.	38
Tabla 5. Descripción de los tratamientos evaluados en el Experimento 4.	39
Tabla 6. Descripción de los tratamientos evaluados en el Experimento 5.	40
Tabla 7. Descripción de los tratamientos evaluados en los cinco Experimentos (Protocolos de infección bacteriana y de recambio de agua).	48-49
Tabla 8. Resultado del modelo de regresión múltiple que presento el mejor ajuste para predecir la supervivencia acumulada de post-larvas de camarón <i>P. vannamei</i> a las 48 h post-infección.	54
Tabla 9. Resultado del modelo de regresión múltiple que presentó el mejor ajuste para predecir tiempo medio de supervivencia de post-larvas de camarón <i>P. vannamei</i> a las 48 h post-infección.	55
Tabla 10. Supervivencia acumulada a las 48 h que predicen un rango de supervivencia cercano al 50%.	56
Tabla 11. Resultados de análisis microbiológico (siembra en dos agares: TCBS y agar Marino) de post-larvas de camarón <i>Penaeus (Litopenaeus) vannamei</i> realizado a las post-larvas antes de la infección bacteriana para los cinco Experimento del estudio.	56
Tabla 12. Resultados del Experimento 1. Post-larvas del lote inicial.	84



Tabla 13. Resultado del Experimento 1. Post-larvas moribundas del Tratamiento 1 (inmersión corta 2 min 10^8 UFC/mL y una sola inoculación directa a los tanques de cultivo 10^6 UFC/mL).	84
Tabla 14. Resultado del Experimento 1. Post-larvas moribundas del Tratamiento 2 (una sola inoculación directa a los tanques de cultivo 10^6 UFC/mL).	85
Tabla 15. Resultados del Experimento 3. Post-larvas del control negativo (sin exposición bacteriana).	85
Tabla 16. Resultado del Experimento 3. Post-larvas moribundas del Tratamiento 2 sin recambio de agua y tratamiento 7 con recambio de agua (una sola inoculación directa a los tanques de cultivo 10^3 UFC/mL).	86
Tabla 17. Resultado del Experimento 3. Post-larvas moribundas del Tratamiento 5 sin recambio de agua y tratamiento 10 con recambio de agua (una sola inoculación directa a los tanques de cultivo 10^6 UFC/mL).	86
Tabla 18. Resultados del Experimento 4. Post-larvas del control negativo (sin exposición bacteriana).	87
Tabla 19. Resultado del Experimento 4. Post-larvas moribundas del Tratamiento 1 con recambio de agua 4 h post-infección (una sola inoculación directa a los tanques de cultivo 10^4 UFC/mL).	87
Tabla 20. Resultado del Experimento 4. Post-larvas moribundas del Tratamiento 7 con recambio de agua 4 h post-infección (una sola inoculación directa a los tanques de cultivo 10^6 UFC/mL).	88



Contenido de figuras

Figura 1. Camarón <i>Penaeus (Litopenaeus) vannamei</i> colectado del mar (izquierda) y de piscina camaronesa (derecha).	26
Figura 2. Fotografía de dos juveniles de <i>P. vannamei</i> (Vietnam), ambos con hepatopáncreas atrofiados, signos clínicos indicativos de AHPND. Fuente: (Cuéllar-Anjel. J, 2013b).	29
Figura 3. Camarón <i>P. vannamei</i> mostrando hallazgos histopatológicos del hepatopáncreas en fase terminal de AHPND: destrucción de la mayoría de los túbulos e infección bacteriana masiva e infiltraciones hemocíticas. Fuente (Valera-Mejía et al., 2017).....	30
Figura 4. Cepa de <i>V. parahaemolyticus</i> (Ba94C2) cultivada en agar TCBS, donde se observan las colonias bacterianas con una tonalidad verde.	33
Figura 5. Proceso de aclimatación (temperatura y salinidad) de post-larvas <i>P. vannamei</i> (PL7-PL9).	34
Figura 6. Proceso de infecciones bacterianas con inmersión corta y una sola inoculación directa a los tanques de cultivo.	35
Figura 7. Proceso de siembra de muestras para los análisis microbiológicos en agar TCBS y agar Marino dentro de la cámara de seguridad biológica.	43
Figura 8. Proceso de extracción de ADN con fenol dentro de la Sorbona, unos de los pasos para el análisis de PCR.	44
Figura 9. Proceso de purificación de las muestras de post-larvas de camarón <i>P. vannamei</i> para realizar el análisis histopatológico.	45
Figura 10. Supervivencia registrada durante el Experimento 1.	46
Figura 11. Supervivencia registrada durante el Experimento 2.	47



Figura 12. Supervivencia registrada durante el Experimento 3.	51
Figura 13. Supervivencia registrada durante el Experimento 4.	52
Figura 14. Supervivencia registrada durante el Experimento 5.	53
Figura 15. Cajas Petri (agar TCBS) mostrando crecimiento de <i>Vibrios</i> detectados en lote inicial de post-larvas antes de la infección bacteriana con <i>V. Parahaemolyticus</i>	57
Figura 16. Verificación de la amplificación de genes codificantes para toxinas PirA y PirB, en gel de agarosa, utilizando los iniciadores AP4-F1 y AP4-R1 específicos para la detección de AHPND (Sritunyalucksana et al., 2015). Los carriles 1 a 8 corresponden a las muestras de los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 y T8 del Experimento 5, Se muestran los controles, positivos (C+) y negativo (C-). EPM = Estándar de peso molecular (Gene Ruler 100 pb DNA Ladder). Para el control positivo se observa un producto amplificado de 230 pb.	58
Figura 17. Sección longitudinal de tejidos de post-larvas de camarón <i>P. vannamei</i> infectadas con AHPND procesado con hematoxilina y eosina.	60
Figura 18. Sección longitudinal de tejidos de post-larvas de camarón <i>P. vannamei</i> del control negativo (sin exposición bacteriana) procesados con hematoxilina y eosina.	61



Introducción

La producción de camarón es una de las principales actividades económicas del Ecuador. La acuicultura representa el 3% del producto interno bruto (PIB) del país. En el año 2020, la acuicultura aporta con 261.000 plazas de empleo directo e indirecto. El cultivo de camarón ha experimentado en general una evolución positiva ganando el reconocimiento como uno de los mejores camarones a nivel mundial (CNA, 2020). De tal forma que en año 2019, el camarón ecuatoriano es exportado a diferentes continentes como Asia (66%), Europa (19%), Estados Unidos (12%) y América (2%) (CNA, 2020).

Sin embargo, la industria camaronera mundial se ve permanentemente afectada por la aparición de enfermedades de tipo bacteriano, destacándose entre ellas la vibriosis causante de grandes mortalidades en los cultivos de crustáceos y peces (Chen et al., 2000). Esta enfermedad es causada por varias especies de *Vibrio*, entre las que se incluyen: *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio penaeicida* (Ishimaru et al., 1995). Este género *Vibrio* ha sido causante de grandes pérdidas económicas para la industria de producción de crustáceos (Decamp et al., 2008; Burge et al., 2007). En los sistemas acuícolas, los problemas generalmente se suscitan en los primeros estadios larvales y post-larvales de los camarones, causados por microorganismos patógenos, que generalmente se encuentran en los cultivos (Aguirre-Guzmán et al., 2005).

Particularmente, en Ecuador, entre 1989 y 1990, el síndrome de la Gaviota, asociado a cepas de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, y *V. alginolyticus* provocó hasta 90% de mortalidad en granjas camaroneras y una caída importante en la producción nacional. Sin embargo, los principales problemas bacterianos han afectado a las larviculturas de larvas y post-larvas, destacando el síndrome de Bolitas, causado por *V.*



harveyi (Robertson et al., 1998), y el síndrome de Zoea 2, causado por *V. harveyi* y *V. alginolyticus* (Vanderberghe et al., 1999). Recientemente, se encontró que nuevas cepas patógenas han aparecido en las larviculturas ecuatorianas (*Vibrio campbellii*, *Vibrio owensii*, *Vibrio inhibens* y *Vibrio natriegens*), evidenciando la necesidad de encontrar tratamientos efectivos para combatir estas cepas patógenas (Sotomayor et al., 2019).

En los últimos años se ha observado la aparición de una cepa altamente virulenta de *V. parahaemolyticus* que produce la enfermedad de AHPND y afecta a *P. vannamei* y *Penaeus monodon* (FAO, 2013; Tran et al., 2013). La cepa porta plásmidos de ~69 kbp que contienen genes codificantes para las toxinas mortales (*Pir^{VP}*), similares a las toxinas binarias PirA y PirB de los insectos relacionados al género *Protorhabdus* (Phiwsaiya et al., 2017; Han et al., 2015). La enfermedad causa daño histopatológico en las primeras etapas del desarrollo del camarón y la principal característica patognomónica de la enfermedad es el desprendimiento masivo de las células epiteliales de los túbulos hepatopancreáticos. Este síndrome fue reportado por primera vez en el 2009 en camarones juveniles de cultivo en China, en las especies *P. monodon* y *P. vannamei*. En los años siguientes se propagó a varios países, afectando a Vietnam (2010), Malasia (2011), Tailandia (2012), México (2013), Filipinas (2015), Suramérica (2016) y Estados Unidos (2017) (Dhar et al., 2019; Restrepo et al., 2016; Thitamadee et al., 2016; Soto-Rodriguez et al., 2015; de la Peña et al., 2015; Nunan et al., 2014; FAO, 2013).

El protocolo de desafío de Tran et al. (2013) es la principal metodología usada para infectar a juveniles de camarón con bacterias causantes de AHPND, y muchas investigaciones sobre la enfermedad utilizan este protocolo (Restrepo et al., 2018). El protocolo utiliza dos inmersiones, con una concentración bacteriana específica y produce



100% de mortalidad hasta los cuatro días post-infección. Sin embargo, las pruebas de productos antimicrobianos requieren el empleo de tasas de mortalidades más bajas, para poder observar potenciales efectos de estos productos.

El presente estudio, tiene la finalidad de realizar una estandarización de las pruebas de desafío de post-larvas de camarón *P. vannamei* infectadas con *V. parahaemolyticus* causante de AHPND, que permita determinar una relación dosis-respuesta para la mortalidad de las post-larvas. Específicamente, se hipotetiza que la mortalidad de las post-larvas de camarón infectadas con *V. parahaemolyticus* causante de AHPND es una función de la concentración bacteriana, tiempo de exposición al patógeno y protocolo de recambio de agua. Para evaluar esta hipótesis se determinará la relación dosis-respuesta para la mortalidad de post-larvas de camarón *P. vannamei* desafiadas con varias concentraciones bacterianas de *V. parahaemolyticus*, tiempo de exposición al patógeno y protocolos de recambio.



Antecedentes

Ecuador tiene como primer producto de exportación no petrolero al camarón blanco *Penaeus vannamei* de cultivo, y es el segundo exportador a nivel mundial, detrás de la India (Alvarado, 2020). En el 2020 se exportó 688 millones de libras de camarón, generando ganancias de \$ 3.823,53 millones. Siendo el continente Asiático el principal mercado para el camarón ecuatoriano, con un 58,3% del total de exportaciones de enero a agosto del 2020 (CNA, 2021).

Sin embargo, diversas enfermedades bacterianas afectan a la producción de camarón en Ecuador (Sotomayor et al., 2019), lo cual limita la producción. Por consiguiente, es importante prestar atención a las enfermedades bacterianas emergentes que afectan al cultivo de camarón, tal como es el caso de la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND). Esta enfermedad emergente está afectando los ingresos económicos de los principales países productores de camarón a nivel mundial (Thitamadee et al., 2016; Tran et al., 2013). AHPND es provocado por varias especies del género *Vibrio*, especialmente por cepas de la especie *Vibrio parahaemolyticus* (Tran et al., 2013).

Por lo general, los brotes de mortalidad provocados por esta enfermedad suelen ocurrir dentro de los 35 días posteriores a la siembra en el estanque de cultivo (Thitamadee et al., 2016), pero también ocurre en estadios tempranos de larvas y post-larvas de camarón, llegando a reportar mortalidades de hasta el 100%. Por tal motivo, es importante contar con agentes antibacterianos que puedan controlar esta enfermedad (Sotomayor et al 2019; Rendón, L., & Balcázar, J. L., 2016). Una de las principales herramientas utilizadas para probar la eficacia de agentes antimicrobianos son las pruebas de desafío (challenge tests),



que consisten en experimentos *in vivo*, donde se desafía a animales susceptibles con un agente infeccioso para observar la tasa de mortalidad (Tran et al., 2013).



Planteamiento del Problema

Uno de los principales problemas que afectan al desarrollo de la acuicultura es la existencia de enfermedades de procedencia bacteriana que habitualmente se encuentran en los cultivos de los camarones y que causan millones de pérdidas económicas (Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2015).

AHPND es una de las enfermedades más emergentes del cultivo de camarón, dado que, causa importantes pérdidas económicas de millones de dólares, alcanzando mortalidades del 100% (Thitamadee et al., 2016). Este patógeno es producido por varias cepas patógenas de *Vibrios* [*V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* (Kondo et al., 2015), *V. campbellii* (Dong et al., 2017; Han et al., 2017), *V. owensii* (Liu et al., 2015) y *Vibrio punensis* (Restrepo et al., 2018)].

Actualmente, circulan en el mercado nacional e internacional innumerables productos para contrarrestar los embates de las enfermedades bacterianas que causan estragos en la producción del camarón. La prueba de desafío propuesta en la literatura genera 100% de mortalidades en juveniles de camarón (Tran et al., 2013). Por lo que, es necesario estandarizar pruebas de desafíos para post-larvas de camarón que brinde la posibilidad de dar a los productos antibacterianos eficaces la posibilidad de generar una respuesta favorable y observar diferencias reales, en comparación con productos no eficaces o controles negativos. En consecuencia, se debe desarrollar pruebas de desafío que generen mortalidades variables, lo cual se podría obtener con la variación de: distintos niveles de concentraciones bacterianas, tipo y tiempo de inmersión, así como protocolos de recambio de agua en las unidades experimentales.



