

Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio* sp. en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)

Thianny Trujillo, Gabriel Aguirre-Guzmán*, J. Genaro Sánchez & Jaime Rábago-Castro

Resumen

Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio* sp. en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). Las enfermedades de origen bacteriano constituyen un importante factor que afecta a la industria camaronícola y la calidad del producto. El estudio de los daños que causan las bacterias en los organismos acuáticos es importante para establecer alternativas que ayuden a prevenir y/o controlar las enfermedades generadas por las mismas. La patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio* sp., especies aisladas de camarones infectados naturalmente, fue evaluada mediante la exposición experimental de juveniles (4-7 g de peso) de *Litopenaeus vannamei* por inmersión (a una dosis de 10^6 ufc ml^{-1}). Los camarones expuestos mostraron signos de necrosis en apéndices, letargo, tracto intestinal vacío y muerte solo hasta las 240 h post-exposición. Los organismos expuestos a *Vibrio* sp. tuvieron una mortalidad significativamente ($p < 0.05$) mayor (45%) que los expuestos con *V. parahaemolyticus* (7%), los cuales no presentaron una mortalidad significativamente diferente ($p > 0.05$) comparada con el grupo control. Los organismos expuestos a *Vibrio* sp. mostraron necrosis branquial, además de un aparente mayor número de

Abstract

Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio* sp. in juveniles of the Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). Bacterial diseases are important factor that affect the shrimp culture industry and product quality. The study of the effect of bacteria on aquatic organisms is important tools to prevent and control the diseases produced by these microorganisms. The pathogenicity of *Vibrio* sp. and *V. parahaemolyticus*, isolated from shrimp diseased, was experimentally assessed on *Litopenaeus vannamei* (4-7 g of weight) by immersion technique (10^6 cfu ml^{-1} of doses). Diseases signs as necrosis on appendices, lethargy, low feeding, and mortality were observed on infected organisms after 240 h post-exposed. The exposed shrimp with *Vibrio* sp. showed a significant ($p < 0.05$) higher mortality (45%) than shrimp with *V. parahaemolyticus* (7%), which showed not significant difference compared to control group ($p > 0.05$). Exposed organisms with *Vibrio* sp. showed gill necrosis and a high hemocytes number on muscle tissue, which were not observed on

Résumé

Pathogénicité des *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio* sp. en juvéniles de crevette blanche du Pacifique (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). Les maladies d'origine bactérienne constituent un facteur important qui affecte l'industrie de la culture de crevettes et la qualité du produit. L'étude des dégâts causés par les bactéries dans les organismes aquatiques est importante pour établir des alternatives qui aideront la prévention et le contrôle des maladies produites par les mêmes. La virulence de *Vibrio* sp. et *V. parahaemolyticus*, espèces isolées de crevettes infectés naturellement, fut évaluée par l'exposition expérimentale de juvéniles (4-7 g de poids) de *Litopenaeus vannamei* par immersion (avec un dosage de 10^6 ufc ml^{-1}). Les crevettes exposées ont montré des signes de nécrose aux appendices, léthargie, tract intestinal vide et mort jusqu'à 240 h post exposition. Les organismes exposés à *Vibrio* sp. ont eu une mortalité significativement ($p < 0.05$) supérieure (45%) à celle des crevettes exposées à *V. parahaemolyticus* (7%), lesquelles n'ont pas présenté une mortalité significativement différente à celle du groupe contrôle. Les organismes exposés à *Vibrio* sp.

hemocitos en el músculo. Estos signos de enfermedad no se detectaron en los cortes histológicos de los organismos expuestos a *V. parahaemolyticus*, ni en los del grupo control. Los resultados muestran una mayor patogenicidad de *Vibrio sp.* comparada con *V. parahaemolyticus*. Con base en las observaciones histológicas, se sugiere que las branquias pueden ser una posible ruta de entrada de las bacterias hacia el interior del camarón.

Palabras claves: Acuicultura, bioensayo, exposición *in vivo*, histología, patógenos.

control group and exposed shrimp with *V. parahaemolyticus*. The result exposed in this work showed a high pathogenicity of *Vibrio sp.* compared to *V. parahaemolyticus* and the histological results suggest as a possible entry route of the bacteria to shrimp through affected gill.

