



Bacteriología de camarones

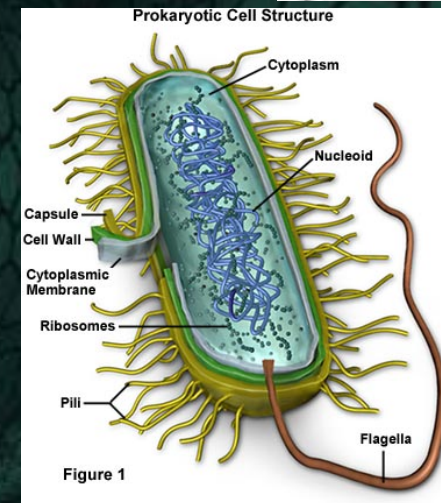
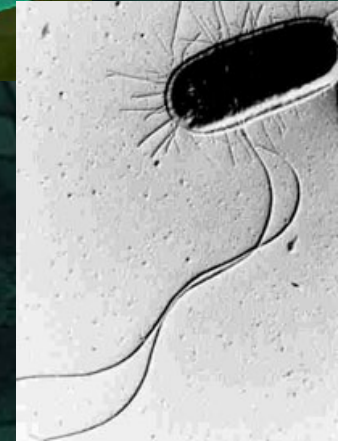
Dr. Bruno Gómez-Gil
Laboratorio de Bacteriología

Contenido

- Vibriosis
- Toma de muestras
- Análisis bacteriológico de organismos
- Determinación de susceptibilidad a antibióticos
- Tratamiento / antibióticos

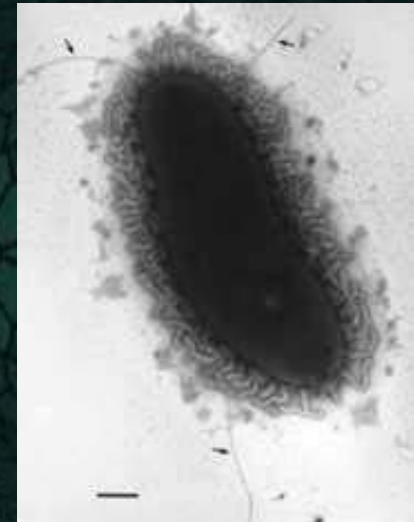
Bacteria

- Organismo unicelular
- Procarionte
- Capáz de replicarse autónomamente
- Varios tipos de alimentación
- Se puede matar o al menos controlar con antibióticos



Vibriosis

Definición general:



"Infección causada por bacterias del género Vibrio"

Las infecciones por vibrios son quizá las enfermedades más comunes en la camaronicultura, debido a que estas bacterias son habitantes naturales del ambiente estuarino-marino.

Tipos de infecciones bacterianas

Lightner (1993)

- Puntos localizados en la cutícula, *black-spot*.
- Infecciones localizadas en el tracto digestivo, hepatopáncreas o heridas
- Septicemia generalizadas (vibriosis, *Syndrome Gaviota*)

Turnbull, et al. 1995

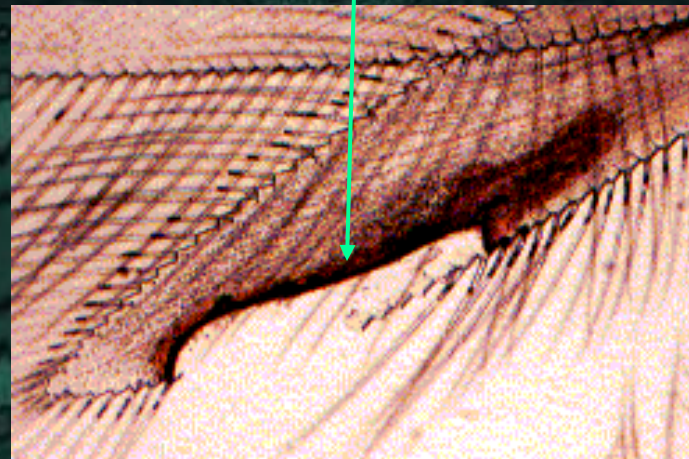
- Vibriosis aguda localizada o sistémica.
- Vibriosis crónica localizada o sistémica.