Justificación

Los eventos de mortalidades en cultivos de post-larvas de camarón causados por infecciones bacterianas han provocado el uso de una amplia gama de productos, tales como probióticos, aceites esenciales, ácidos orgánicos, entre otros. El uso de productos realmente eficaces contra infecciones bacterianas redundará en una mejor producción y una mayor rentabilidad a la cosecha. Para verificar la eficacia de estos productos se necesitan que sean aplicados a las post-larvas en condiciones de infección. Las pruebas de desafío son experimentos, donde se confronta en condiciones experimentales, y por tanto controladas, a organismos acuáticos con un patógeno determinado (Domínguez-Borbor et al., 2019; Tran et al., 2013). A través de estas pruebas de desafío es posible conocer el efecto de los productos antibacterianos sobre la supervivencia de post-larvas de camarón, y con ello evaluar la eficacia de los posibles métodos de control de infecciones (Sotomayor et al., 2019). El desafío por inmersión es el tipo de infección inducido que se utiliza para reproducir una enfermedad con etiología bacteriana.

A pesar que, a nivel mundial, se está continuamente desarrollando agentes antimicrobianos para combatir AHPND, no existe al momento publicaciones sobre pruebas estandarizadas de desafío con bacterias causantes de AHPND para post-larvas de camarón. Un protocolo estandarizado de desafío con bacterias causantes de AHPND, que permita conocer cuáles son las respuestas de mortalidad reproducibles a diferentes concentraciones bacterianas podrá ser usado para evaluar la efectividad de productos contra la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND para post-larvas de camarón *P. vannamei*.



Alcance

En el proyecto de investigación se estudió la supervivencia de post-larvas de camarón *P. vannamei*, en función de la exposición a varias concentraciones bacterianas de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND, tiempo de exposición del patógeno a las post-larvas y protocolos de recambios de agua a las unidades experimentales, mediante la ejecución de varias pruebas de desafío.

Para llegar a esta estandarización, se realizaron varios experimentos combinando distintas concentraciones, recambios de agua y tiempo de exposición mediante infecciones experimentales de post-larvas *P. vannamei* (PL7-PL9) infectadas con una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* positiva a AHPND.



Objetivos

Objetivo General

- Estandarizar un protocolo de desafío con bacterias patógenas *V. parahaemolyticus* para post-larvas de camarón *P. vannamei*

Objetivos Específicos

- Evaluar la relación dosis-respuesta para la mortalidad de post-larvas de camarón *P. vannamei* desafiadas con varias concentraciones bacterianas de *V. parahaemolyticus*.
- Desarrollar un protocolo de desafío con *V. parahaemolyticus* para post-larvas de camarón *P. vannamei* que genere diferentes rangos de mortalidades.

Hipótesis

La mortalidad de las post-larvas de camarón infectadas con *V. parahaemolyticus* depende de la concentración bacteriana, tiempo de exposición con el patógeno y/o protocolo de recambio de agua.

Variables

Variable Independiente:

Concentración bacteriana y tiempo de exposición a *V. parahaemolyticus* y, recambios de agua en unidades experimentales sembradas con post-larvas de camarón.

Variable Dependiente:

Mortalidad de las post-larvas de camarón.

Marco Teórico***Camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei****

El camarón blanco *P. vannamei* es la especie más cultivada en América Latina (Figura 1). La salinidad y la temperatura son dos de los factores más importantes en el cultivo (Arzola et al., 2013). Adultos de *P. vannamei* tienen una longitud de 23 cm, su coloración es blanca translúcida o amarillo pálido, y tienen una cabeza ligeramente más oscura. El período de madurez sexual tarda entre 6-7 meses. La hembra desova aproximadamente unos 250.000 huevos, que son liberados al mar y que aproximadamente en 16 horas eclosionan. La larva sufre una serie de cambios de estadios antes de llegar a la etapa post-larval. Aproximadamente, 5 días después de completada la etapa post-larval, migra hacia aguas estuarinas y modifica la dieta planctónica.

Figura 1.

Camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* colectado del mar (izquierda) y de piscina camaronera (derecha).



Bacterias Patógenas del Género *Vibrio*

El género *Vibrio* proviene de la familia *Vibrionaceae* y consta de 48 especies, de las cuales al menos 12 son patógenos humanos, entre estos *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

La vibriosis es una enfermedad de camarón causada por diferentes especies de *Vibrios*, y ocurren en cualquier etapa de la vida de estos animales, pero principalmente en la etapa larvaria. Las infecciones pueden ser causadas por la contaminación de huevos y nauplio por heces de los padres durante el desove y eclosión (Cuéllar-Anjel. J, 2013a).

Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND)

AHPND es una enfermedad de camarón de etiología bacteriana (Tran et al., 2013) causada por bacterias patógenas pertenecientes a los clados *Harveyi* (*V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. owensii* y *V. campbellii*) y *Orientalis* (*V. punensis*) del género *Vibrio*. Estas cepas contienen plásmidos que portan genes codificantes para las toxinas binarias PirA y PirB, que son las que provocan la mortalidad en los camarones (Han et al., 2015; Lee et al., 2015; Gómez-Gil et al., 2014; Gómez-Jiménez et al., 2014; Kondo et al., 2014; Yang et al., 2014). La bacteria coloniza el tracto digestivo de los camarones y las toxinas binarias liberadas por estas bacterias causan necrosis en el hepatopáncreas (Cuéllar- Anjel. J, 2013b). Estas toxinas también actúan en forma binaria en insectos como mosquitos y polillas para producir toxicidad (Ahantarig et al., 2009; Blackburn et al., 2006), y las afectaciones patológicas de estas toxinas son también similares a la de estos insectos, caracterizadas por inflamación severa en el epitelio del intestino medio (Blackburn et al., 2006). Inicialmente, la enfermedad se la conocía con el nombre de síndrome de mortalidad temprana (EMS) porque la mortalidad ocurría entre 10 y 35 días después de llenar los



estanques de cultivo de camarones con post-larvas de camarón (Hong et al ., 2016; de La Peña et al., 2015); Joshi et al., 2014; Tran et al., 2013). Sin embargo, los camarones juveniles también pueden verse afectados, pudiendo ocurrir brotes hasta 96 días después de la siembra en los estanques (de La Peña et al., 2015). Las mortalidades pueden ser de hasta el 100% (Hong et al., 2016; FAO, 2013; NACA, 2012). La transmisión es horizontal por vía oral y cohabitación.

Aunque AHPND puede ser causada por varias especies de *Vibrios*, *V. parahaemolyticus* es una de las especies más reportadas por la literatura científica. Por lo general, el *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND es similar a las cepas que no causan AHPND, con la excepción de la presencia de los plásmidos portadores de los genes codificantes para las toxinas PirA y PirB. *V. parahaemolyticus* es una bacteria Gram-negativa, halófila y mesófila, que posee forma de bacilo, pudiendo presentar dos morfologías: con un flagelo polar ó rodeado de varios flagelos, (Trujillo, 2016). De acuerdo a Kaneko & Colwell, (1973), este patógeno habita en ambientes salinos, marinos o estuarinos, proliferando de manera muy rápida en climas cálidos. Se puede encontrar nadando libremente, fijado en el fondo del agua, o habitando bivalvos y crustáceos (McCarter, 1999).

Diagnóstico de AHPND

Los principales signos clínicos observados en camarones afectados con AHPND son: hepatopáncreas atrofiado (Figura 2) con coloración pálida o blanquecina (Cuéllar-Anjel. J, 2013b). Los camarones afectados también presentan signos comunes a otras enfermedades como, nado errático, situándose muchas veces en el fondo del estanque, exoesqueleto blando, músculo opaco, crecimiento reducido e intestino entrecortado

(Cuéllar- Anjel. J, 2013b). Algunos de estos signos clínicos son de características similares a las enfermedades producidas por el virus de la mancha blanca, vibriosis sistémica, virus del síndrome de Taura y virus de la cabeza amarilla (Cuéllar- Anjel. J, 2013b).

Figura 2.



Fotografía de dos juveniles de *P. vannamei* (Vietnam), ambos con hepatopáncreas atrofiados, signos clínicos indicativos de AHPND. Fuente: (Cuéllar- Anjel. J, 2013b).

La prueba de oro para el diagnóstico de AHPND se realiza con análisis de histopatología, siendo el principal hallazgo el desprendimiento severo de los túbulos del hepatopáncreas en la fase aguda y de transición de la enfermedad (Figura 3, Tabla 1). Estas lesiones avanzan en forma característica de sentido proximal a distal. En la fase terminal de la enfermedad se observa una masiva infección de bacterias oportunistas, marcada inflamación, melanización multifocal y destrucción masiva del hepatopáncreas (Tabla 1).

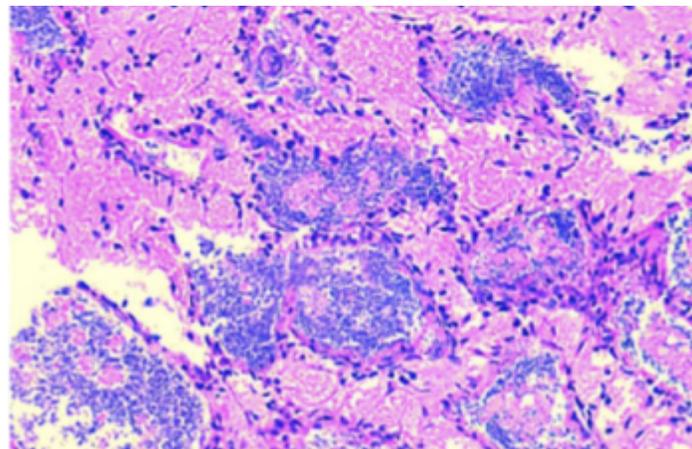
La detección de la infección se realiza con análisis de biología molecular, a través principalmente de un PCR anidado usando los primers AP4, que amplifica 100% de la región del gen *pirA* y 70% de *pirB* (1.269 pb producto del primer paso y 230 pb producto anidado) (Sritunyalucksana et al., 2015).

Tabla 1.

Principales hallazgos histopatológicos en camarones afectados con AHPND (Morales-Covarrubias y Gómez-Gil, 2014).

Fase de la enfermedad	Infección bacteriana en el hepatopáncreas	Inflamación de los túbulos del HP	Células que recubren los túbulos del hepatopáncreas (R, B, F y E)	Células de los túbulos del hepatopáncreas	Melanización
Aguda	Ausencia	Ausencia	Perdida de Función	Desprendimiento severo, con algunos núcleos intactos	-
Transición	Inicio	Inicio	-	Continuación del desprendimiento	Presente en áreas más cercanas al intestino medio
Terminal	Masiva	Marcada	-	Destrucción masiva del hepatopáncreas	Multifocal

Figura 3.



Camarón *P. vannamei* mostrando hallazgos histopatológicos del hepatopáncreas en fase terminal de AHPND: destrucción de la mayoría de los túbulos e infección bacteriana masiva e infiltraciones hemocíticas. Fuente: (Valera-Mejía et al., 2017).



Materiales y Métodos

Se realizaron cinco experimentos para evaluar la relación dosis-respuesta de la supervivencia de post-larvas de camarón *P. vannamei* desafiadas con varias concentraciones bacterianas de *V. parahaemolyticus*. En estos experimentos, la concentración bacteriana y la supervivencia de las post-larvas se consideraron como las variables dosis y respuesta, respectivamente. Se determinó, además, el efecto del número y tipo de exposición de las post-larvas con cultivo bacteriano y el protocolo de recambio de agua (tipo de recambio y tiempo al primer recambio) sobre la mortalidad de las post-larvas. Con la información obtenida de los cinco experimentos se modeló la supervivencia de las post-larvas en función de las variables estudiadas, mediante un análisis de regresión múltiple. Los resultados del mejor modelo de regresión múltiple se usaron para determinar varias condiciones de protocolos de desafío con *V. parahaemolyticus* que generaron diferentes rangos de supervivencia de post-larvas. Finalmente, se determinó las condiciones experimentales que producen un rango de supervivencia del 40-60% en condiciones de infección con *V. parahaemolyticus*, adecuado para probar la eficacia de productos antibacterianos comerciales o que se encuentren en fase de desarrollo.

Obtención de Post-larvas

Las post-larvas de camarón *P. vannamei* se adquirieron de un Laboratorio Comercial de la provincia de Santa Elena. Se utilizaron post-larvas en estadios similares (PL7-PL9) para los distintos experimentos para disminuir el error experimental por efecto del estadio post-larval. Los especímenes fueron trasladados en dobles fundas plásticas de polietileno inyectadas con oxígeno puro hasta las instalaciones del CENAIM-ESPOL (San

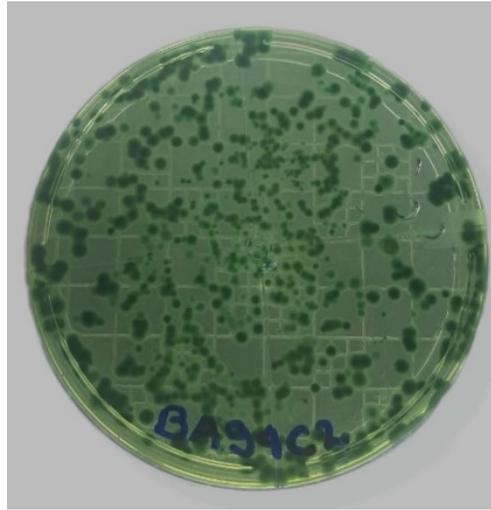


Pedro, Santa Elena), tomando un tiempo máximo de tres horas hasta la siembra en las unidades experimentales.

Cultivo Bacteriano

La cepa *V. parahaemolyticus* Ba94C2 (preservada a -80°C en TSB, al 2% de NaCl y 20% de glicerol) del cepario del Laboratorio de Microbiología del CENAIM, causante de AHPND (Figura 4), fue utilizada como cepa patógena para todos los desafíos experimentales (Restrepo et al. 2016). La cepa fue reactivada siguiendo el protocolo del Laboratorio de Microbiología de CENAIM. Brevemente, la cepa fue reactivada en Agar Trypticasa Soya (TSA), suplementada con 2% de NaCl y 2% de Bacto Agar. El método de siembra utilizado fue por estrías o agotamiento. La cepa fue incubada en 30 °C durante 24 h. Luego de ser verificada la pureza de la cepa, se tomó una colonia y se depositó en 100 mL de caldo de Bacto Peptona en agua de mar. El procedimiento se realizó dentro de la Cámara de Seguridad Biológica clase II (Air Tech BCM 1002W). El recipiente de medio líquido de Bacto Peptona se agitó a 110 rpm durante 7 h en un agitador (New Brunswick Scientific CLASSIC C10) para obtener una concentración bacteriana final de 2×10^8 UFC/mL.