Key words: Aquaculture, bioassay, exposition *in vivo*, histology, pathogens.

ont montré une nécrose branchiale, en plus d'un incrément apparent d'hémocytes dans le muscle. Ces signes de maladie n'ont pas été détectés dans les organismes exposés à *V. parahaemolyticus*, ni dans le groupe contrôle. Les résultats montrent qu'il y a une pathogenèse majeure de *Vibrio sp.* comparé avec *V. parahaemolyticus*, et suggèrent que les branchies peuvent être une route possible d'entrée des bactéries vers l'intérieur de la crevette.

Mots clefs: Aquaculture, bioessai, exposition *in vivo*, histologie, pathogènes.

Introducción

Litopenaeus vannamei y *L. stylirostris* son las principales especies de camarón cultivadas en México, con una producción cercana a las 24,000 t en el 2001 (Anónimo 2002). El cultivo de camarón crea condiciones artificiales en el ambiente que favorecen la selección, adaptación y crecimiento de comunidades bacterianas que son parte de la flora normal de los organismos acuáticos. Estas comunidades no representan un riesgo para los organismos a menos que éstos se encuentren estresados, débiles y/o inmunodeprimidos (Wang & Leung 2000). Los camarones pueden acumular diversas especies de bacterias en su tracto intestinal, branquias y exoesqueleto (Jiravanichpaisal *et al.* 1994). Los vibrios, uno de los géneros que conforman esta microbiota, son microorganismos oportunistas que responden a los cambios en las condiciones ambientales provocadas por la acuicultura, llegando a tener características tóxicas y patogénicas para los camarones.

Las especies del género *Vibrio* han sido reportadas como la causa de serias pérdidas económicas en la producción de camarón de cultivo en diversos países (Aguirre-Guzmán 2004). La mortalidad de camarón originada por este grupo de bacterias puede variar desde

intervalos insignificantes hasta presentar mortalidades del 100%, afectando principalmente a las postlarvas y juveniles. Los signos clínicos presentes durante una vibriosis son necrosis, septicemia, opacidad de los músculos, falta de apetito y/o tracto intestinal vacío, debilidad, malformaciones y melanización (Jiravanichpaisal *et al.* 1994, Lightner 1996, Aguirre-Guzmán & Ascencio 2000, Smith *et al.* 2000, Sotomayor & Balcazar 2003).

Diversas investigaciones muestran que existe una gran variedad en términos de patogenicidad originada por las cepas de *Vibrio sp.* sobre camarón y otros organismos marinos. Por ejemplo, *V. penaeicida* y *V. harveyi* generan altas mortalidades en larvas, postlarvas y juveniles de *Penaeus monodon*, *Marsupenaeus japonicus*, *Litopenaeus stylirostris* y *L. vannamei* (Karunasagar *et al.* 1994, Goarant *et al.* 1998, Robertson *et al.* 1998, Saulnier *et al.* 2000, Aguirre-Guzmán *et al.* 2001). Lee *et al.* (1996) encontraron resultados similares con una cepa patogénica de *V. alginolyticus* aislada a partir de camarones enfermos de *P. monodon*, mientras que Alapide-Tendencia & Dureza (1997) muestran que *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* fueron las principales bacterias relacionadas con el síndrome de la enfermedad roja que afectó a juveniles de *P. monodon*. Este trastorno se presentó cuando las

dosis de infección bacteriana fueron de 10^5 y 10^5 - 10^7 ufc ml^{-1} , respectivamente (ufc= unidades formadoras de colonias). Sudheesh & Xu (2001) encontraron una alta patogenicidad generada por *V. parahaemolyticus*, cepa 25C, sobre camarones juveniles de *P. monodon*, presentando un valor de dosis letal media (DL_{50}) de 10^5 ufc ml^{-1} .

El presente trabajo evaluó la resistencia de juveniles de camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, hacia dos especies de *Vibrio* aisladas de camarones enfermos (*V. parahaemolyticus* y *Vibrio* sp.) a una dosis de exposición de 10^6 ufc ml^{-1} , registrando además sus efectos en diversos tejidos del camarón. Estos estudios permitieron determinar la patogénesis originada por estos agentes bacterianos y su posible ruta de entrada, lo cual puede brindar información que favorezca el establecimiento de estrategias de control de las enfermedades.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