Vibriosis en la larvicultura

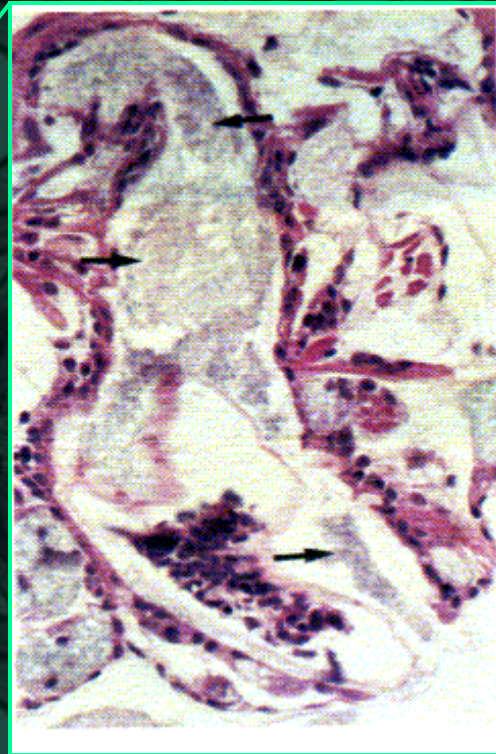
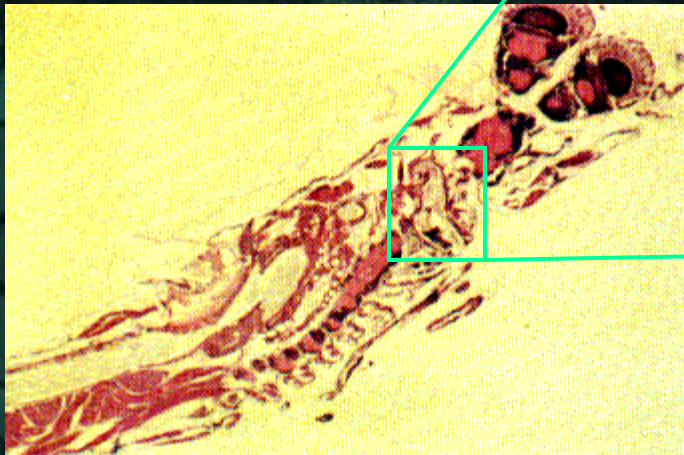
- Vibrios luminiscentes: *V. harveyi* y *V. splendidus*.
- Larvas con colonización masiva en apéndices y, al principio en el tracto digestivo anterior, posteriormente avanza hacia el resto del tracto.
- Bolitas blancas.
- Es común encontrar las mismas especies en las tomas de agua de mar.
- Rápida resistencia a antibióticos.

Necrosis en larvas y postlarvas



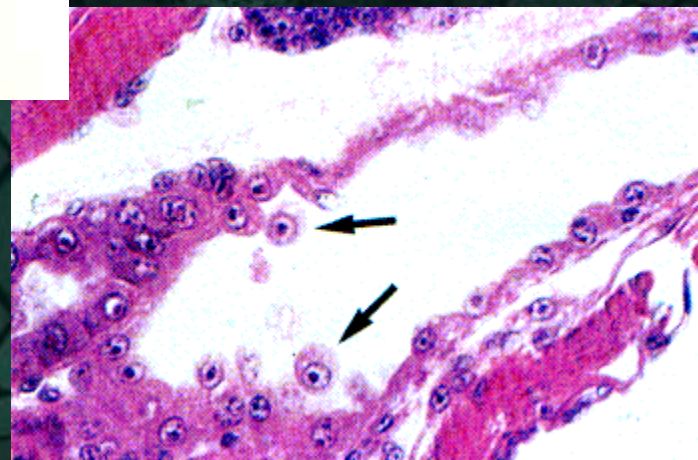
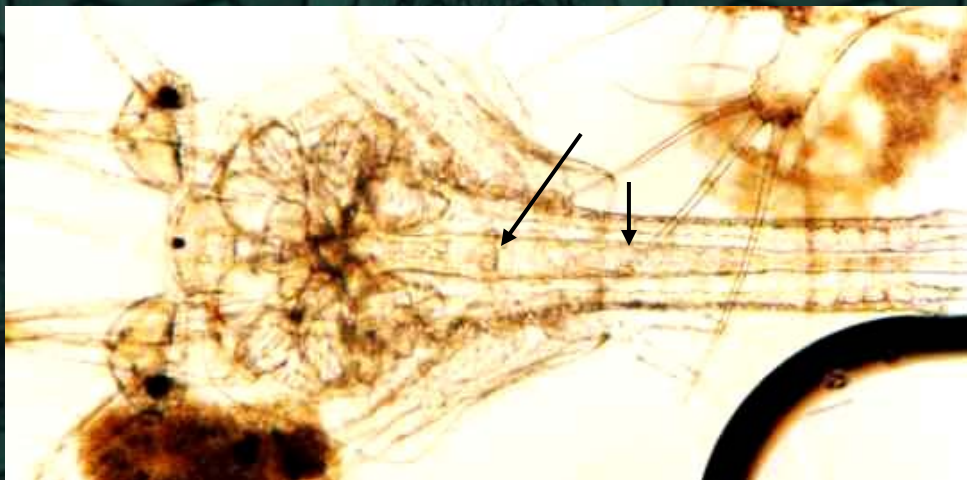
Fotos: *Lightner D.V. 1996 y Chanratchakool et al. 1995. Health management in shrimp ponds.*

Bacteriosis en la región oral de una postlarva



Fotos: SEMARNAP 1999. Atlas de enfermedades de peneidos.

Enfermedad de las Bolitas



02/09/2005

Fotos: *Marisol Morales, CIAD y SEMARNAP 1999. Atlas de enfermedades de pñeidos.*

Vibriosis en la engorda

- Vibrios "verdes" en TCBS: *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. harveyi*. Además *V. penaeicida*.
- Nado errático, en las orillas; letargia; anorexia; coloración del HP alterada, colonizado por epibiontes; cromatóforos expandidos (apéndices rojos); melanizaciones.
- Altos niveles de bacterias en HL (>1000 cel/ml) y en HP (>1 millón/g); alto porcentaje de colonias verdes y/o verdes luminiscentes en agar TCBS.
- Necrosis multifocal, inflamación hemocítica, formación de nódulos en el órgano linfoide, corazón y branquias, etc. Nódulos con bacterias en su interior.