Figura 4.



Cepa de *V. parahaemolyticus* (Ba94C2) cultivada en agar TCBS, donde se observan las colonias bacterianas con una tonalidad verde.

Condiciones Experimentales

Las post-larvas se aclimataron lentamente en laboratorio para minimizar el estrés de los animales, lo cual se realizó en un periodo de hasta 4 h, hasta alcanzar la temperatura y salinidad experimental (30 °C y 35 g/L, Figura 5). Luego del periodo de aclimatación, las post-larvas fueron transferidas a las unidades experimentales (vasos plásticos de 500 mL) provistas de agua de mar filtrada (2 µm) y esterilizada (300 mL) por autoclave (Yamato SQ500C). La densidad de siembra en las unidades experimentales fue de 100 PL/L (30 post-larvas/unidad experimental). Luego de la siembra, las post-larvas fueron alimentadas cada 2 h con dieta artificial. La dieta artificial fue siempre la misma en todos los experimentos. Cada unidad experimental estuvo provista de aireación constante. En los experimentos en los que se realizó recambio, el agua de mar utilizada para los recambios fue filtrada (2 µm), esterilizada por autoclave y temperada a una temperatura de 30 °C.

Figura 5.



Proceso de aclimatación (temperatura y salinidad) de post-larvas *P. vannamei* (PL7-PL9).

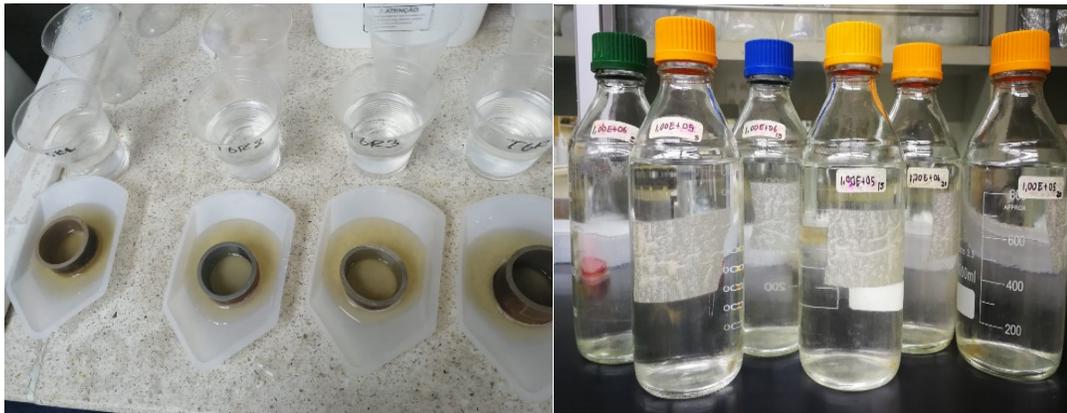
Experimentos 1 y 2. Pruebas de Desafío Para Determinar el Número de Exposiciones Con Cultivo Bacteriano

La prueba de desafío de referencia utilizada para AHPND fue desarrollada para camarones juveniles utilizando una doble inmersión de los camarones, donde la primera consistió de una inmersión corta (15 min) de los animales en una solución bacteriana a 10^8 UFC/mL, seguida de una inoculación bacteriana directa a los tanques de cultivo hasta llegar a una concentración en los tanques de cultivo de 10^6 UFC/mL, y posterior siembra de los animales en estos tanques de cultivo (Tran et al. 2013). Sin embargo, una doble inmersión implica un doble estrés en los animales, que provocaría un efecto adicional a las condiciones estudiadas (concentración bacteriana y protocolo de recambio) sobre la supervivencia. Además, la ejecución de una doble inmersión dificulta el manejo de la experimentación.

Por tanto, se realizó un primer experimento (Experimento 1) donde se evaluó la presencia de diferencias en la supervivencia de las post-larvas por efecto del número de exposición con cultivo bacteriano. Se utilizaron dos tratamientos (Tabla 2). Uno de los tratamientos

consistió de desafiar a las post-larvas con una sola inmersión directa a los tanques de cultivo, donde la concentración bacteriana estaba a 10^6 UFC/mL. Mientras que, el segundo tratamiento consistió en desafiar a las post-larvas mediante una doble inmersión, donde las post-larvas fueron inmersas en una solución bacteriana corta de 2 min, a una concentración de 10^8 UFC/mL, seguida de una inoculación bacteriana directa a los tanques de cultivo, donde la concentración bacteriana estaba a 10^6 UFC/mL (Figura 6 y Tabla 2).

Figura 6.



Procesos de infecciones bacterianas con inmersión corta y una sola inoculación directa a los tanques de cultivo

Se incluyó un control negativo donde las post-larvas no fueron desafiadas con la bacteria patógena (post-larvas cultivadas en agua de mar filtrada y esterilizada por autoclave). Se utilizaron 12 réplicas por tratamiento, incluyendo al control negativo. No se realizó recambios de agua durante los experimentos. El experimento tuvo una duración de 48 h.

Tabla 2.

Descripción de los tratamientos evaluados en el Experimento 1.

Tratamiento	Tipo de inmersión	Descripción de los tratamientos	
		Concentración bacteriana - cepa <i>V. paraahaemolyticus</i> Ba94C2 (UFC/mL)	Condiciones de recambio
T1	Doble inmersión: Inmersión corta de 2 min (10^8), seguida inoculación bacteriana (10^6) directa a los tanques de cultivo	10^8 (Inmersión corta) 10^6 (Inmersión directa a los tanques de cultivo)	Sin recambio
T2	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^6	Sin recambio

El experimento fue repetido por una segunda ocasión (Experimento 2) para evaluar la repetitividad de los resultados. Las condiciones experimentales del Experimento 2 fueron idénticas a la del Experimento 1, con la diferencia que se realizó un recambio a las 24 h (Tabla 3). El experimento tuvo una duración de 48 h.

Tabla 3.

Descripción de los tratamientos evaluados en el Experimento 2.

Tratamiento	Tipo de inmersión	Descripción de los tratamientos	
		Concentración bacteriana - cepa <i>V. paraahaemolyticus</i> Ba94C2 (UFC/mL)	Condiciones de recambio
T1	Doble inmersión: Inmersión corta de 2 min, seguida de inoculación bacteriana directa a los tanques de cultivo	10^8 (Inmersión corta) 10^6 (Inoculación bacteriana directa a los tanques de cultivo)	Recambio a las 24 h
T2	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^6	Recambio a las 24 h



Experimento 3. Prueba de Desafío Para Determinar el Efecto de la Concentración Bacteriana y Tipo de Recambio

Una vez que se determinó el número adecuado de exposición de las post-larvas con cultivo bacteriano, se evaluó la relación dosis-respuesta para la supervivencia de post-larvas de camarón *P. vannamei* desafiadas con varias concentraciones bacterianas de *V. parahaemolyticus*, a distintas condiciones de manejo de recambio de agua. Así, en el Experimento 3 se determinó si existía un efecto significativo sobre la supervivencia de las post-larvas por la concentración bacteriana de infección y por el tipo de recambio (recambio a las 24 h *versus* sin recambio durante el desafío experimental). Se utilizaron diez tratamientos (Tabla 4), que resultaron de combinar las concentraciones bacterianas de infección (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 UFC/mL) y el recambio de agua (sin recambio *versus* recambio a las 24 h post-infección). Se añadió un control negativo (sin infección bacteriana). El agua para el cultivo experimental y recambio fue filtrada ($2\ \mu$) y esterilizada por autoclave ($121\ ^\circ\text{C}$ durante 15 min). Los tratamientos donde se recambió agua tuvieron 3 réplicas experimentales, mientras que, los tratamientos donde no se recambió agua tuvieron 4 réplicas experimentales. En todos los casos el desafío experimental se realizó mediante una sola inoculación directa a los tanques de cultivo. El experimento tuvo una duración de 48 h.



Tabla 4.

Descripción de los tratamientos evaluados en el Experimento 3.

Tratamiento	Tipo de inmersión	Descripción de los tratamientos	
		Concentración bacteriana - cepa <i>V. parahaemolyticus</i> Ba94C2 (UFC/mL)	Condiciones de recambio
T1	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^2	Sin recambio
T2	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^3	Sin recambio
T3	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^4	Sin recambio
T4	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^5	Sin recambio
T5	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^6	Sin recambio
T6	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^2	Recambio a las 24 h
T7	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^3	Recambio a las 24 h
T8	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^4	Recambio a las 24 h
T9	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^5	Recambio a las 24 h
T10	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^6	Recambio a las 24 h

Experimento 4. Prueba de Desafío Para Determinar el Efecto de la Concentración Bacteriana y Tiempo Para el Primer Recambio

En el Experimento 4 se determinó si existía un efecto significativo sobre la supervivencia de las post-larvas por la concentración bacteriana de infección (10^4 , 10^5 y 10^6 UFC/mL) y por el tiempo al primer recambio (4, 8 y 12 h post infección), para un total de nueve tratamientos (Tabla 5). Se añadió un control negativo (sin infección bacteriana) con recambio a las 24 h. El agua para el cultivo experimental y recambio fue filtrada (2μ) y esterilizada por autoclave ($121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min). Todos los tratamientos tuvieron seis réplicas experimentales. En todos los casos, el desafío experimental se realizó mediante



una sola inoculación directa a los tanques de cultivo. El experimento tuvo una duración de 48 h.

Tabla 5.

Descripción de los tratamientos evaluados en el Experimento 4.

Tratamiento	Tipo de inmersión	Descripción de los tratamientos	
		Concentración bacteriana - cepa <i>V. parahaemolyticus</i> Ba94C2 (UFC/mL)	Condiciones de recambio
T1	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^4	4 h post infección
T2	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^4	8 h post infección
T3	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^4	12 h post infección
T4	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^5	4 h post infección
T5	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^5	8 h post infección
T6	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^5	12 h post infección
T7	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^6	4 h post infección
T8	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^6	8 h post infección
T9	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	10^6	12 h post infección

Experimento 5. Pruebas de Desafío Para Determinar el Efecto de la Concentración Bacteriana y Tiempo de Inmersión Corta

En el experimento 5, se determinó el efecto del tiempo de inmersión con la cepa bacteriana sobre la supervivencia de las post-larvas, para lo cual se incluyó 6 tratamientos infectados a diferentes tiempos de inmersión corta (1, 2, 3 y 4 min) con la cepa patógena y a dos concentraciones bacterianas (10^6 y 10^8 UFC/mL, Tabla 6). Se añadió un control negativo (sin infección bacteriana) con recambio a las 24 h. El agua para el cultivo experimental y recambio fue filtrada (2μ) y esterilizada por autoclave ($121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15



min). Todos los tratamientos tuvieron seis réplicas experimentales. El experimento tuvo una duración de 48 h.

Tabla 6.

Descripción de los tratamientos evaluados en el Experimento 5.

Tratamiento	Tipo de inmersión	Descripción de los tratamientos	
		Concentración bacteriana - cepa <i>V. parahaemolyticus</i> Ba94C2 (UFC/mL)	Condiciones de recambio
T1	Inmersión corta de 1 min	10 ⁸	Recambio a las 24 h
T2	Inmersión corta de 2 min	10 ⁸	Recambio a las 24 h
T3	Inmersión corta de 3 min	10 ⁸	Recambio a las 24 h
T4	Inmersión corta de 4 min	10 ⁸	Recambio a las 24 h
T5	Inmersión corta de 2 min	10 ⁶	Recambio a las 24 h
T6	Inmersión corta de 4 min	10 ⁶	Recambio a las 24 h

Modelaje de la Supervivencia Acumulada y Tiempo Medio en Morir

La supervivencia acumulada a las 48 h post-infección y el tiempo medio de supervivencia de las post-larvas (datos de los cinco experimentos) fueron modelados por separado, en función de las variables explicativas planteadas en la hipótesis de la investigación, mediante un análisis de regresión múltiple. Donde las variables explicativas fueron: concentración bacteriana (transformada a logaritmo), tipo de inmersión (variable nominal con dos categorías: una sola inoculación directa a los tanques de cultivo e inmersión corta) y tiempo al primer recambio. Además, se creó una variable nominal de condiciones de recambio, con dos categorías: sin recambio/recambio a las 24 h post-infección y recambio a las primeras 12 h post-infección (incluye primeros recambios realizados a las 4, 8 y 12 horas). Los resultados del mejor modelo de regresión múltiple se usaron para determinar varias condiciones de protocolos de desafío con *V. parahaemolyticus* que simularon diferentes rangos de mortalidades de post-larvas de



camarón. Con esta información, se determinó las condiciones experimentales que simulan entre 40-60% de supervivencia en condiciones de infección con *V. parahaemolyticus*.

Análisis de datos

En cada experimento, las diferencias en la mortalidad acumulada a las 48 h post-infección entre tratamientos se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). La hipótesis nula (sin efecto del tratamiento) se rechazó con un valor de $p < 0.05$. La homogeneidad de la varianza de todos los tratamientos se examinó mediante la prueba de Bartlett. La asunción de normalidad se examinó mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks. Se utilizó la prueba de diferencia significativa honesta de Tukey para comparar las medias de los tratamientos cuando el resultado de ANOVA fue significativo. El efecto de las diferencias entre tratamientos se consideró significativo con un valor de $p < 0.05$. Adicionalmente, en cada experimento, se realizó un análisis de supervivencias de Kaplan-Meier para estimar la existencia de diferencias significativas en la distribución de las curvas de supervivencias durante el periodo completo de desafío de 48 h. Se utilizó el estimador de log-rank para estimar diferencias significativas entre tratamientos. Finalmente, se realizó un análisis de regresión múltiple para explicar la supervivencia acumulada a las 48 h post-infección y el tiempo medio de supervivencia en función de las variables: concentración bacteriana (variable continua), tipo de inmersión (variable de dos categorías: inmersión corta *versus* una sola inoculación directa a los tanques de cultivo) y condiciones de recambio (variable de dos categorías: recambio ya sea que se haya efectuado el recambio a las 4, 8 o 12 horas post-infección *versus* recambio a las 24 h post-infección o que no se haya realizado recambio). Los modelos consideraron



efecto de interacciones entre las variables explicativas. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el software estadístico R.