La cepa de *Vibrio parahaemolyticus* (HL57) fue proporcionada por la colección de microorganismos de importancia para la acuicultura a cargo del Centro de Investigaciones en Alimentos y Desarrollo, A.C. (CIAD), unidad Mazatlán. La cepa de *Vibrio* sp. (LS1) fue donada por el programa de maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Las cepas se activaron en agar Luria-Bertani (LB) salino (bacto triptosa 1%, extracto de levadura 0.5%, agar 2%, cloruro de sodio 3%, pH 7) incubándose a 37°C durante 24 h. Las colonias bacterianas fueron transferidas a tubos de ensayo de 10 ml con solución salina estéril al 0.85% hasta obtener un valor de absorbancia de 1 a 540 nm (espectrofotómetro Milton Roy 21D) correspondiente a una biomasa celular de 10^9 ufc ml^{-1} (Aguirre-Guzmán *et al.* 2001). Esta suspensión bacteriana fue usada como base para obtener una dosis de 10^6 ufc ml^{-1} que se

usó en los camarones mediante un baño de inmersión (Aguirre-Guzmán *et al.* 2001).

Animales experimentales

Se utilizaron camarones juveniles *L. vannamei* (4-7 g de peso) provenientes de la granja Vista Hermosa, ubicada en Soto la Marina, Tamaulipas. Quinientos organismos fueron transportados en un contenedor "Rotoplas" (500 l), con 300 l de agua a 22 - 27°C , proveniente del mismo estanque de captura hasta el área de bioensayos en el edificio de diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT). Los camarones se aclimataron por 10 días en un tanque de fibra de vidrio con capacidad para 500 l con aireación, agua marina (27 - 30°C , 35‰ de salinidad) a una tasa de recambio promedio del 100% diario. Los camarones fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial para camarón (33% de proteína, Purina México).

Bioensayo de exposición de camarón

Dos grupos de camarones ($n= 40/\text{grupo}$) fueron expuestos mediante inmersión (2 h) a una dosis de 10^6 ufc ml^{-1} de *V. parahaemolyticus* o *Vibrio* sp., respectivamente, en 20 l de agua marina. Posteriormente, los animales de cada grupo se distribuyeron al azar en acuarios de 20 l con agua marina (10 organismos por acuario); las réplicas se distribuyeron en tres bloques con cuatro acuarios cada uno. El grupo control ($n= 40$) fue tratado de manera similar que los grupos expuestos a las bacterias. La tasa de recambio de agua fue del 10%. Los camarones expuestos fueron observados tres veces al día, hasta que aparecieron los primeros signos de la enfermedad. Los animales moribundos (letárgicos, descoloridos, con nado errático y que se quedaban de lado en el fondo) fueron fijados en una solución de AFA Davidson's durante 24 h, posteriormente deshidratados en etanol al 50% para su análisis posterior (Lightner 1996).

La mortalidad de los camarones fue evaluada y su resultado expresado como porcentaje de mortalidad (%) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$1 - \left(\frac{\text{número final de organismos}}{\text{número inicial de organismos}} \right) \times 100$$

El bioensayo se realizó siguiendo las medidas necesarias para evitar la fuga del agente patógeno (Prophet *et al.* 1995).

Histología

El cefalotórax y abdomen de los organismos previamente fijados fueron seleccionados para histología, la cual se realizó por medio del procedimiento descrito por Álvarez *et al.* (2003), en donde el tejido fue embebido en parafina previo a su corte (3-5 μm), montado en portaobjetos, teñido con hematoxilina de Harris y eosina (H & E) y evaluado en un microscopio compuesto. Se observaron branquias, hepatopáncreas y músculo a fin de localizar los daños patológicos originados por las bacterias, de acuerdo a lo descrito por Lightner (1996) y de la Peña *et al.* (2001).

Análisis estadístico

Los valores promedios de mortalidad de cada uno de los grupos y sus réplicas (control, *V. parahaemolyticus* y *Vibrio sp.*) fueron comparados por medio de análisis de varianza de una vía y la prueba de rangos múltiples de Duncan (Brower & Zar 1980), por medio del software Statistica (Aguirre-Guzmán *et al.* 2001).

Resultados

Exposición *in vivo*

Al comparar la mortalidad obtenida por los camarones a lo largo de 240 h de post-exposición (PE) a las cepas experimentales, se observó que los camarones sometidos a *Vibrio sp.* tuvieron una mortalidad significativa mayor ($p < 0.05$) que los expuestos a *V. parahaemolyticus* (45 \pm 20 y 7 \pm 5%, respectivamente). Estos últimos organismos no presentaron una diferencia significativa ($p > 0.05$) comparada con el grupo control. Los camarones que sobrevivieron hasta el final del bioensayo de exposición de *Vibrio sp.*