Camarón manchado (black spot)

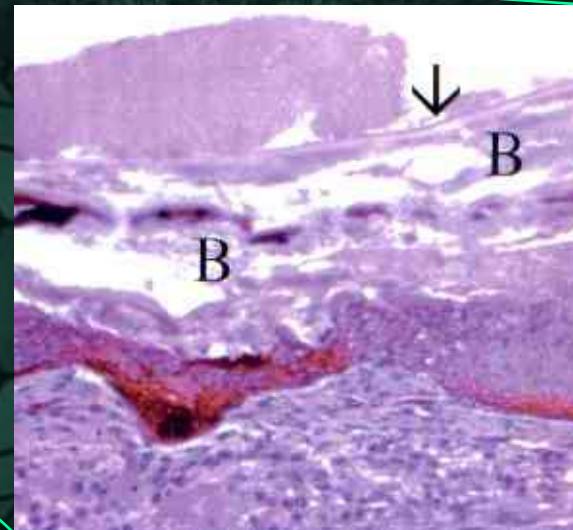
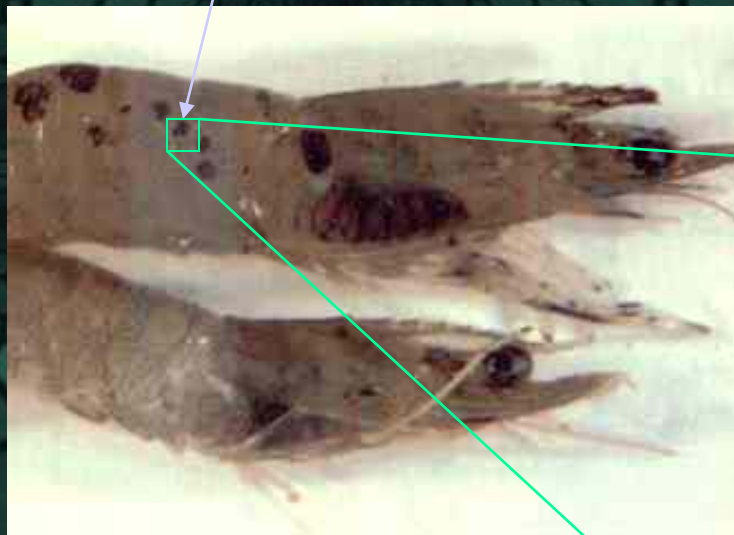
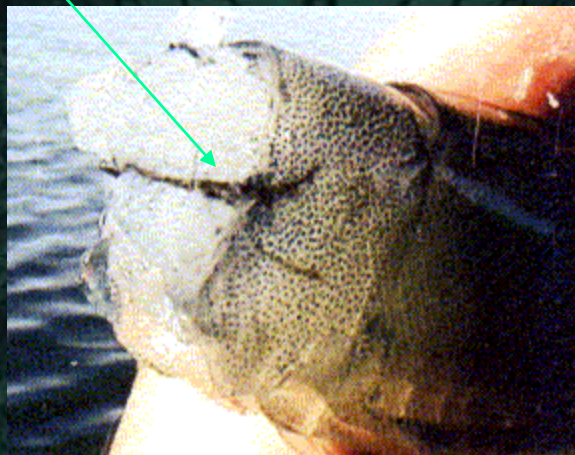


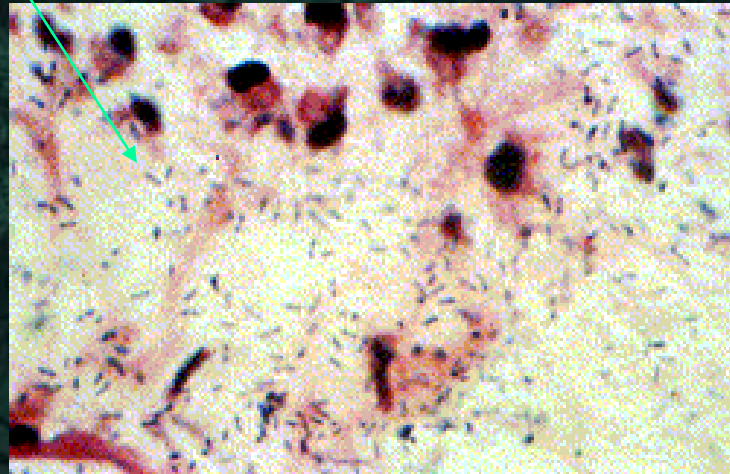
Foto: *Lightner D.V. 1996.*

Astilla negra (black splinter)