Análisis de Muestras

Análisis Microbiológico

Para cada experimento se realizó cuantificación de la concentración bacteriana presente en las post-larvas antes de iniciar la experimentación. Brevemente, la metodología consistió en la colección de una muestra del lote inicial de post-larvas (1 g), las mismas que fueron lavadas con agua de mar autoclavada y maceradas para homogeneizar la concentración bacteriana, realizando este proceso en una Cámara de Seguridad Biológica de clase II (Air Tech BCM 1002W). Se tomaron alícuotas (100 μ L) y se realizaron diluciones seriadas de 10 veces (10^{-3} a 10^{-5}) en una solución de NaCl estéril al 2% para crecimiento en placas Petri de bacterias totales en Agar Marino (Difco). Se realizó el mismo procedimiento para el crecimiento de Vibrios (diluciones seriadas 10^{-1} a 10^{-3}) en Agar tiosulfato citrato bilis sal sacarosa (TCBS, Difco) (Figura 7). Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 24 h (Incubador Thermo Scientific 51028065). Los recuentos bacterianos se realizaron a partir de placas que contuvieron entre 30 a 300 colonias, y fueron expresaron como unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/gramo).

Figura 7.



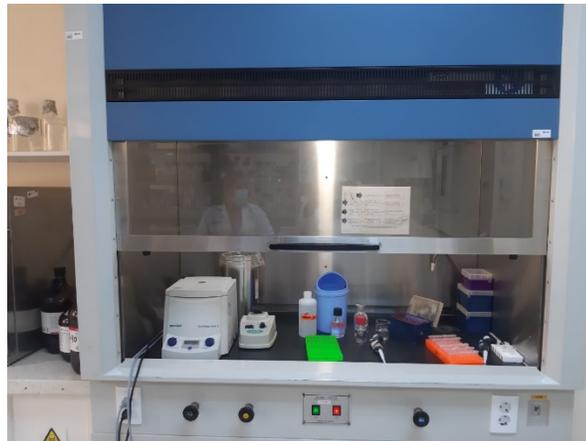
Proceso de siembra de muestras para los análisis microbiológicos en agar TCBS y agar Marino dentro de cámara de seguridad biológica.

Detección de Genes Codificantes Para las Toxinas PirA y PirB

En cada experimento, se realizó la detección por análisis de PCR de los genes codificantes para las toxinas PirA y PirB a una muestra de post-larvas moribundas de cada tratamiento (pool de macerado de las respectivas unidades experimentales), para confirmar la efectividad de la infección experimental. Así como a los animales usados en los controles negativos (pool de las respectivas unidades experimentales), para descartar infecciones con AHPND. En todos los casos se siguió la metodología descrita a continuación. Una alícuota (100 μ L) de la dilución de post-larvas de 10^{-2} (análisis microbiológico) fue enriquecida con 5 mL de medio TSB y suplementada con 2% de NaCl. La muestra fue incubada durante 24 h a 30°C. Brevemente, la extracción de ADN se realizó a partir de este cultivo bacteriano, centrifugado a 8000 rpm por 2 min. La lisis celular se realizó buffer de lisis y SDS. Las muestras se incubaron a 55 °C por 1 h. Se realizó una extracción de fenol-cloroformo. Los productos amplificados se detectaron con un PCR punto final con los iniciadores AP4-F1 y AP4-R1 (Sritunyalucksana et al., 2015). Las amplificaciones se realizaron en un

termociclador Applied Biosystems (Figura 8). Las alícuotas de los productos de PCR fueron verificados con electroforesis en un gel de agarosa del 1.5% (100 V, por 45 min), conteniendo buffer TBE y suplementado con SYBR® Safe (Invitrogen). La visualización de los productos amplificados se realizó con un trans-iluminador con luz ultravioleta.

Figura 8.



Proceso de extracción de ADN con fenol dentro de la Sorbona, unos de los pasos para el análisis de PCR

Análisis Histopatológico

Se colectaron muestras del lote inicial de post-larvas de camarón para análisis de histopatología con el objetivo de observar el estado de salud y descartar afectación por AHPND y de las post-larvas moribundas de los tratamientos infectados para confirmar la efectividad de la infección. En todos los casos, las muestras fueron enjuagadas con agua de mar autoclavada y preservadas en solución Davidson. Después de 24 horas, el fijador fue reemplazado con etanol al 70%, permaneciendo en esta solución hasta el respectivo análisis (Figura 9). El análisis de histopatología se realizó siguiendo la metodología descrita por Bell & Lightner (1988). Las observaciones histopatológicas estuvieron

enfocadas principalmente en determinar el grado de afectación causado en el hepatopáncreas por lesiones compatibles con AHPND, categorizando estos daños como: muy leve, leve, medio y severo.

Figura 9.



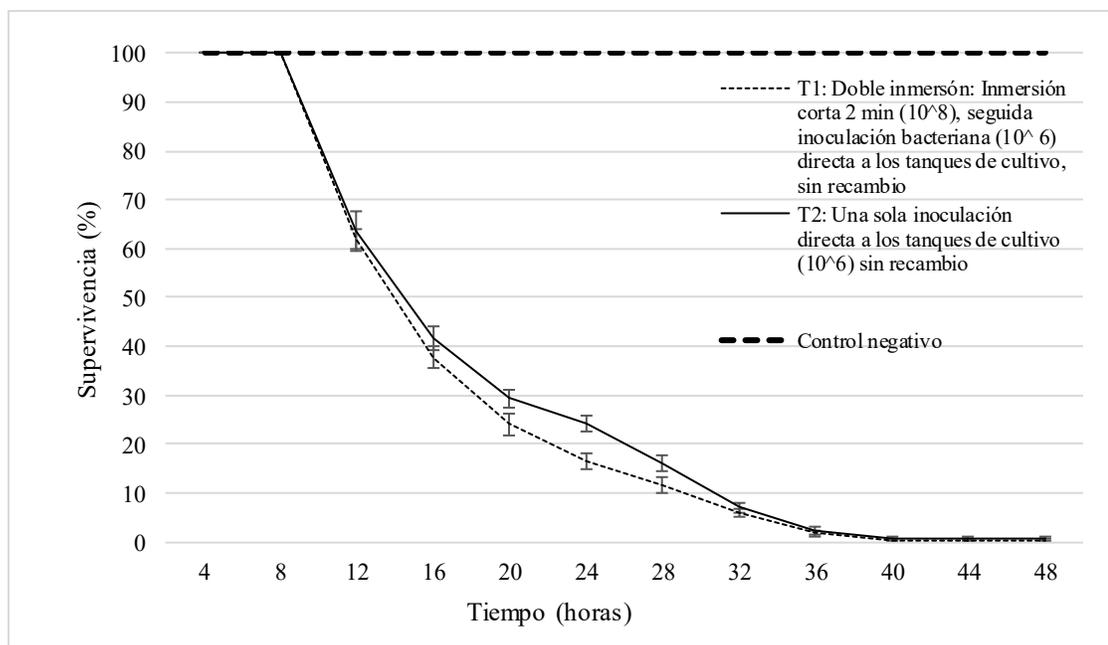
Proceso de purificación de las muestras de post-larvas de *camarón P. vannamei* para realizar el análisis histopatológico.

Resultados

Experimentos 1 y 2. Pruebas de Desafío Para Determinar el Número de Exposiciones con Cultivo Bacteriano

En el experimento 1, no se observó diferencias significativas en el tiempo medio de supervivencia ($p = 0.112$), ni en la supervivencia acumulada ($p = 0.451$) entre los dos tipos de inmersión (Figura 10, Tabla 7). Siendo estos dos tipos de inmersión: inmersión directa de las post-larvas al agua del tanque experimental con una concentración de bacteria patógena de 10^6 UFC/mL *versus* la doble inmersión.

Figura 10.

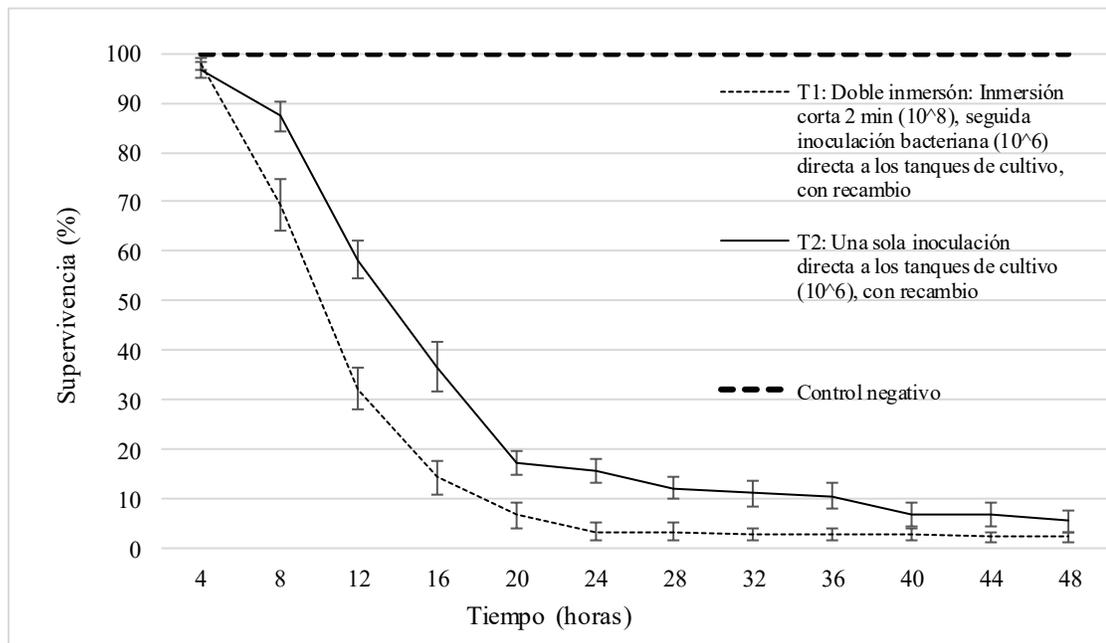


Supervivencias registradas durante el Experimento 1.

En el experimento 2, cuando se realizó recambio de agua a las 24 horas post-infección, al igual que en el Experimento 1, tampoco se observó diferencias significativas en la supervivencia acumulada ($p = 0.209$) entre los dos tipos de inmersión. Sin embargo,

los tiempos medio de supervivencia fueron significativamente distintos entre los dos tratamientos ($p < 0.0001$, Figura 11, Tabla 7). Las post-larvas que recibieron doble inoculación bacteriana (Tratamiento T1, Figura 11, Tabla 7) sobrevivieron significativamente menos tiempo (13.5 ± 0.5 horas) comparado con las post-larvas que solo recibieron la infección a través de la inoculación directa a los tanques de cultivo (18.4 ± 0.8 horas).

Figura 11.



Supervivencias registradas durante el Experimento 2.



Tabla 7.

Descripción de los tratamientos evaluados en los cinco experimentos (Protocolos de infección bacteriana y de recambio de agua). Resultados de los análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para tiempo medio de supervivencia (promedio \pm error estándar) y de análisis de varianza de una vía (ANOVA) para la supervivencia acumulada (promedio \pm error estándar) a las 48 h post-infección. Dentro de cada experimento, letras diferentes indican diferencias significativas al 95% de confianza, según análisis de supervivencias de Kaplan-Meier ó ANOVA.

Experimento	Tratamiento	Protocolo de infección bacteriana (tipo de infección, tiempo de exposición en inmersión corta y concentración bacteriana de exposición)		Recambio de agua (horas post-infección)												Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier		Análisis de varianza de una vía		
		Inmersión corta	Inoculación directa a los tanques de cultivo	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	Tiempo medio de supervivencia (horas)	p-value	Supervivencias acumuladas a las 48 h post-infección (%)	p-value
Experimento 1	T1	10 ⁸ - 2 min	10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.34 \pm 0.4 ^a	0.112	0.28 \pm 0.3 ^a	0.451
	T2	‡	10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.4 \pm 0.5 ^a		1.0 \pm 0.3 ^a	
Experimento 2	T1	10 ⁸ 2 min	10 ⁶							√							13.5 \pm 0.5 ^a	p < 0.0001	2.2 \pm 1.1 ^a	0.209
	T2	‡	10 ⁶							√							18.4 \pm 0.8 ^b		5.6 \pm 2.2 ^a	
Experimento 3	T1	‡	10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43.1 \pm 1.1 ^g	p < 0.0001	84.2 \pm 0.8 ^c	< 0.001
	T2	‡	10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32.2 \pm 1.3 ^e		51.1 \pm 14.1 ^c	
	T3	‡	10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.3 \pm 1.1 ^d		13.3 \pm 5.4 ^{ab}	
	T4	‡	10 ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.8 \pm 1.0 ^e		4.2 \pm 1.6 ^a	
	T5	‡	10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15.0 \pm 0.8 ^b		0 \pm 0 ^a	
	T6	‡	10 ²								√						43.4 \pm 1.2 ^g		84.4 \pm 2.2 ^c	
	T7	‡	10 ³								√						34.2 \pm 1.6 ^e		46.7 \pm 13.9 ^{bc}	
	T8	‡	10 ⁴								√						23.6 \pm 1.3 ^d		11.1 \pm 2.9 ^{ab}	
T9	‡	10 ⁵								√						18.9 \pm 1.3 ^e	6.7 \pm 3.3 ^a			



INSTITUTO SUPERIOR TECNOLÓGICO
LUIS ARBOLEDA MARTÍNEZ
 MANTA – MANABÍ – ECUADOR

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR,
 CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