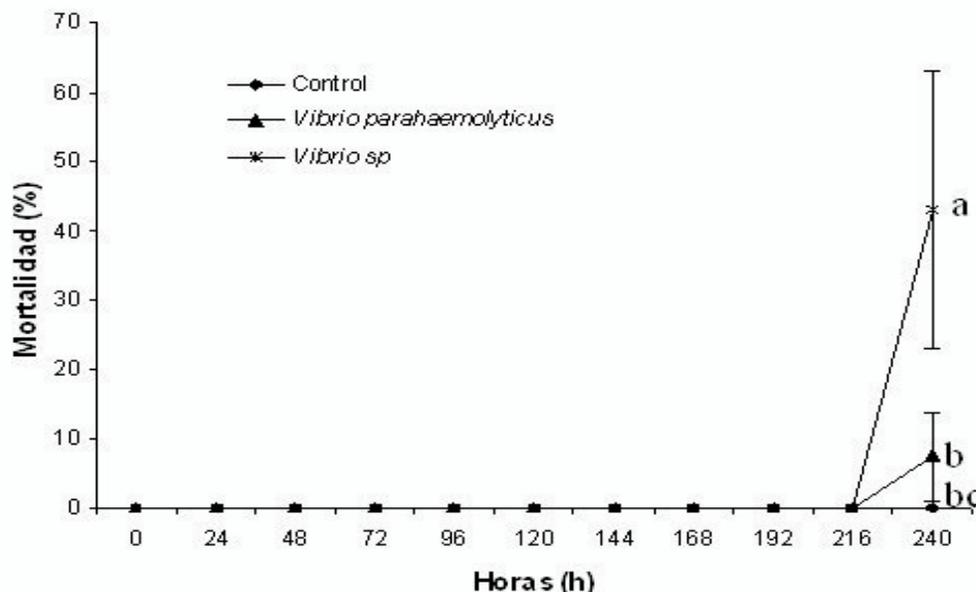


Figura 1. Mortalidad (%) de camarones juveniles (*L. vannamei*) expuestos por inmersión (10^6 ufc ml^{-1}) con *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio sp.* Las diferentes letras (a, b, c) indican los grupos con significancia definida por Duncan ($p < 0.05$).