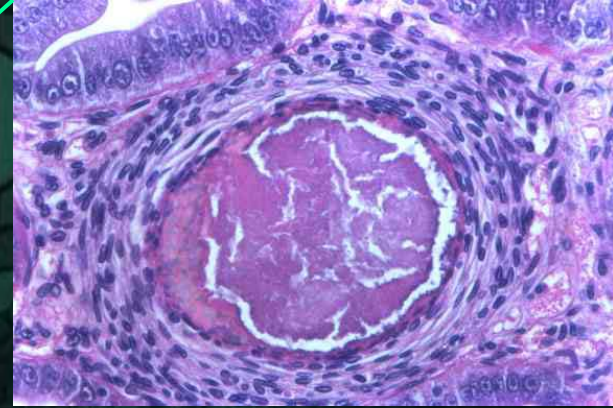
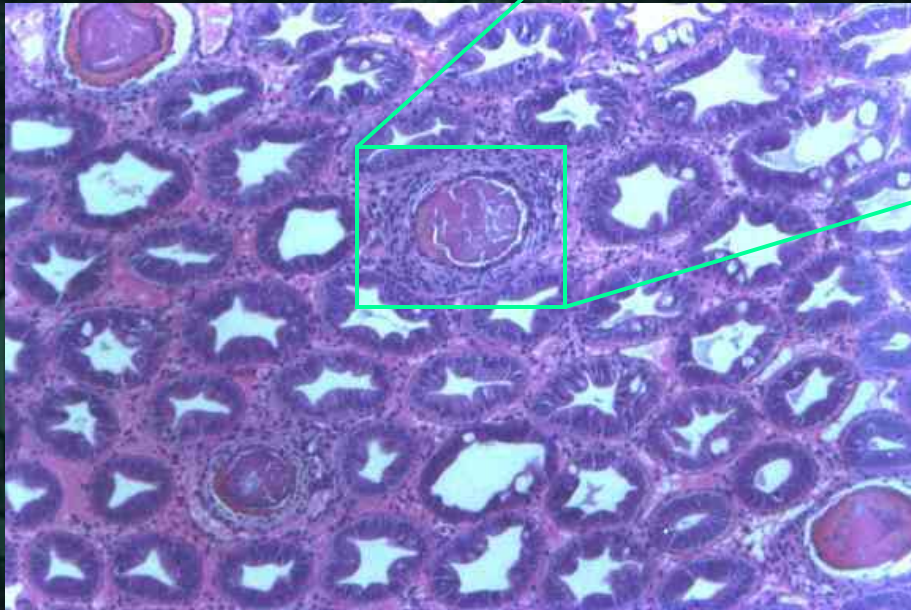
Fotos: SEMARNAP 1999. *Atlas de enfermedades de peneidos.*

Bacterias en el tejido



Fotos: *Chanratchakool et al. 1995. Health management in shrimp ponds..*

Nódulos hemocíticos

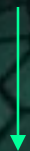


Fotos: *Marisol Morales, CIAD.*

Vibriosis



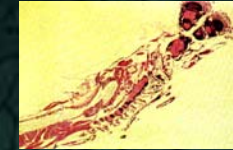
Manchas en exoesqueleto



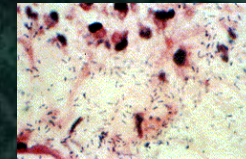
Muda (recuperación)



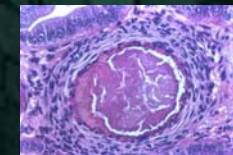
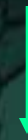
Astilla negra



Ingestión




Vibrios en tejido interno



Septicemia



Muerte

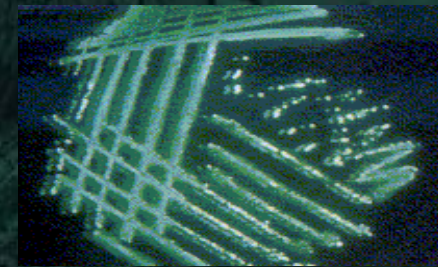


Vibriosis NO es presencia de bacterias en la hemolinfa y/o órganos internos del camarón.