	T10	‡	10 ⁶						√						12.7 ± 0.7 ^a		0 ± 0 [*]	
Experimento 4	T1	‡	10 ⁴		√					√					42.3 ± 0.8 ^c	p < 0.0001	69.4 ± 3.5 ^c	< 0.001
	T2	‡	10 ⁴			√					√				44.1 ± 0.6 ^c		71.1 ± 3.5 ^c	
	T3	‡	10 ⁴				√					√			43.2 ± 0.7 ^c		70.6 ± 3.4 ^c	
	T4	‡	10 ⁵		√					√					21.4 ± 1.0 ^b		13.9 ± 1.8 ^{a,b}	
	T5	‡	10 ⁵			√					√				21.6 ± 1.0 ^b		13.3 ± 2.7 ^{a,b}	
	T6	‡	10 ⁵				√					√			24.6 ± 1.0 ^b		16.1 ± 3.0 ^b	
	T7	‡	10 ⁶		√					√					14.0 ± 0.7 ^a		3.89 ± 2.0 ^a	
	T8	‡	10 ⁶			√					√				13.4 ± 0.6 ^a		3.3 ± 1.2 ^a	
	T9	‡	10 ⁶				√					√			13.0 ± 0.7 ^a		3.8 ± 1.0 ^a	
Experimento 5	T1	10 ⁸ – 1 min	-						√						15.1 ± 0.6 ^b	p < 0.0001	1,1 ± 0.7 ^a	< 0.001
	T2	10 ⁸ – 2 min	-						√						17.2 ± 0.8 ^b		6.1 ± 1.8 ^a	
	T3	10 ⁸ – 3 min	-						√						16.9 ± 0.9 ^b		7.2 ± 1.6 ^a	
	T4	10 ⁸ – 4 min	-						√						13.5 ± 0.6 ^a		2.2 ± 1.1 ^a	
	T5	10 ⁶ – 2 min	-						√						45.0 ± 0.6 ^c		78.9 ± 4.3 ^b	
	T6	10 ⁶ – 4 min	-						√						46.0 ± 0.5 ^c		85.0 ± 4.4 ^b	

Nota:

*: tratamientos no incluidos en el análisis estadístico por no presentar variabilidad (desviación estándar = 0)

√: recambio de agua

-: sin recambio de agua

‡: no se realizó



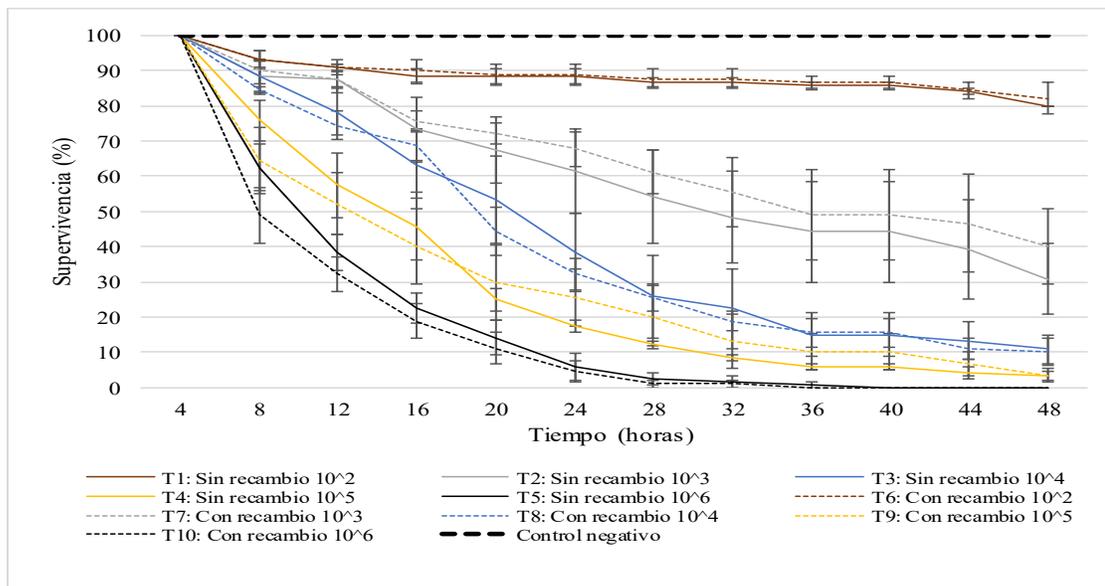
Experimento 3. Prueba de Desafío Para Determinar el Efecto de la Concentración Bacteriana y Tipo de Recambio

En el Experimento 3, cuando se comparó distintas concentraciones bacterianas de exposición y protocolo de recambio de agua, se encontró un efecto significativo de los tratamientos sobre el tiempo medio de supervivencia ($p < 0.0001$, Figura 12, Tabla 7). Específicamente, se observó diferencias significativas por efecto de la concentración bacteriana, con una relación inversa entre tiempo de supervivencia y concentración bacteriana, lo cual fue observado, tanto para los tratamientos con y sin recambio de agua (Figura 12, Tabla 7). Sin embargo, no se observó diferencias significativas por efecto del protocolo de recambio, a ninguna de las concentraciones evaluadas, excepto cuando las post-larvas fueron expuestas a una concentración bacteriana de 10^6 UFC/mL, donde la supervivencia de las post-larvas que recibieron recambio de agua a las 24 h fue significativamente inferior (12.7 ± 0.7 h) comparada con la supervivencia de las post-larvas que no recibieron recambio de agua (15.0 ± 0.8 h). En tanto que, se observó dos grupos de tratamiento con similares valores de supervivencia acumulada. Así, en el primer grupo, cuando las post-larvas fueron expuestas a las concentraciones 10^2 y 10^3 UFC/mL, la supervivencia acumulada fue significativamente similar en ambos casos, y en un rango entre 51.1% y 84.2% (tratamientos donde no se realizó recambio), y entre 46.7% y 84.4 % (tratamientos donde se realizó recambios a las 24 h). Mientras que, en el segundo grupo, cuando las post-larvas fueron expuestas a las concentraciones de 10^4 y 10^5 UFC/mL, las supervivencias tampoco fueron significativamente distintas entre ambas concentraciones, reportando supervivencias acumuladas entre 4.2% y 13% (tratamiento donde no se realizó



recambios de agua) y entre 6.7% y 11.1% (tratamientos donde se realizó recambios a las 24 h). La supervivencia fue del 0% cuando la exposición bacteriana fue de 10^6 UFC/mL con ambos protocolos de recambio de agua. A una igual concentración bacteriana, no encontró diferencias significativas cuando se comparó la supervivencia acumulada entre los dos protocolos de recambio de agua (Figura 12, Tabla 7).

Figura 12.



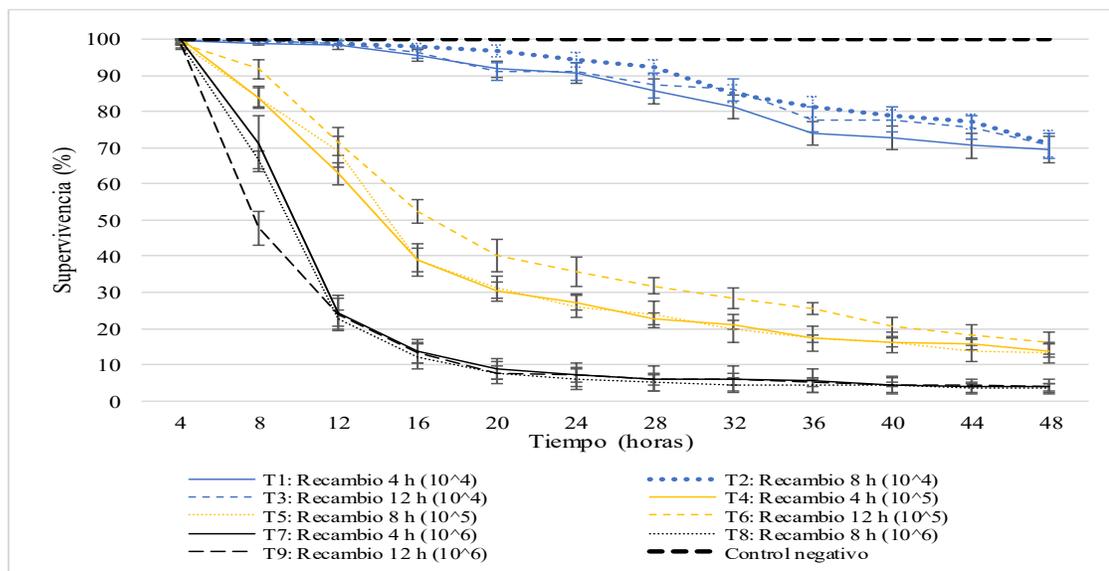
Supervivencias registradas durante el Experimento 3.

Experimento 4. Prueba de Desafío Para Determinar el Efecto de la Concentración Bacteriana y Tiempo Para el Primer Recambio

En el experimento 4, dentro del grupo de tratamientos con la misma concentración bacteriana, no se encontró diferencias significativas en el tiempo medio de supervivencia, ni en la supervivencia acumulada por efecto de los diferentes horarios del primer recambio de agua post-infección, lo cual fue evidente a cada una de las tres concentraciones

bacterianas de infección evaluadas (Figura 13, Tabla 7). Sin embargo, se encontró diferencias significativas tanto para el tiempo medio de supervivencia, como para la supervivencia acumulada, por efecto de la concentración bacteriana, mostrando una vez más una relación inversa entre concentración bacteriana y tiempo medio de supervivencia.

Figura 13.



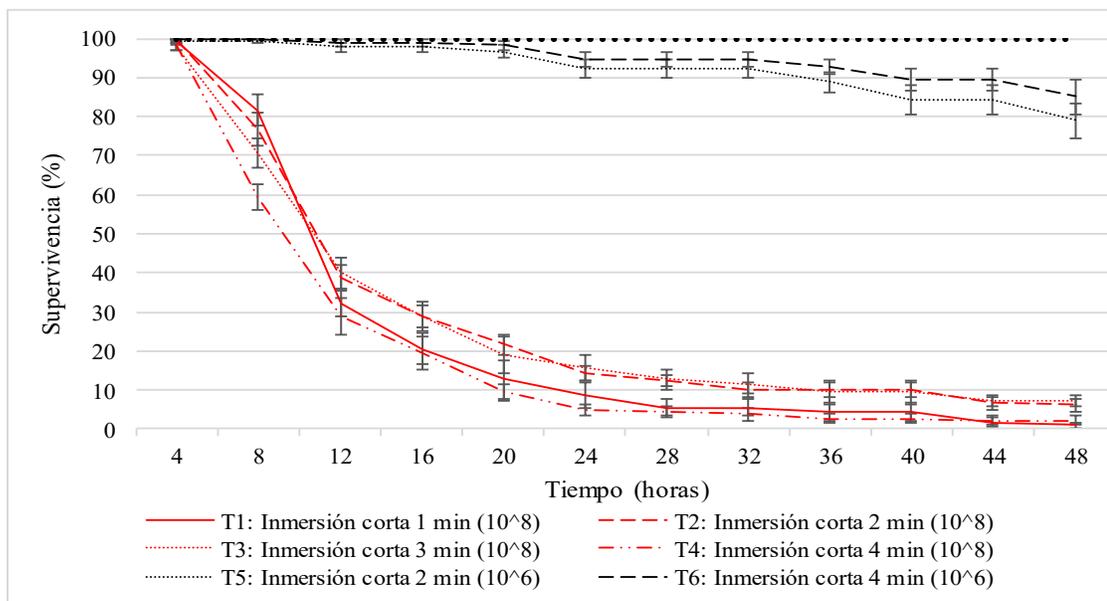
Supervivencias registradas durante el Experimento 4.

Experimento 5. Pruebas de Desafío Para Determinar Efecto de la Concentración Bacteriana y Tiempo de Inmersión Corta

En el Experimento 5, se observó un efecto significativo por la concentración bacteriana en ambas variables (tiempo medio de sobrevivencia y supervivencia acumulada), con una supervivencia significativamente superior en los tratamientos expuestos a 10^6 UFC/mL, comparado con los tratamientos donde la exposición fue a 10^8 UFC/mL. No se observó diferencias significativas entre el tiempo de exposición

durante la inmersión corta. Sin embargo, se reportó un adelanto en la mortalidad cuando los animales fueron expuestos a 4 min de exposición, comparado con los otros tres tratamientos, donde las post-larvas fueron expuestas entre 1 y 3 min durante la inmersión corta (Figura 14, Tabla 7).

Figura 14.



Supervivencias registradas durante el Experimento 5.

Modelaje de la Supervivencia Acumulada y Tiempo Medio en Morir

La supervivencia acumulada a las 48 h post infección y tiempo medio de supervivencia de los cinco experimentos fueron significativamente explicadas por dos modelos de regresión múltiple que contuvieron a las variables explicativas planteadas en la hipótesis de la investigación.

El modelo de regresión múltiple que presentó el mejor ajuste para predecir la supervivencia acumulada de las post-larvas a las 48 h post-infección es mostrada en la tabla



8. Este modelo incluyó en forma significativa $p < 0.0001$ a las siguientes variables: concentración bacteriana, tipo de inmersión, condiciones de recambio, interacción entre concentración bacteriana y tipo de inmersión e interacción entre concentración bacteriana y condiciones de recambio. El modelo presentó un coeficiente de determinación R^2 múltiple alto de 0.88.

Tabla 8.

Resultado del modelo de regresión múltiple que presentó el mejor ajuste para predecir la supervivencia acumulada de post-larvas de camarón *P. vannamei* a las 48 h post-infección (R^2 múltiple = 0.88, $p < 0.0001$).

Variable	Estimado	Error Estándar	Valor t	Pr (> t)
Intercepto.	315.28	38.34	8.22	<0.0001
Concentración bacteriana (Logaritmo).	-38.89	5.19	-7.50	<0.0001
Tipo de Inmersión. Baseline (Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo).	-217.48	39.79	-5.47	<0.0001
Condiciones de Recambio. Baseline (Recambio a las 4, 8 o 12 horas post-infección).	98.37	26.95	3.65	0.002
Interacción entre concentración bacteriana y tipo de inmersión.	21.45	5.68	3.78	0.001
Interacción entre concentración bacteriana y condiciones de recambio.	-15.89	5.41	-2.94	0.008

En tanto que, el mejor modelo de regresión múltiple para el tiempo medio de supervivencia fue explicado significativamente ($p < 0.0001$) por las mismas variables, pero mostrando un mayor coeficiente de determinación (R^2 múltiple = 0.95, Tabla 9).



Tabla 9.

Resultado del modelo de regresión múltiple que presentó el mejor ajuste para predecir tiempo medio de supervivencia de post-larvas de camarón *P. vannamei* a las 48 h post-infección (R^2 múltiple = 0.95, $p < 0.0001$).