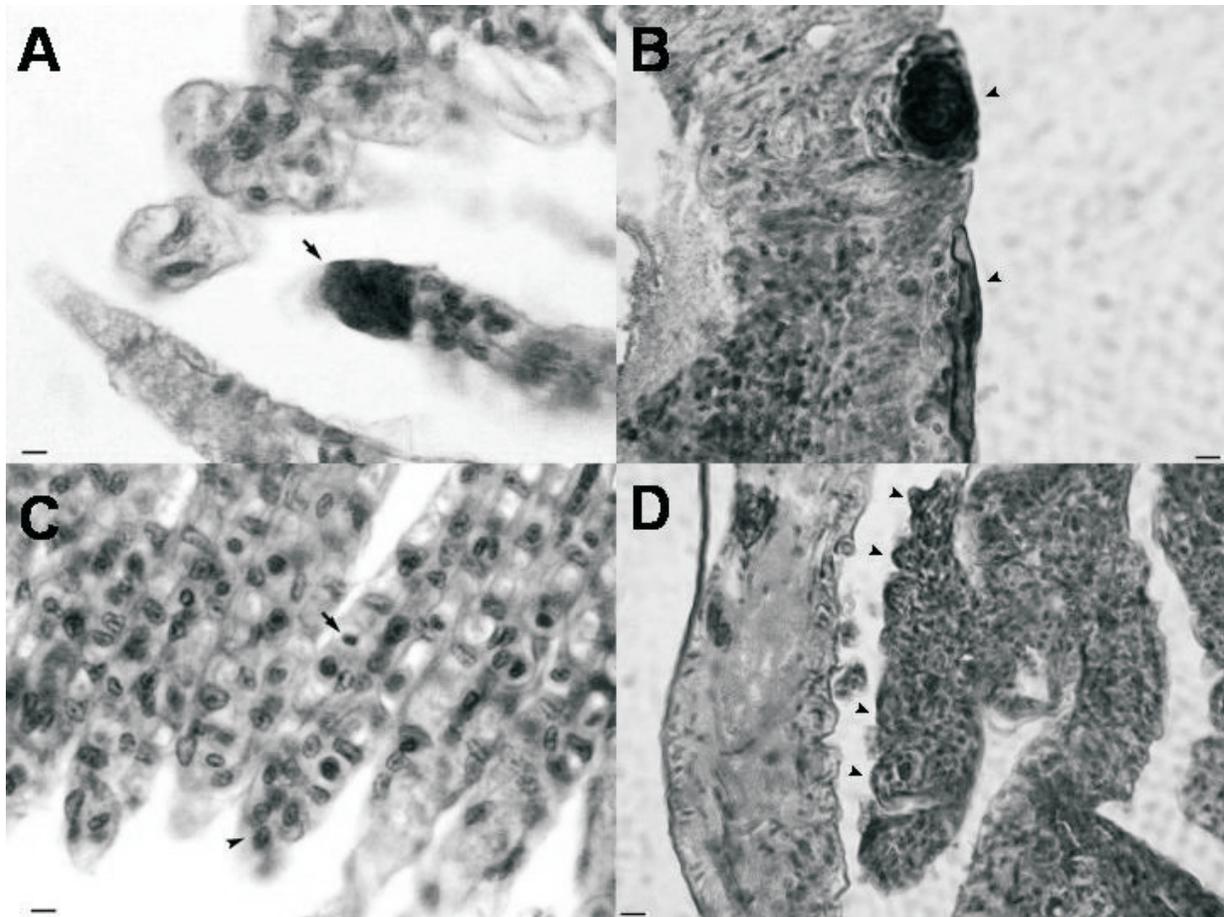


Figura 2. Cortes histológicos (H y E) de las branquias de los camarones moribundos infectados por *Vibrio* sp. Las flechas señalan necrosis branquial (A, B y D) y células de defensa o hemocitos (C). Las barras miden 10 mm (A y C) y 50 mm (B y D).

mostraron signos externos típicos de vibriosis tales como: necrosis en apéndices, letargo y tracto intestinal vacío (Fig. 1).

Histología

La figura 2 muestra las branquias de camarones moribundos expuestos a *Vibrio* sp., observándose tejido dañado tipo necrótico (Figs. A-B, D) y una gran cantidad de células eosinófilas de defensa o hemocitos (Fig. C). De igual forma, un gran número de hemocitos fueron detectados en los cortes histológicos del hepatopáncreas y del músculo (Figs. 3A, 4A-B) de estos organismos. La figura 3B muestra un granuloma detectado en el hepatopáncreas de un camarón expuesto a *Vibrio* sp.; sin embargo, no se detectó una tendencia en el tejido hacia la formación de este tipo de signo.

Los camarones moribundos expuestos a *V. parahaemolyticus* no mostraron los signos de enfermedad señalados en branquias, músculos y hepatopáncreas. Los tejidos correspondientes al grupo control tampoco presentaron signos de enfermedad.

Discusión

La demanda del camarón a nivel mundial ha propiciado la sobreexplotación de este producto en el medio silvestre hasta llegar a sus límites de captura, propiciando el desarrollo y establecimiento de granjas de cultivo con el fin de procurar satisfacer las necesidades del mercado (Aguirre-Guzmán & Ascencio 2000). Sin embargo, el mal manejo de las granjas y el estrés ocasionado en los organismos cultivados por diferentes condiciones bióticas y abióticas