Tipos y especies de *Vibrio* potencialmente patógenas en agar TCBS

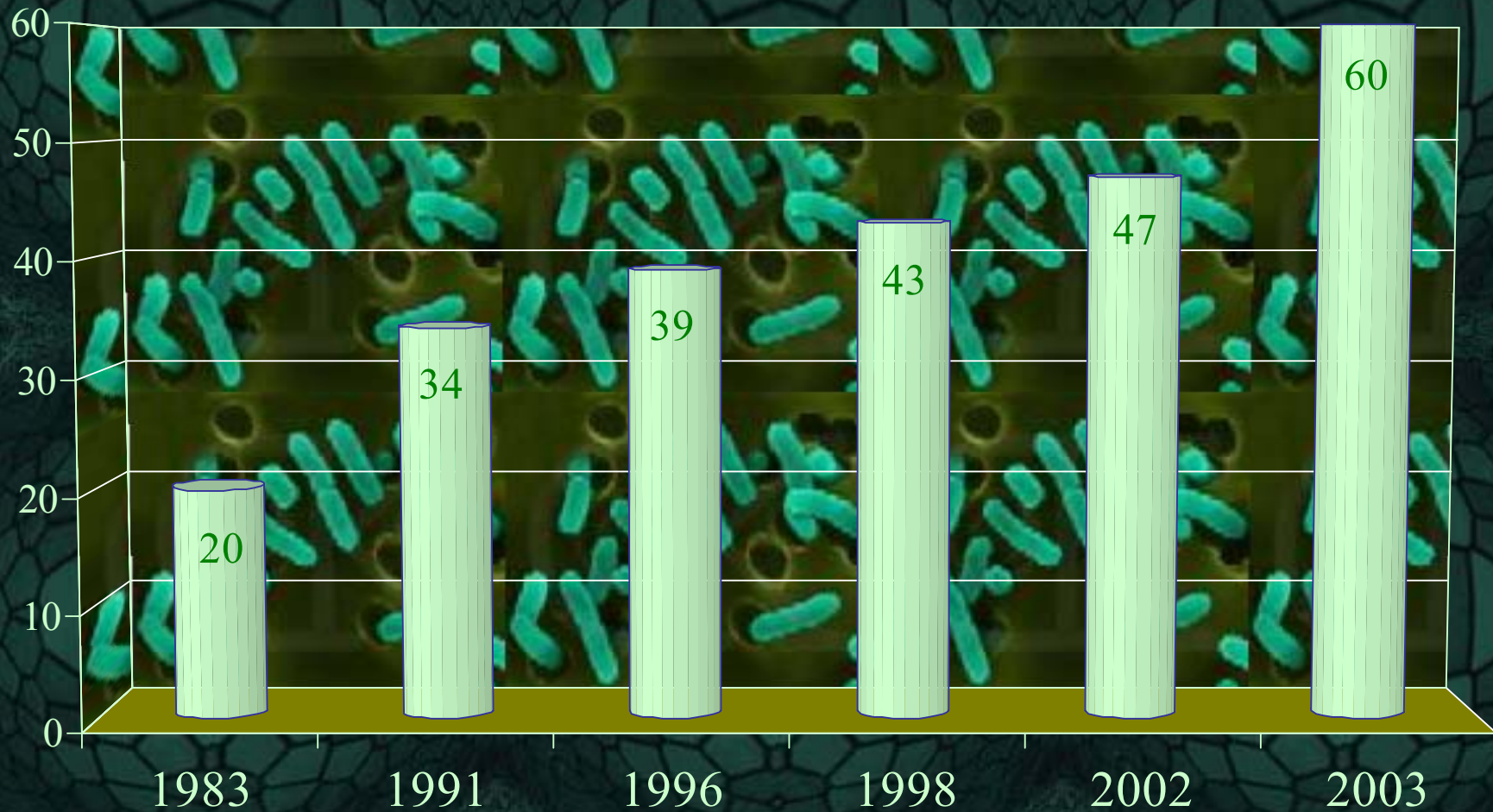
La forma y el color de las colonias NO sirve para identificación

Color de la colonia en TCBS	Especie de <i>Vibrio</i>
Verdes	<i>V. vulnificus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>
Verdes luminiscentes	<i>V. harveyi</i> (larvas), <i>V. parahaemolyticus</i>
Amarillas	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> (10%)
Sin crecimiento en TCBS	<i>V. peneicida</i> .



02/09/2005

Especies de Vibrio



Patogenicidad de Vibrio

un grupo de bacterias (aislados) que tienen características en común y diferentes a otras cepas, pero pertenecientes a la misma especie por compartir caracteres en común

- NO hay especies patógenas!
- SI hay cepas patógenas
- Esta mediada por factores ambientales (salinidad, temperatura)
- Oportunistas y probablemente patógenos primarios (*V. penaeicida*)

Contenido

- Vibriosis
- Toma de muestras
- Análisis bacteriológico de organismos
- Determinación de susceptibilidad a antibióticos
- Tratamiento / antibióticos

The background of the slide is a dark green, high-magnification microscopic image of shrimp tissue. It shows a complex, repeating pattern of polygonal cells with dark, thick borders, creating a honeycomb-like structure. The overall appearance is symmetrical and textured.

Toma de Muestras para Análisis Bacteriológico de Camarones

02/09/2005

21

Muestreo

- ✓ Definición: Proceso de seleccionar un grupo de una población. Los individuos de este grupo se examinan y los resultados son usados para estimar las características de la población que queremos “trabajar”.

Tipos de muestreo

MONITOREO

- ✓ Muestreo al azar
- ✓ Unica manera de obtener una muestra representativa de una población.
- ✓ Tabla de Muestreo al Azar o bien, un Generador Automático de Números al Azar.


Tipos de muestreo (cont.)

MUESTREO CON PROPOSITO

- ✓ Diagnosticar a los animales.
- ✓ Se seleccionan animales que presenten síntomas de enfermedad, ya sea por comportamiento (no se mueven, no comen, están en la superficie) o por su aspecto físico (mala coloración, apéndices ausentes o incompletos, manchas etc).
- ✓ Es importante llevar algunos animales considerados como sanos.

Muestreo de organismos


- ✓ Se deben enviar muestras de al menos 10 animales juveniles o adultos con señales claras de enfermedad y de preferencia igual número de animales sanos. Estos deben estar vivos al momento de tomar la muestra.
- ✓ Los animales deben ser enviados en una hielera con agua del estanque enfriada con hielo por afuera de la bolsa.
- ✓ En el caso de larvas y postlarvas, enviar al menos 50 organismos.