Variable	Estimado	Error Estándar	Valor t	Pr (> t)
Intercepto.	134.98	9.59	14.08	<0.0001
Concentración bacteriana (Logaritmo).	-14.91	1.30	-11.50	<0.0001
Tipo de Inmersión. Baseline (Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo).	-81.8	9.95	-8.22	<0.00001
Condiciones de Recambio. Baseline (Recambio a las 4, 8 o 12 horas post-infección).	47.58	6.74	7.06	<0.001
Interacción entre concentración bacteriana y tipo de inmersión.	8.47	1.42	5.97	<0.0001
Interacción entre concentración bacteriana y condiciones de recambio.	-8.42	1.35	-6.23	<0.0001

Evaluando los estimados para las distintas variables que explicaron significativamente a la supervivencia acumulada a las 48 horas, se obtiene que dos combinaciones de las variables explicativas son las que predicen un rango de supervivencia cercano al 50% (Tabla 10). Según el modelo una infección experimental con una sola inoculación directa a los tanques de cultivo de 10^3 UFC/mL y recambiando a las 24 h post-infección o sin recambio durante las 48 horas predice en promedio una supervivencia acumulada de 45.5% (Mortalidad del 54.5%). Mientras que, una sola inoculación directa a los tanques de cultivo de 10^4 UFC/mL y recambiando ya sea a las 4, 8 o 12 h post-infección, durante las 48 horas de experimentación, predice en promedio una supervivencia acumulada de 62.8% (Mortalidad 37.2%).



Tabla 10.

Supervivencias acumuladas a las 48 h que predicen un rango de supervivencias cercano al 50%, según el modelo de regresión múltiple mostrado en Tabla 8.

Concentración bacteriana (UFC/mL)	Tipo de inmersión	Condiciones de recambio	Supervivencia acumulada (%)
10 ³	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	Recambio a las 24 horas post-infección o sin recambio	45.5
10 ⁴	Una sola inoculación directa a los tanques de cultivo	Recambio a las 4, 8 o 12 horas post-infección	62.8

Análisis Microbiológico

Los resultados del análisis de microbiología realizado a las post-larvas para cada desafío son mostrados en la Tabla 11 y evidencian que las post-larvas presentaron una alta concentración bacteriana al inicio de los experimentos. Sin embargo, ninguno de los controles negativos de los cinco experimentos presentaron mortalidades, exhibiendo 100% de supervivencia (Figuras 10 - 14).

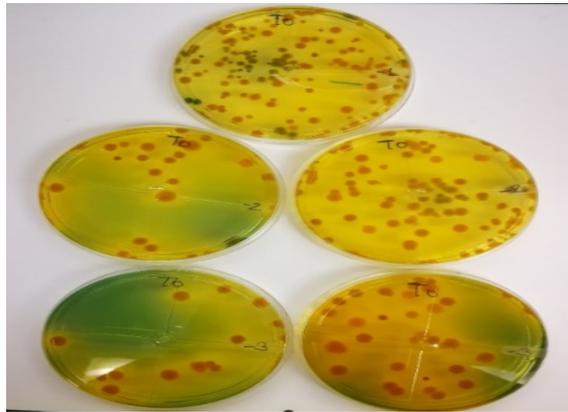
Tabla 11.

Resultados del análisis microbiológico (siembra en dos agares: TCBS y Agar Marino) de post-larvas de camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* realizado a las post-larvas antes de la infección bacteriana para los cinco experimentos del estudio.

No. del experimento	Concentración bacteriana (UFC/mL) en agar marino	Concentración bacteriana (UFC/mL) en agar TCBS
Experimento 1	3.08 x 10 ⁷	1.51 x 10 ⁶
Experimento 2	1.98 x 10 ⁷	6.22 x 10 ⁴
Experimento 3	4.35 x 10 ⁶	2.55 x 10 ⁴
Experimento 4	2.66 x 10 ⁷	1.99 x 10 ⁶
Experimento 5	1.98 x 10 ⁷	6.22 x 10 ⁴

En todos los análisis se observó que todas las colonias bacterianas en agar TCBS presentaron tonalidad amarilla (Figura 15).

Figura 15.

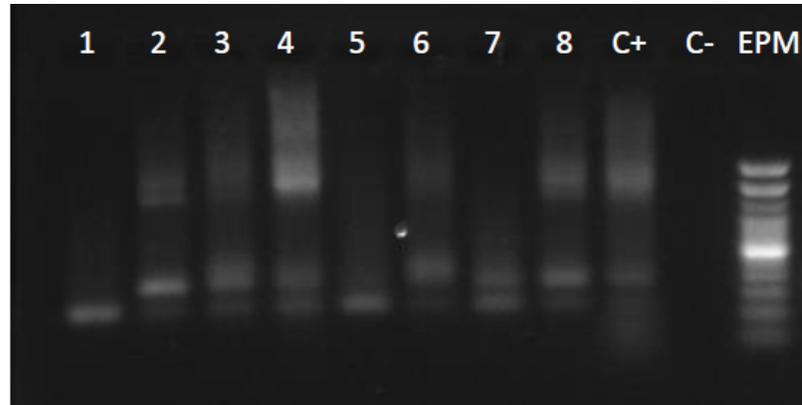


Cajas Petri (agar TCBS) mostrando crecimiento de *Vibrios* detectados en lote inicial de post-larvas antes de la infección bacteriana con *V. parahaemolyticus*.

Análisis de PCR

Los resultados de los análisis de PCR realizados a las post-larvas desafiadas con *V. parahaemolyticus* confirmaron la infección por bacterias causantes de AHPND. Mientras que, las muestras de los controles negativos resultaron negativas. La figura 16, muestra como un ejemplo los resultados del análisis de PCR realizado a los ocho tratamientos del Experimento 5, mostrando la efectividad de la infección bacteriana.

Figura 16.



Verificación de la amplificación de genes codificantes para las toxinas PirA y PirB, en gel de agarosa, utilizando los iniciadores AP4-F1 y AP4-R1 específicos para la detección de AHPND (Sritunyalucksana et al., 2015). Los carriles 1 a 8 corresponden a las muestras de los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 y T8 del Experimento 5. Se muestra los controles, positivo (C+) y negativo (C-). EPM = Estándar de peso molecular (Gene Ruler 100 pb DNA Ladder). Para el control positivo se observa un producto amplificado de 230 pb.

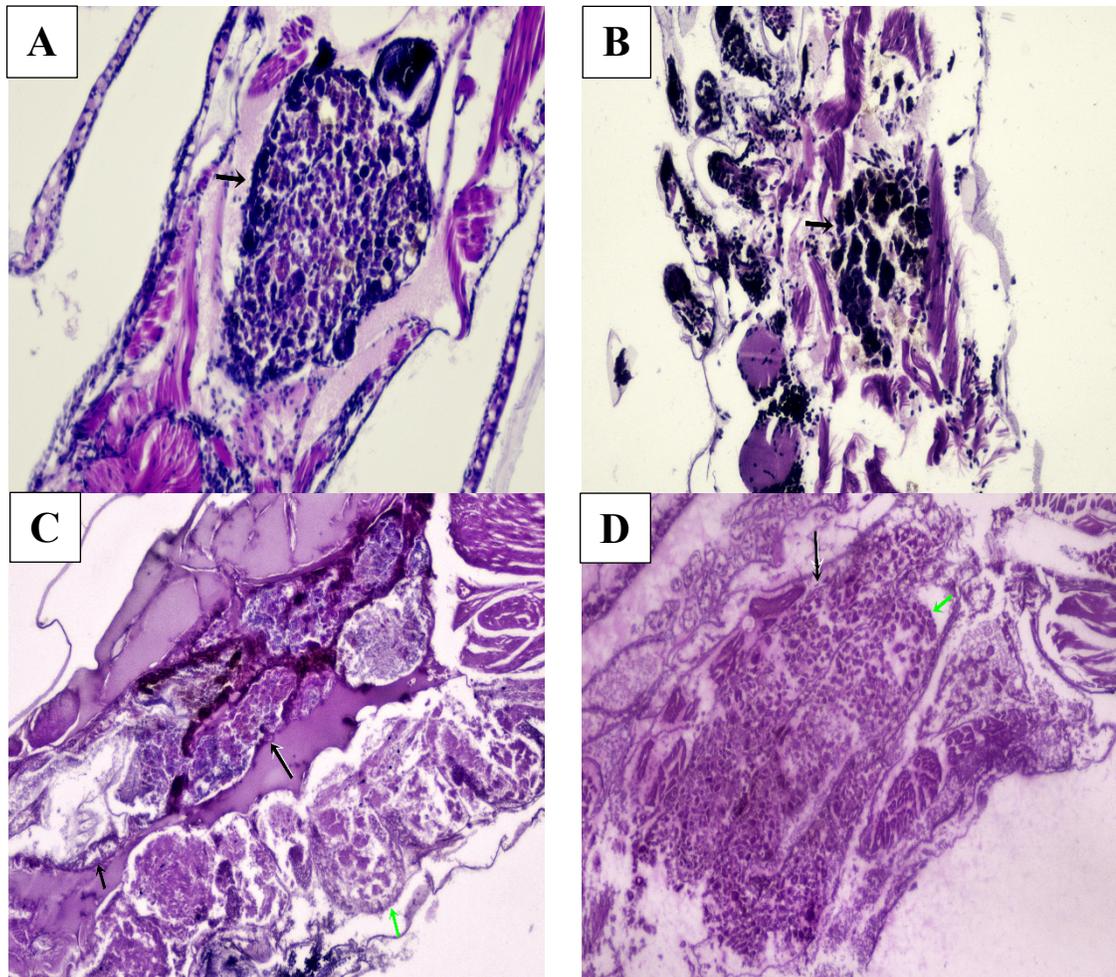
Análisis de Histopatología

Las post-larvas de los lotes iniciales y de los controles negativos no mostraron lesiones histológicas ocasionadas por AHPND (Tablas 12, 15 y 18 del Anexo, Figura 18). Mientras que, las post-larvas moribundas y expuestas al inóculo bacteriano de los distintos tratamientos presentaron afectaciones en diferentes órganos como, necrosis en hepatopáncreas, apéndices bucales, epitelio general del cuerpo, pereiópodos, músculo, estómago, epitelio del intestino e intestino (Tablas 13, 14, 16, 17, 19 y 20). La mayor



afectación se encontró focalizada en el hepatopáncreas, mostrando lesiones compatibles con AHPND, evidenciando la efectividad de las infecciones experimentales (Figura 17). Las lesiones severas por AHPND se presentaron con prevalencias entre el 78% al 100% de post-larvas muestreadas (Tablas 13, 14, 16, 17, 19 y 20). Adicionalmente, se observó infestación bacteriana en grado leve en branquias, pereiópodos, epitelio general del cuerpo y músculo, con una prevalencia máxima del 25%. Se evidenció cianobacterias en los pereiópodos, así como también presencia de bacterias en pereiópodos, intestinos, apéndices bucales, branquias, hepatopáncreas, músculos y cutícula. En tanto que, se observó bacterias filamentosas en los pereiópodos y cutícula.

Figura 17.

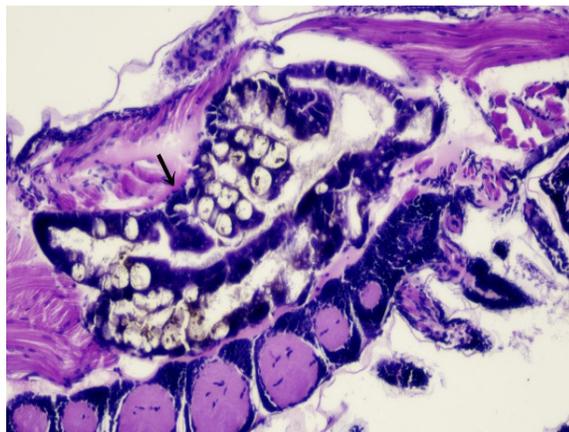


Sección longitudinal de tejidos de post-larvas de camarón *P. vannamei* infectadas con AHPND procesados con hematoxilina y eosina. A y B corresponden a observaciones al microscopio con lente de 4x. C y D corresponden a observaciones al microscopio con lente de 10x. **A.** Experimento 1, Tratamiento T1: inmersión corta de 10^8 UFC/mL + una sola inoculación directa al tanque de cultivo 10^6 UFC/mL. Se observa desprendimiento severo de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas (flecha de color negra) producida por AHPND en fase terminal. **B.** Experimento 1, Tratamiento T2: una sola



inoculación directa al tanque de cultivo 10^6 UFC/mL. Se observa necrosis severa de los túbulos del hepatopáncreas, producida por AHPND en fase terminal, ver flecha de color negra. **C.** Experimento 4, Tratamiento 1 donde se evaluó una sola inoculación directa (10^4 UFC/mL) a los tanques de cultivo con recambio de agua a las 4 h post-infección. Se observa necrosis muy severa de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas (perdida de la estructura normal del hepatopáncreas). Flecha negra grande señala daño producido por AHPND en fase terminal, mostrando necrosis severa del intestino medio (flecha color negra pequeña) y necrosis severa de los pereiópodos (flecha de color verde). **D.** Experimento 4, Tratamiento T7, donde se evaluó una sola inoculación directa (10^6 UFC/mL) a los tanques de cultivo con recambio de agua a las 4 h post-infección. Se observa el desprendimiento masivo de las células de los túbulos del hepatopáncreas (flecha de color negra), producido por AHPND en fase terminal y necrosis severa del epitelio del intestino medio (flecha de color verde).

Figura 18.





Sección longitudinal de tejidos de post-larvas de camarón *P. vannamei* del control negativo (sin exposición bacteriana) procesados con hematoxilina y eosina. Se observan túbulos del hepatopáncreas normales, sin mostrar lesiones histopatológicas. Observación al microscopio con lentes de 10x.