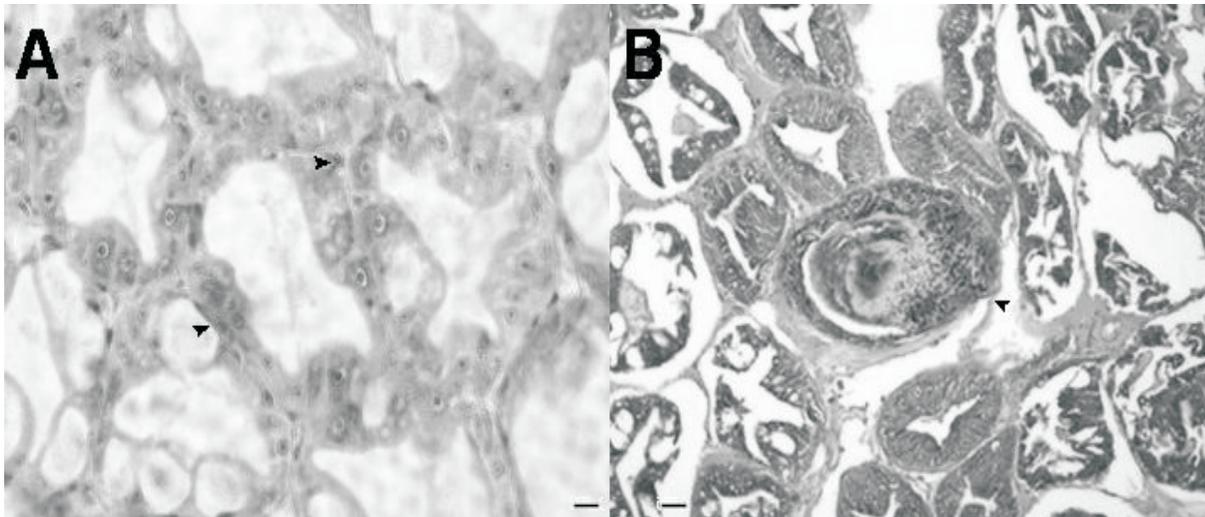


Figura 3. Cortes histológicas (H y E) del hepatopáncreas de los camarones moribundos afectados por *Vibrio* sp. Las flechas muestran células de defensa o hemocitos (A) y granuloma (B). Las barras miden 10 mm.

favorecen el desbalance de la flora bacteriana natural de los estanques, la disminución en la resistencia en los organismos y la aparición de enfermedades originadas por agentes patógenos oportunistas, como las bacterias del género *Vibrio* (Álvarez *et al.* 1998, Tobey *et al.* 1998, Saulnier *et al.* 2000). La vibriosis, nombre común de la enfermedad originada por los vibrios, puede generar una patología muy agresiva que puede desembocar en la muerte de los organismos en 24 horas (Austin *et al.* 1995).

En los estudios de mortalidad realizados en este trabajo los camarones que fueron expuestos a una concentración de 10^6 ufc ml^{-1} de *Vibrio* sp. o *V. parahaemolyticus*, presentaron diferencias significativas en su susceptibilidad a las diferentes cepas de *Vibrio* usadas, lo que sugiere que existen diferencias en la patogenia generada por las diferentes especies y cepas de *Vibrio*. La cepa de *Vibrio* sp. utilizada en la presente investigación generó la muerte de los organismos sólo hasta las 240 h PE, siendo los síntomas de la enfermedad observados desde las 72 h PE. La cepa de *V. parahaemolyticus* (HL57) ha sido utilizada para infectar nauplios y adultos de *Artemia* sp., los cuales presentaron un 100% de mortalidad (Gómez-Gil *et al.* 1998a). Esta cepa generó una mortalidad promedio del 7% en *L. vannamei*, lo que indica que la resistencia a los agentes

patógenos puede estar relacionada con la especie de crustáceo, estadio y edad que se esté empleando. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que las condiciones presentadas durante el bioensayo de laboratorio difieren de las condiciones obtenidas durante el cultivo, haciendo que los signos de las enfermedades puedan presentarse antes o después de lo reportado en este trabajo.

Karunasagar *et al.* (1994) y de la Peña *et al.* (2001) utilizaron concentraciones de *V. harveyi* similares a las usadas en este estudio para infectar juveniles de *Penaeus monodon*, y reportaron mortalidades superiores al 50%. Muroga *et al.* (1994) infectaron con *Vibrio* sp. (10^7 ufc ml^{-1}) larvas de *Marsupenaeus japonicus*, *Artemia* sp. y *Palaemon paucidens*, obteniendo sobrevivencias del 70-100%, lo que sugiere que la dosis bacteriana a la cual los camarones están expuestos puede ser un elemento significativo en términos de la patogenia, tal como lo sugieren Muroga *et al.* (1994), Saulnier *et al.* (2000) y Aguirre-Guzmán *et al.* (2001).

Vibrio alginolyticus, *Photobacterium damsela* (anteriormente *V. damsela*) y *Vibrio* sp. han sido detectadas en el hepatopáncreas de camarones (Gómez-Gil *et al.* 1998b), lo cual sugiere que la posible ruta de entrada de éstos fue a través del tejido dañado del molino

gástrico; mientras que el hepatopáncreas fue el órgano blanco de los vibrios luminiscentes que infectaron a *L. monodon* (Lavilla-Pitogo *et al.* 1998), siendo este tejido en donde pueden presentarse granulomas e infiltraciones hemolíticas originadas por infecciones con *V. harveyi* (Jiravanichpaisal *et al.* 1994, Lavilla-Pitogo *et al.* 1998, Ruangpan *et al.* 1999).