02/09/2005

Contenido

- Vibriosis
- Toma de muestras
- **Análisis bacteriológico de organismos**
- Determinación de susceptibilidad a antibióticos
- Tratamiento / antibióticos

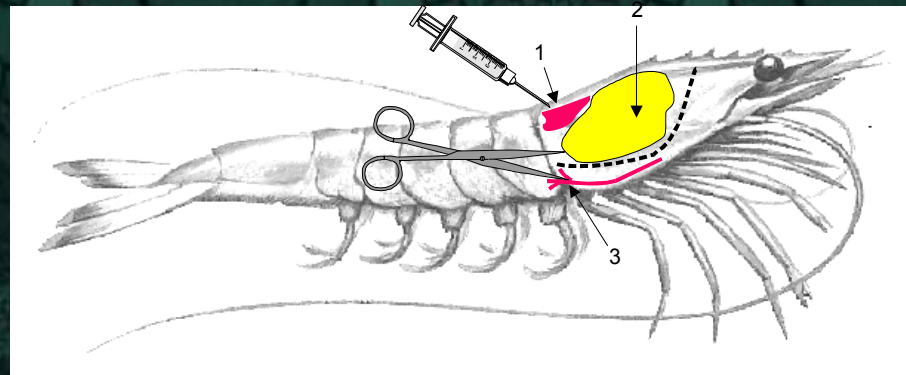
The background of the slide is a microscopic image showing a repeating pattern of hexagonal cells, characteristic of a crustacean cuticle. The cells are arranged in a honeycomb-like structure, with darker lines representing the cell walls. The overall color is a dark, muted green.

Metodología para el Análisis Bacteriológico de camarones penéidos.

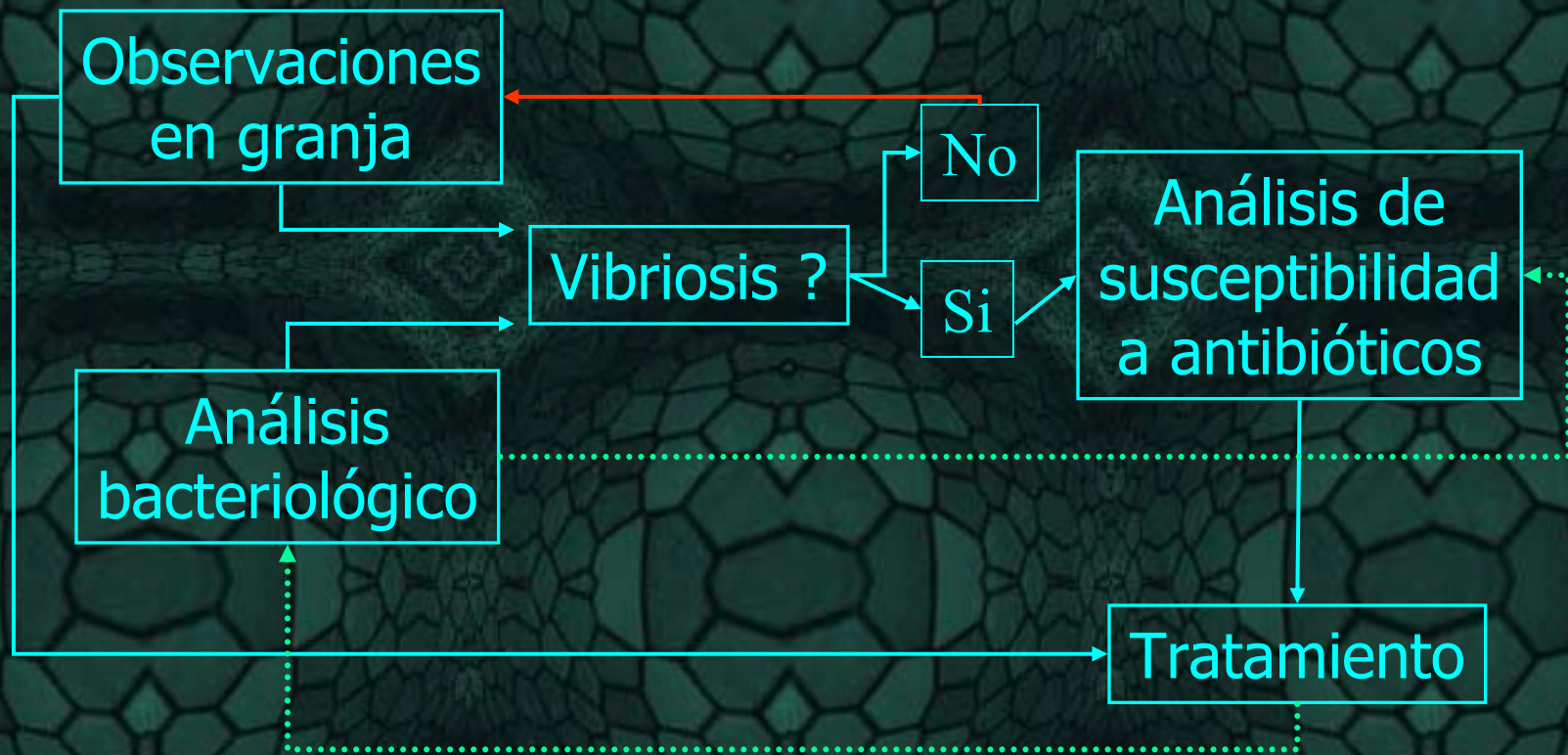
Objetivo

Tomar e interpretar resultados de muestras de camarones para análisis bacteriológico.