Discusión

En este estudio, la doble inmersión con cultivo bacteriano no afectó significativamente, ni la supervivencia acumulada, ni el tiempo medio de supervivencia de las post-larvas (Experimento 1). El protocolo estándar de desafío con bacterias causantes de AHPND desarrollado por Tran et al. (2013) para juveniles de camarón, y utilizado por otros investigadores (Restrepo et al., 2018), utiliza dos inmersiones, siendo la primera una inmersión corta de 15 min, similar a la que se utilizó en la presente investigación (2 min). Los resultados encontrados en esta tesis muestran que se puede prescindir de esta inmersión corta, lo que implica que, para posteriores pruebas de desafío se puede infectar con una sola inoculación directa a los tanques de cultivo. Además, la inmersión corta puede añadir un factor de estrés a las larvas por efecto de la manipulación, ya que, para el procesamiento de inmersión corta, las larvas son extraídas de las unidades experimentales, colocadas en una navecilla de pesaje de poliestireno conteniendo cultivo a la respectiva concentración bacteriana, permaneciendo por unos minutos en las navecillas, luego transferidas a la respectiva unidad experimental para una segunda exposición bacteriana. Sin embargo, cuando se realizó recambio de agua a las 24 horas post-infección (Experimento 2), las post-larvas que recibieron la doble inoculación bacteriana sobrevivieron significativamente menos tiempo, comparado con las post-larvas que solo recibieron la infección a través de la inoculación directa a los tanques de cultivo. Posiblemente, el recambio añadió un estrés adicional a las post-larvas, adelantando el tiempo medio de supervivencia.

Para conocer si existía un efecto del recambio de agua sobre la supervivencia, se realizó el Experimento 3 donde las post-larvas fueron expuestas a dos protocolos de



recambio (con o sin recambio), lo cual se realizó a diferentes concentraciones bacterianas. Los resultados no mostraron diferencias significativas por efecto del protocolo de recambio, a ninguna de las concentraciones evaluadas, excepto cuando las post-larvas fueron expuestas a la más alta concentración (10^6 UFC/mL), donde la supervivencia de las post-larvas que recibieron recambio de agua a las 24 h fue significativamente inferior comparada con la supervivencia de las post-larvas que no recibieron recambio de agua. Posiblemente, a esa concentración bacteriana alta, el recambio de agua de mar sin bacteria propició la disminución de la mortalidad. En este mismo experimento, si se observó diferencias significativas por efecto de la concentración bacteriana. La concentración bacteriana fue la variable más influyente en la supervivencia de las post-larvas, presentando una relación inversa entre tiempo de supervivencia y concentración bacteriana, lo cual fue observado, tanto para los tratamientos con y sin recambio de agua. Consistentemente, se observó una gran afectación en el hepatopáncreas de las post-larvas desafiadas a altas concentraciones bacterianas.

Para conocer si existía un efecto del tiempo para el primer recambio sobre la supervivencia de las larvas infectadas, se realizó el Experimento 4, para lo cual las post-larvas fueron infectadas a tres concentraciones bacterianas, modificando el tiempo al primer recambio de agua (4, 8 y 12 horas). Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas ni en la supervivencia acumulada ni en el tiempo medio de supervivencia por efecto de los diferentes horarios del primer recambio de agua post-infección, lo cual se observó a cada una de las tres concentraciones bacterianas de infección evaluadas. Estos resultados significan que, para posteriores desafíos, un recambio de agua



intenso (cada 4 u 8 horas) es innecesario, ya que no modifica ni los valores de supervivencia acumulada, ni el tiempo medio de supervivencia. Adicionalmente, y en forma consistente con los resultados encontrados en el Experimento 3, se encontró diferencias significativas tanto para la supervivencia acumulada como para el tiempo medio de supervivencia, por efecto de la concentración bacteriana. Además, se volvió a observar una relación inversa entre concentración bacteriana y tiempo medio de supervivencia, ratificando la gran influencia que tiene la concentración bacteriana de desafío sobre la supervivencia de las post-larvas.

En el Experimento 1 se comprobó que, la doble inmersión con cultivo bacteriano no afectó significativamente, ni la supervivencia acumulada, ni el tiempo medio de supervivencia de las post-larvas. Este experimento se realizó con una inmersión corta de 2 min. Por tanto, el Experimento 5 se ejecutó para investigar si modificando el tiempo de la inmersión corta (1, 2, 3 y 4 min), a dos diferentes concentraciones (10^6 y 10^8 UFC/mL), se obtenía variados niveles de supervivencia acumulada. Los resultados de este experimento no mostraron diferencias significativas entre el tiempo de exposición durante la inmersión corta, excepto un adelanto en la mortalidad cuando los animales fueron expuestos a 4 min de exposición, comparado con la exposición de 1, 2 y 3 min con la inmersión corta, pero esto ocurrió solo con la concentración bacteriana de 10^8 UFC/mL, no ocurriendo a la concentración de infección de 10^6 UFC/mL. Este resultado mostro una vez más que la variable concentración bacteriana es la de mayor influencia sobre la supervivencia de las post-larvas infectadas, por encima de las otras variables estudiadas. Para confirmar esta observación, en este mismo Experimento 5, se volvió a encontrar un efecto significativo



por la concentración bacteriana sobre la supervivencia acumulada y el tiempo medio de sobrevivencia.

La concentración bacteriana fue la variable de mayor relevancia durante las distintas experimentaciones, lo cual se evidenció en los Experimentos 3, 4 y 5 diseñados para el efecto. Los resultados de estos tres experimentos mostraron que la relación dosis-respuesta para la supervivencia de post-larvas de camarón a varias concentraciones de *V. parahaemolyticus* es significativa y además es directa. Por otro lado, el hecho que, tanto para las variables explicativas protocolo de recambio de agua, como para, el tiempo de exposición durante la inmersión corta, se observó efectos solamente a ciertas concentraciones bacterianas, evidenció la presencia de interacciones entre la concentración bacteriana y ambas variables explicativas. Por este motivo, se realizó el análisis de regresión lineal múltiple, donde además de investigar el efecto de estas variables y de la concentración bacteriana sobre la supervivencia acumulada y el tiempo medio de supervivencia, se evaluó el efecto de las interacciones entre las variables mencionadas. Los resultados de los dos modelos de regresión lineal múltiple mostraron que, además de que las tres variables independientes explicaron significativamente a la supervivencia acumulada y al tiempo medio de supervivencia, existía un efecto de las interacciones entre concentración bacteriana/tipo de inmersión y entre concentración bacteriana/condiciones de recambio. Estos resultados demostraron que la hipótesis de que la mortalidad de las post-larvas de camarón infectadas con *V. parahaemolyticus* depende de la concentración bacteriana, tiempo de exposición con el patógeno y protocolo de recambio de agua es verdadera.



Generalmente, las pruebas de desafío con patógenos acuícolas son estandarizadas para obtener supervivencias cercanas al 50%. Esto significa que se busca condiciones de experimentación tales que maten a la mitad de la población, con el fin de probar la eficacia de productos antimicrobianos, ya que, si en el experimento de infección se muere cerca del 100% de la población, no dará oportunidad a observar efectos de potenciales producto antimicrobiano. En esta investigación, se encontró diferentes rangos de mortalidades, en función de los niveles de las variables explicativas incluidas en el estudio. Al respecto, los resultados más relevantes son las combinaciones de las variables explicativas que produjeron una supervivencia alrededor del 50%. Siendo estas combinaciones: a) inoculación directa a los tanques de cultivo de 10^3 UFC/mL y recambiando a las 24 h post-infección o sin recambio durante las 48 horas y b) una sola inoculación directa a los tanques de cultivo de 10^4 UFC/mL y recambiando ya sea a las 4, 8 o 12 h post-infección, durante las 48 horas de experimentación. La presente investigación propone un protocolo de prueba de desafío para post-larvas de camarón *P. vannamei* con bacterias patógenas *V. parahaemolyticus.*, estandarizada para obtener una supervivencia cercana al 50%. Los resultados encontrados en esta investigación son de gran relevancia, ya que, la eficacia de los productos antibacterianos para mitigar una enfermedad bacteriana tan emergente como AHPND debe ser comprobada en condiciones de infección utilizando pruebas de desafío estandarizadas. Este es la primera investigación para estandarizar una prueba de desafío con bacterias causantes de AHPND para post-larvas de camarón. Un protocolo estandarizado de desafío con bacterias causantes de AHPND permitirá evaluar la



efectividad de productos contra la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND para camarón de cultivo.



Conclusiones

Luego de realizados los estudios correspondientes para el presente trabajo se pueden mencionar las siguientes conclusiones:

- La mortalidad de las post-larvas de camarón infectadas con *V. parahaemolyticus* dependió de la concentración bacteriana, tiempo de exposición con el patógeno y protocolo de recambio de agua.
- La doble inmersión con cultivo bacteriano no afectó significativamente, ni la supervivencia acumulada, ni el tiempo medio de supervivencia de las post-larvas.
- Cuando se realizó recambio de agua a las 24 horas post-infección, las post-larvas que recibieron la doble inoculación bacteriana sobrevivieron significativamente menos tiempo, comparado con las post-larvas que solo recibieron la infección a través de la inoculación directa a los tanques de cultivo.
- No se encontró diferencias significativas en la supervivencia por efecto del protocolo de recambio (con o sin recambio a las 24 h), a las concentraciones bacterianas de 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 UFC/mL, excepto cuando las post-larvas fueron expuestas a la más alta concentración (10^6 UFC/mL), donde la supervivencia de las post-larvas que recibieron recambio de agua a las 24 h fue significativamente inferior comparada con la supervivencia de las post-larvas que no recibieron recambio de agua. Este resultado sugiere la presencia de una interacción entre la concentración bacteriana y el protocolo de recambio sobre la supervivencia.
- No se reportó diferencias significativas, ni en la supervivencia acumulada, ni en el tiempo medio de supervivencia por efecto del horario del primer recambio de agua



post-infección (4, 8 y 12 h), lo cual se observó a cada una de las tres concentraciones bacterianas de infección evaluadas (10^4 , 10^5 y 10^6 UFC/mL) encontró diferencias significativas tanto para la supervivencia acumulada como para el tiempo medio de supervivencia, por efecto de la concentración bacteriana.

- La supervivencia de las post-larvas de camarón fue afectada en forma significativa y directa por la concentración bacteriana, lo cual se observó en los Experimentos 3, 4 y 5.
- También se observó una relación inversa entre concentración bacteriana y tiempo medio de supervivencia en estos tres experimentos, ratificando la gran influencia que tiene la concentración bacteriana de desafío sobre la supervivencia de las post-larvas.
- No se observó un efecto significativo en la supervivencia de las post-larvas por el tiempo de exposición durante la inmersión corta (1, 2 y 3 min), excepto un adelanto en la mortalidad cuando los animales fueron expuestos a 4 min de exposición, ocurriendo esto a una concentración bacteriana de 10^8 UFC/mL, y no a 10^6 UFC/mL, evidenciando la presencia de una interacción entre la concentración bacteriana y el protocolo de inmersión sobre la supervivencia.
- Las combinaciones de las variables explicativas que produjeron una supervivencia alrededor del 50% fueron: a) inoculación directa a los tanques de cultivo de 10^3 UFC/mL con recambio a las 24 h post-infección o sin recambio durante las 48 horas y b) una sola inoculación directa a los tanques de cultivo de 10^4 UFC/mL con



INSTITUTO SUPERIOR TECNOLÓGICO
LUIS ARBOLEDA MARTÍNEZ
MANTA – MANABÍ – ECUADOR

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR,
CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

recambiando ya sea a las 4, 8 o 12 h post-infección, durante las 48 horas de experimentación.



Recomendaciones

Se recomienda encontrar una forma de extraer la toxina que se encuentran en las bacterias con el medio de cultivo bacteriano que causa las mortalidades masivas en los cultivos de los camarones, para eliminar una posible mortalidad con el medio de cultivo bacteriano que se utiliza para realizar las inmersiones porque, podría llevar células muertas o metabolitos secundarios.

Los experimentos no deben tener una duración de más de 48 h, porque para una sola persona es muy agotador realizar todos los trabajos en el día y la noche, porque al utilizar varios tratamientos con sus respectivas replicas, no da tiempo suficiente para realizar los muestreos y otros trabajos como los análisis que van de la mano con el tema de tesis.

Tratar en lo posible que las post-larvas provengan de un mismo origen (mismo laboratorio), porque al utilizar animales de otros laboratorios los datos pueden cambiar, ya que cada laboratorio utiliza sus respectivos protocolos de cultivos y por ende utilizan diferentes productos para tener éxitos en sus cultivos. Además, que las instalaciones se encuentren cerca de donde se van a realizar los experimentos.

Cada vez que se realicen los experimentos con sus respectivas replicas, colocar las unidades experimentales de los controles negativos alejados de los demás tratamientos, para evitar la contaminación cruzada.



Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Proyecto de Investigación de “Biotecnología azul para el fortalecimiento de la industria acuícola ecuatoriana controlando *Vibrios* patógenos” en el marco del programa INÉDITA, financiado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT).