La detección de áreas de necrosis y de una gran actividad hemocítica en tejido branquial (Fig. 2) y la gran cantidad de hemocitos en músculo (Fig. 4) de los camarones expuestos a *Vibrio* sp., sugiere que éste pudo afectar inicialmente al tejido branquial y que a partir del tejido dañado logró penetrar al sistema circulatorio del

camarón y distribuirse hacia el músculo y hepatopáncreas (Figs. 3A, 4A-B). La observación de hemocitos en estos tejidos puede ser la respuesta a la presencia de *Vibrio* sp., tal como lo sugiere Song & Huang (2000). La presencia de un granuloma en el hepatopáncreas (Fig. 3B) no permite vincular este signo con la exposición de *Vibrio* sp. al que estuvo sujeto el camarón, ya que este signo también está relacionado con otros patógenos o trastornos (Lightner 1996).

Vibrio parahaemolyticus parece causar poca morbilidad y mortalidad en *L. vannamei*; sin embargo, la mortalidad asociada a *Vibrio* sp. amerita que esta cepa sea identificada y estudiada con más detalle.

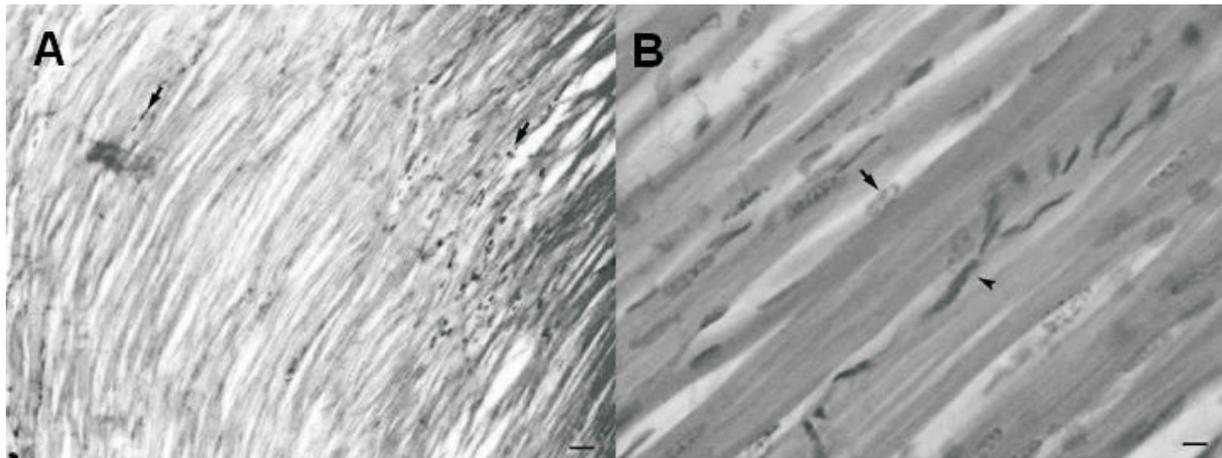


Figura 4. Cortes histológicos (H y E) del músculo de los camarones moribundos afectados por *Vibrio* sp. Las flechas muestran células de defensa o hemocitos (A, B). Las barras miden 50 mm (A) y 10 mm (B).

Agradecimientos

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado de Educación Superior (PROMEP) por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto. A Bruno Gómez-Gil (CIAD, Mazatlán) y a Denis Ricque (FCB, UANL) por la donación de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio* sp., respectivamente. A la granja Vista Hermosa, de Soto La Marina, por los camarones donados. A Ned Iván de la Cruz Hernández y Blanca Lilia Hernández Juárez (FMVZ-UAT) por su ayuda durante el procesamiento del material histológico. A Alejandra Torres Ariño y un revisor anónimo

por sus comentarios y sugerencias al manuscrito previo, así como a Aitor Aizpuru por su revisión del Resumen.

Referencias

- Aguirre-Guzmán, G. 2004. ¿Los *Vibrio* sp., son agente patógeno importante para el cultivo de camarón? Boletín Informativo del Programa Nacional de Sanidad Acuicola, México 1(25): 1-3.
- Aguirre-Guzmán, G. & F. Ascencio. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. pp: 333-348 In Pandalai S.G. (ed.), Recent Research Developments in Microbiology, 4. Research Signpost. Trivandrum 8, India, 430 pp.
- Aguirre-Guzmán, G., R. Vázquez-Juárez & F. Ascencio. 2001. Differences in the susceptibility of American