Cuantificar la cantidad y el tipo de bacterias que se encuentran en la hemolinfa y en el hepatopáncreas del camarón; o bién en las larvas y postlarvas.



Toma de decisión



Opciones de análisis

camarones juveniles y adultos

- Monitoreo: “pool” de hemolinfa
- Diagnóstico: analizar cinco camarones, hepatopáncreas y hemolinfa de cada uno



diferencias entre los métodos

POOL HEMOLINFA

- cualitativo
- valores enmascarados
- rápido
- menos costoso
- monitoreo de la población

CONTEO INDIVIDUAL

- cuantitativo (UFC/ml o gr)
- valores reales
- lento
- más costoso
- diagnóstico

Análisis de larvas y postlarvas

- Analizar individual o por lotes
- Se usan dos medio de cultivo, TCBS para vibrios y agar marino para heterótrofas totales.
- Cuantitativo (UFC/larva o gr)
- Rápido y no muy costoso



Reportar

- ✓ Reportar Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml, gr o larva.
- ✓ Anotar porcentaje de colonias verdes en agar TCBS.
- ✓ Indicar presencia de colonias luminiscentes (verdes luminiscentes, potencialmente patógenas).
- ✓ Anotar porcentaje de vibrios (sólo si se sembró en agar marino y TCBS).
- ✓ Tiempo de coagulación de la hemolinfa.

Interpretación de resultados de crecimiento bacteriano en agar TCBS (vibrios)

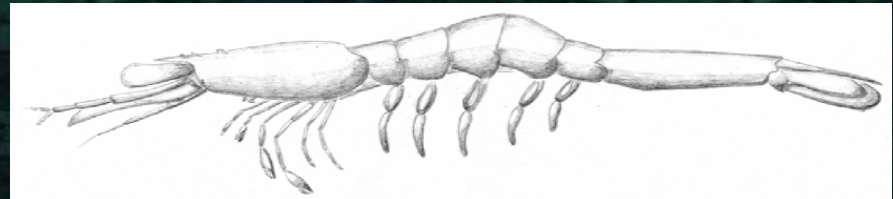
Juveniles y adultos

Tipos de UFCs	Hemolinfa		Hepatopáncreas	
	$>10^3$	$<10^3$	$>10^5$	$<10^5$
Vib. Lum 100%	grave	grave	grave	serio
Ver. >50%	serio	elevado-serio	serio	elevado-serio
Ver. <50%	elevado-serio	elevado	elevado	normal-elevado
Amarillas	elevado	elevado	normal - elevado	normal

Interpretación de resultados de crecimiento bacteriano

Larvas y postlarvas

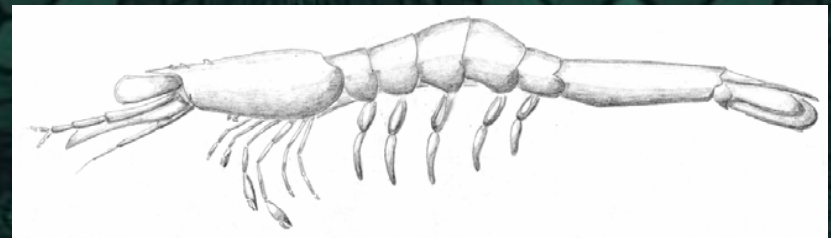
Tipos de UFCs en agar TCBS	UFC/PL	
	$>10^3$	$<10^3$
Vib. Lum 100%	grave	serio
Ver. $>50\%$	serio	elevado / grave
Ver. $<50\%$	elevado / grave	elevado
Amarillas	elevado	normal / elevado



Interpretación de resultados de crecimiento bacteriano

Larvas y postlarvas

- ✓ Agar Marino:
 - ✓ $>10^5$ severo
 - ✓ 10^4-10^3 : elevado
 - ✓ $<10^3$: normal
- ✓ 10-20% de la muestra deben ser vibrios.



Contenido

- Vibriosis
- Toma de muestras
- Análisis bacteriológico de organismos
- Determinación de susceptibilidad a antibióticos
- Tratamiento / antibióticos

Determinación de la Susceptibilidad de Cepas Bacterianas a Antibióticos

Estimar a que antibiótico son sensibles las bacterias que probablemente sean responsables de la enfermedad

Dos formas de estimar la susceptibilidad de bacterias a antibióticos:

- Difusión en agar (antibiograma) y
- Dilución en caldo (Concentración Mínima Inhibitoria, CIM o MIC por sus siglas en inglés).

Antibiograma

- Método de difusión en placa
- Formación de halos de inhibición que representan interacción dinámica entre la difusión del antibiótico y el crecimiento bacteriano
- Si se tienen estudios, nos dice si una cepa es resistente o sensible a un antibiótico
- Rápido y económico

Estos estudios sólo se han realizado, en parte, para el Sarafloxacin (Sarafin[®]) y se están haciendo para florfenicol (Nuflor[®]) y enrofloxacin.