Bibliografía

- Aguirre-Guzmán, G., Ascencio, F., & Saulnier, D. (2005). Pathogenicity of *Vibrio penaeicida* for white shrimp *Litopenaeus vannamei*: a cysteine protease-like exotoxin as a virulence factor. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67(3), 201–207. <https://doi.org/10.3354/dao067201>
- Ahantarig, A., Chantawat, N., Waterfield, N. R., Ffrench-Constant, R., & Kittayapong, P. (2009). PirAB toxin from *Photorhabdus asymbiotica* as a larvicide against dengue vectors. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(13), 4627–4629. <https://doi.org/10.1128/AEM.00221-09>
- Alvarado, P. (2020). *El Comercio*. Obtenido de El Comercio: <https://www.elcomercio.com/actualidad/camaron-record-ecuador-exportacion-economia.html>
- Arzola, J., Piña, P., Nieves, M., & Medina, M. (2013). Supervivencia de post-larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* a diferentes salinidades y temperaturas. *Revista MVZ Cordoba*, 18, 3618–3625. <https://doi.org/10.21897/rmvz.127>
- Bell T. y Lightner D. (1988). A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Blackburn, M. B., Farrar, R. R., Novak, N. G., & Lawrence, S. D. (2006). Remarkable susceptibility of the diamondback moth (*Plutella xylostella*) to ingestion of Pir toxins from *Photorhabdus luminescens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121(1), 31–37. <https://doi.org/10.1111/j.1570-8703.2006.00457.x>
- Burge, E. J., Madigan, D. J., Burnett, L. E., & Burnett, K. G. (2007). Lysozyme gene



- expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22(4), 327–339.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.004>
- Chen, F. R., Liu, P. C., & Lee, K. K. (2000). Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zeitschrift Fur Naturforschung C Journal of Biosciences*, 55(1–2), 94–99.
<https://doi.org/10.1515/znc-2000-1-218>
- CNA. (2020). *AQUACULTURA #138* by *REVISTA AQUACULTURA - Cámara Nacional de Acuicultura - issuu*. *REVISTA AQUACULTURA*. https://issuu.com/revista-cna/docs/edicion138_final_100
- CNA. (2021). *AQUACULTURA #143* by *REVISTA AQUACULTURA - Cámara Nacional de Acuicultura - issuu*. *REVISTA AQUACULTURA*. https://issuu.com/revista-cna/docs/edicion143_100
- Cuéllar-Anjel, J. (2013a). Tipos de Vibriosis.
<https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- Cuéllar- Anjel, J. (2013b). Síndrome de mortalidad temprana (EMS). *Institute for International Cooperation in Animal Biologics*, 1, 1–7.
<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/acute-hepatopancreatic-necrosis-disease-es.pdf>
- Decamp, O., Moriarty, D. J., & Lavens, P. (2008). Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research*, 39(4), 334–338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01664.x>



- Dhar, A. K., Piamsomboon, P., Caro, L. F. A., Kanrar, S., Adami Jr, R., & Juan, Y. S. (2019). First report of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) occurring in the USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 132(3), 241–247. <https://doi.org/10.3354/dao03330>
- Domínguez-Borbor, C., Betancourt, I., Panchana, F., Sonnenholzner, S., & Bayot, B. (2019). An effective white spot syndrome virus challenge test for cultured shrimp using different biomass of the infected papilla. *MethodsX*, 6, 1617–1626. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.07.007>
- Dong, X., Bi, D., Wang, H., Zou, P., Xie, G., Wan, X., Yang, Q., Zhu, Y., Chen, M., Guo, C., Liu, Z., Wang, W., & Huang, J. (2017). pirABvp-bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* pathogens isolated from the Same AHPND-affected pond possess highly similar pathogenic plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 8(1859), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01859>
- FAO, F. (2013). Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam, 25-27 June 2013. In *FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053*, 54. <https://www.fao.org/3/i3422e/i3422e00.htm>
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., Lozano, R., & Betancourt-Lozano, M. (2014). Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announcements*, 2(2), 1. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00055-14>



- Gomez-Jimenez, S., Noriega-Orozco, L., Sotelo-Mundo, R. R., Cantu-Robles, V. A., Cobian-Guemes, A. G., Cota-Verdugo, R. G., Gamez-Alejo, L. A., Del Pozo-Yauner, L., Guevara-Hernandez, E., Garcia-Orozco, K. D., Lopez-Zavala, A. A., & Ochoa-Leyva, A. (2014). High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. *Genome Announcements*, 2(4), 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00800-14>
- Han, J. E., Tang, K. F. J., Aranguren, L. F., & Piamsomboon, P. (2017). Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, pirABvp (-) *V. parahaemolyticus*, and pirABvp (+) *V. campbellii* strains. *Aquaculture*, 470, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.022>
- Han, J. E., Tang, K. F., Tran, L., & Lightner, D. V. (2015). Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 113(1), 33–40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>
- Hong, X. P., Xu, D., Zhuo, Y., Liu, H. Q., & Lu, L. Q. (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* (Boone). *Journal of Fish Diseases*, 39(9), 1085–1097. <https://doi.org/10.1111/jfd.12441>
- Ishimaru, K., Akagawa-Matsushita, M., & Muroga, K. (1995). *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). *International Journal of Systematic Bacteriology and Evolutionary Microbiology*, 45(1), 134–138.



<https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-134>

- Joshi, J., Srisala, J., Sakaew, W., Prachumwat, A., Sritunyaluksana, K., Flegel, T. W., & Thitamadee, S. (2014). Identification of bacterial agent (s) for acute hepatopancreatic necrosis syndrome, a new emerging shrimp disease. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 21(4), 315–320.
<https://thaiscience.info/Journals/Article/SJST/10966641.pdf>
- Kaneko, T., & Colwell, R. R. (1973). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake bay. *Journal of Bacteriology*, 113(1), 24–32. <https://doi.org/10.1128/jb.113.1.24-32.1973>
- Kondo, H., Tinwongger, S., Proespraiwong, P., Mavichak, R., Unajak, S., Nozaki, R., & Hirono, I. (2014). Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announcements*, 2(2), 1–2.
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00221-14>
- Kondo, H., Van, P. T., Dang, L. T., & Hiromo, I. (2015). Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis diseased strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announcements*, 3(5), 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00978-15.Copyright>
- Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Huang, M. F., Lin, S. J., Chen, C. Y., Lin, S. S., Lightner, D. V., Wang, H. C., Wang, A. H. J., Wang, H. C., Hor, L. I., & Lo, C. F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a



- deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), 10798–10803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517100112>
- Leobert, D., Cabillon, N. A. R., Catedral, D. D., Amar, E. C., Usero, R. C., Monotilla, W. D., Calpe, A. T., Fernandez, D. D. G., & Saloma, C. P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Diseases of Aquatic Organisms*, 116(3), 251–254. <https://doi.org/10.3354/dao02919>
- Liu, L., Xiao, J., Xia, X., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2015). Draft genome sequence of *Vibrio owensii* strain SH-14, which causes shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease. *Genome Announcements*, 3(6), 1. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01395-15.Copyright>
- McCarter, L. (1999). The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1), 51-57. <https://www.caister.com/backlist/jmmb/v/v1/v1n1/08.pdf>
- Morales-Covarrubias, M.S. y Gómez-Gil, B. 2014. Enfermedades Bacterianas. p. 167-194. En: Morales, V. y J. Cuellar-Anjel (eds.). 2014. Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Peneidos. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.
- NACA. (2012). Asia Pacific Emergency regional Consultation on the Emerging Shrimp Disease: Early Mortality Syndrome (EMS)/ Acute Hepatopancreatic Necrosis syndrome (AHPNS). 9-10 August 2012. Published by Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific. Bangkok, Thailand. August 2012. <https://www.google.com/search?sxsrf=AOaemvI6A8zfayitFHBgpz6mcyYoRZ5a>



Cg:1639511475222&q=NACA.+(2012).+Asia+Pacific+Emergency+regional+Co
nsultation+on+the+Emerging+Shrimp+Disease:+Early+Mortality+Syndrome+(E
MS)/+Acute+Hepatopancreatic+Necrosis+syndrome+(HAPPENS).+9-
10+August+2012.+Published+by+Network+of+Aquaculture+Centres+in+Asia-
Pacific.+Bangkok,+Thailand.+August+2012.&spell=1&sa=X&ved=2ahUKEwi0s
teYiOT0AhWOQTABHS6EDocQBSgAegQIARA1&biw=1517&bih=694&dpr=
0.9

Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 111(1), 81–86. <https://doi.org/10.3354/dao02776>

Phiwsaiya, K., Charoensapsri, W., Taengphu, S., Dong, H. T., Sangsuriya, P., Nguyen, G. T., Pham, H. Q., Amparyup, P., Sritunyaluksana, K., Taengchaiyaphum, S., Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Sithigorngul, P., & Senapin, S. (2017). A natural *Vibrio parahaemolyticus* Δ pirAVp pirBVp+ mutant kills shrimp but produces neither PirVp toxins nor acute hepatopancreatic necrosis disease lesions. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(16), 1–44. <https://doi.org/10.1128/AEM.00680-17>

Rendón, L., & Balcázar, J. L. (2016). Inmunología de camarones: conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, (19). <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/256/244>

Restrepo, L., Bayot, B., Arciniegas, S., Bajaña, L., Betancourt, I., Panchana, F., & Muñoz, A. R. (2018). PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species



- (*Vibrio punensis*) within the commensal *Orientalis* clade. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30903-x>
- Restrepo, L., Bayot, B., Betancourt, I., & Pinzón, A. (2016). Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* strain Ba94C2, associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from South America. *Genomics Data*, 9, 143–144. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.08.008>
- Robertson, P. A. W., Calderón, J., Carrera, L., Stark, J. R., Zherdmant, M., & Austin, B. (1998). Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32(2), 151-155. <https://www.int-res.com/articles/dao/32/d032p151.pdf>
- Sotomayor, M. A., Reyes, J. K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. *PLoS ONE*, 14(1), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478>
- Soto-Rodríguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., & Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1689–1699. <https://doi.org/10.1128/AEM.03610-14>
- Sritunyalucksana, K., Dangtip, S., Sanguanrut, P., Sirikharín, R., Taengchaiyaphum, S.,



- Thitamadee, S., Mavichak, R., Proespraiwong, P., & Flegel, T. W. (2015). A two-tube, nested PCR detection method for AHPND bacteria. *Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand: Https://Enaca. Org, 1*, 1–4. <https://enaca.org/publications/health/disease-cards/ap4-pcr-detection-method-announcement-final%202014-02-19.pdf>
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P. V., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W., & Itsathitphaisarn, O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture, 452*, 69–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.028>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms, 105*(1), 45–55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>
- Trujillo, E. A. (2016). *Neutralización de las toxinas PirA y PirB de Vibrio parahaemolyticus asociado a AHPND con fragmentos de anticuerpos desplegados en fagos*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33482.98243>
- Varela-Mejías, A., Peña-Navarro, N., & Aranguren-Caro, L. F. (2017). Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*. *Agronomía Mesoamericana, 28*(3), 735-745. <http://dx.doi.org/10.15517/ma.v28i3.27788>
- Vandenbergh, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., ... & Swings, J. (1999). Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and*



Environmental Microbiology, 65(6), 2592-2597.

<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.65.6.2592-2597.1999>

Yang, Y. T., Chen, I. T., Lee, C. T., Chen, C. Y., Lin, S. S., Hor, L. I., Tseng, T. C., Huang, Y. T., Sritunyaluksana, K., Thitamadee, S., Wang, H. C., & Lo, C. F. (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announcements*, 2(5), 1–2.

<https://doi.org/10.1128/genomeA.00816-14.Copyright>

Zorriehzahra, M. J., & Banaederakhshan, R. (2015). Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 3(2), 64–72.

<https://doi.org/10.1558/ecot.2005.10.2.250>



Anexos

Resultados del análisis histopatológico. Valores en el denominador corresponde al porcentaje de post-larvas afectadas en la muestra, mientras que el valor en el numerador corresponde al grado de afectación, categorizado como: muy leve (1), leve (2), medio (3) o severo (4).

Tabla 12.

Resultados del Experimento 1. Post-larvas del lote inicial

Hallazgo histopatológico	Apéndices bucales	Branquias	Estómago	Epitelio de estómago	Hepatopáncreas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Pereiópodos	Epitelio intestino	Cutícula	Intestino
AHPND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	2 / 39	0	2 / 6	0	2 / 22	0	0
Cianobacterias	3 / 11	0	0	0	0	0	0	3 / 67	0	0	0

Tabla 13.

Resultados del Experimento 1. Post-larvas moribundas del Tratamiento 1 (inmersión corta 2 min 10^8 UFC/mL y una sola inoculación directa a los tanques de cultivo 10^6 UFC/mL)

Hallazgo histopatológico	Apéndices bucales	Branquias	Estómago	Epitelio de estómago	Hepatopáncreas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Pereiópodos	Epitelio intestino	Cutícula	Intestino
AHPND	0	0	0	0	4 / 86	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	2 / 7	0	0	0	3 / 7	0	0
Infección bacteriana	0	4 / 14	0	0	0	0	0	1 / 7	0	0	0
Cianobacterias	0	0	0	0	0	0	0	3 / 36	0	0	0



Tabla 14.

Resultados del Experimento 1. Post-larvas moribundas del Tratamiento 2 (una sola inoculación directa a los tanques de cultivo 10^6 UFC/mL)

Hallazgo histopatológico	Apéndices bucales	Branquias	Estómago	Epitelio de estómago	Hepatopáncreas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Pereiópodos	Epitelio intestino	Cutícula	Intestino
AHPND	0	0	0	0	4 / 83	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	3 / 17	0	4 / 42	0	3 / 8
Infección bacteriana	0	0	0	0	0	2 / 7	4 / 8	2 / 25	0	0	0
Cianobacteria	0	0	0	0	0	0	0	3 / 8	0	0	0
Bacterias	0	0	0	0	0	0	0	4 / 8	0	0	4 / 42
Bacteria filamentosas	0	0	0	0	0	0	0	3 / 17	0	0	0

Tabla 15.

Resultados del Experimento 3. Post-larvas del control negativo (sin exposición bacteriana)

Hallazgo histopatológico	Apéndices bucales	Branquias	Estómago	Epitelio de estómago	Hepatopáncreas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Pereiópodos	Epitelio intestino	Cutícula	Intestino
AHPND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	3/7	0	0
Bacterias	0	0	2/7	0	0	0	0	3/7	0	0	0
Bacterias filamentosas	0	0	0	0	0	0	0	2/20	0	2/7	0



Tabla 18.

Resultados del Experimento 4. Post-larvas del control negativo (sin exposición bacteriana)

Hallazgo histopatológico	Apéndices bucales	Branquias	Estómago	Epitelio de estomago	Hepatopáncreas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Pereiópodos	Epitelio intestino	Cutícula	Intestino
AHPND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	2 / 7	0	2 / 7	0	0	0	0
Infección bacteriana	0	0	0	0	2 / 7	2 / 7	0	2 / 13	0	0	0
Bacterias	0	0	3 / 7	0	0	0	0	0	0	0	2 / 7

Tabla 19.

Resultados del Experimento 4. Post-larvas moribundas del Tratamiento 1 con recambio de agua 4 h post-infección (una sola inoculación directa a los tanques de cultivo 10^4 UFC/mL)

Hallazgo histopatológico	Apéndices bucales	Branquias	Estómago	Epitelio de estomago	Hepatopáncreas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Pereiópodos	Epitelio intestino	Cutícula	Intestino
AHPND	0	0	0	0	4/100	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	2/8	3/15	3/54	4/46	3/8	0	0
Infección bacteriana	0	0	0	0	0	0	0	3/23	0	0	0
Bacteria	0	0	0	0	0	0	0	3/8	0	3/15	4/15
Bacteria filamentosas	0	0	0	0	0	0	0	3/15	0	0	0