- white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. J. Invert. Pathol. 78(4):215-219.
- Alapide-Tendencia, E.V. & L.A. Dureza. 1997. Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. Aquaculture 154(2): 105-112.
- Álvarez, J.D., B. Austin, M. Álvarez & H. Reyes. 1998. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimp and fish in Venezuela. J. Fish Dis. 21(4):313-316.
- Álvarez, J.D., C. Agurto, J. Obregorf & L. Peroza. 2003. Detección de *Baculovirus penaei* y de casos de vibrios en *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris* en una granja de la costa occidental de Venezuela. Revista Científica FCV-Luz XIII(4): 255-262.
- Anónimo. 2002. Anuario estadístico de pesca 2001. SEMARNAP, México, 320 pp.
- Austin, B., L.F. Stuckey, P.A.W. Robertson, I. Effendi & D.R.W. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish Dis. 18(2): 93-96.
- Brower, J.E. & J.H. Zar. 1980. Field and laboratory methods for general ecology. Brown Company Publishers, Iowa. 194 pp.
- de la Peña, L.D., C.R. Lavilla-Pitogo & M.G. Paner. 2001. Luminescent vibrios associated with mortality in pond-cultured shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines: species composition. Fish Pathology 36(3):133-138.
- Goarant, C., F. Régnier, R. Brizard & A.L. Marteau. 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. Aquaculture 169(3-4): 291-296.
- Gómez-Gil, B., M. Herrera-Vega, F.A. Abreu-Grobois & A. Roque. 1998a. Bioencapsulation of two different *vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). Appl. Environ. Microbiol. 64(6): 2318-2322.
- Gómez-Gil, B., L. Tron-Mayén, A. Roque, J.F. Turnbull, V. Inglis & A.L. Guerra-Flores. 1998b. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture 163(1-2): 1-9.
- Jiravanichpaisal, P., T. Miyazaki & Limsuwan. 1994. Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. J. Aquat. Anim. Health 61(1): 27-35.
- Karunasagar, I., R. Pai, G.R. Malathi & I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture 128(3-4): 203-209.
- Lavilla-Pitogo, C.R., E.M. Leño & M.G. Paner. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent *Vibrios* in the rearing environment. Aquaculture 164(1-4): 337-349.
- Lee, K.K., S.R. Yu, F.R. Chen, T.I. Yang & P.C. Liu. 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. Current Microbiology 32(4):229-231.
- Lightner, D.V. 1996. Disease of culture penaeid shrimp. pp 1-78 In McVey, J.P. (ed.), Handbook of mariculture. Crustacean Aquaculture. 2a ed. CRC. Press. Boca Raton, Florida, 545 pp.
- Muroga, K., K. Suzuki, K. Ishimaru & K. Nogami. 1994. Vibriosis of swimming crab *Portunus trituberculatus* in larviculture. J. World Aquacult. Soc. 25(1):50-53.
- Prophet, E.B., B. Mill, J.B. Arrington & L.M.D. Sobin. 1995. Manual de métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), 254 pp.
- Robertson, P.A.W., H.S. Xu & B. Austin. 1998. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water. J. Microbiol. Meth. 34(1): 31-39.
- Ruangpan, L., Y. Danayadol, S. Direkbusarakom, S. Siurairatana & T.W. Flegel. 1999. Lethal toxicity of *Vibrio harveyi* to cultivated *Penaeus monodon* induced by a bacteriophage. Dis. Aquatic Org. 35(3): 195-201.
- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy & Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture 191(1-3): 133-144.
- Smith, P.T. 2000. Diseases of the eye of farmed shrimp *Penaeus monodon*. Dis. Aquatic Org. 43(3): 159-173.
- Song Y.L. & C.C. Huang. 2000. Applications of immunostimulant to prevent shrimp diseases. pp 173-187. In Fingerman M., & R. Negabhusanam (eds.). Recent advances in marine biotechnology. Science Publishers Inc., Plymouth, U.K., 392 pp.
- Sotomayor M.A. & J.L. Balcazar. 2003. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. AquaTic 19(2): 9-15.
- Sudheesh, P.S. & H.S. Xu. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. Aquaculture 196(1-2):37-46.
- Tobey, J., J. Clay & P. Vergnem. 1998. Maintaining a balance -The economic, environmental and social impacts of shrimp farming in Latin America. Coastal Management Report, Narragansett, Estados Unidos, 68 pp
- Wang, X.H. & K.Y. Leung. 2000. Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. Microbiology 146(4): 989-998.

Recibido: 16 de junio de 2005.

Aceptado: 26 de octubre de 2005.