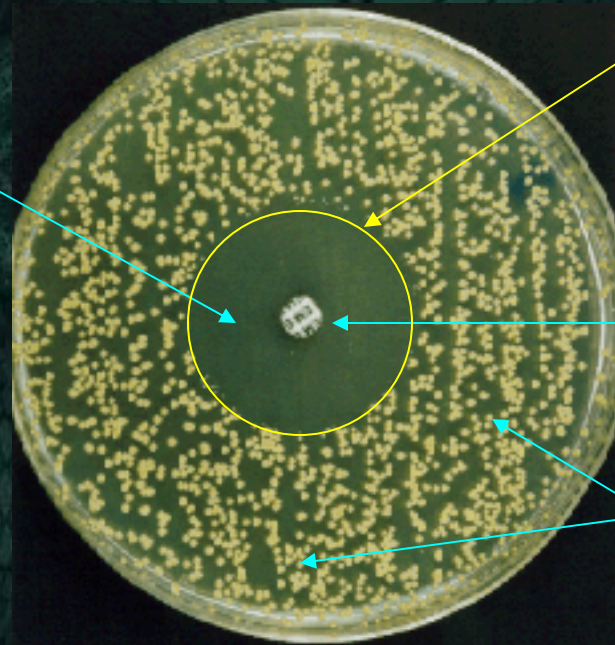
Antibiograma

Halo de
Inhibición (mm)

MIC (?)

Sensidisco

Crecimiento
bacteriano



Interpretación de los diámetros de los halos de inhibición. Medidas en milímetros. Estos límites no son específicos para *Vibrio*, sino han sido tomados de bacterias patógenas de humanos y animales de granja.

Antibiótico	Concentración	Resistente	Intermedio (mm)	Sensible
Cloranfenicol	30	12	13-17	18
Oxitetraciclina	30	14	15-18	19
Florfenicol	30	16	17-20	21
Enrofloxacin	5	15	16-20	21
Sarafloxacin	10			

Cálculo de Medicación o de Medicación

$$K = 100 / \% \times D / C$$

K = kilos de producto comercial por tonelada de alimento.

% = Porcentaje del consumo sobre peso vivo.

D = Dosis diaria de la droga en mg por Kg de premezcla.

C = Cantidad de compuesto activo del antibiótico en un Kg de medicamento (habiendo establecido que las bacterias a tratar son sensibles a éste antibiótico).

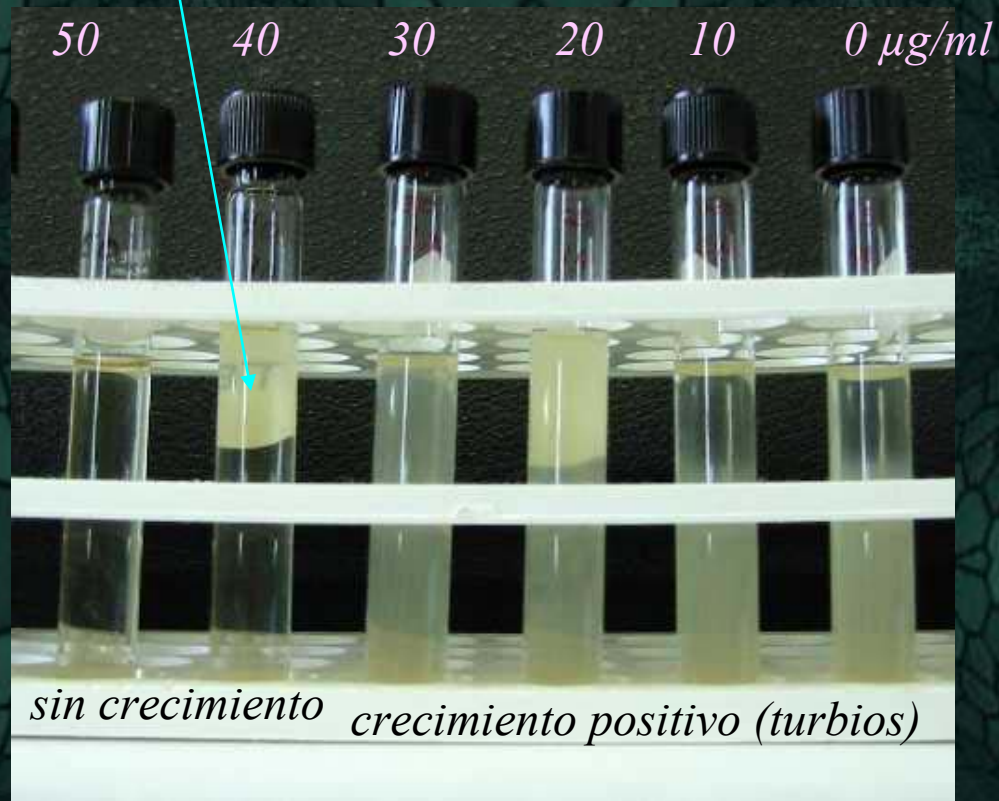
Dosis diaria de la mezcla

- No se conocen los valores para los antibióticos usados, salvo Sarafloxacin.
- Diferentes cepas de *Vibrio* tienen diferentes MICs
- Las cepas cambian con el tiempo en su sensibilidad; aparecen cepas resistentes y es necesario aumentar la dosis.

Concentración Mínima Inhibitoria

- La MIC nos permite seleccionar un antibiótico a una concentración efectiva a la cual las cepas probadas son inhibidas.
- Es un análisis *in vitro*.
- Es rápido pero más laborioso que el antibiograma
- Relativamente barato

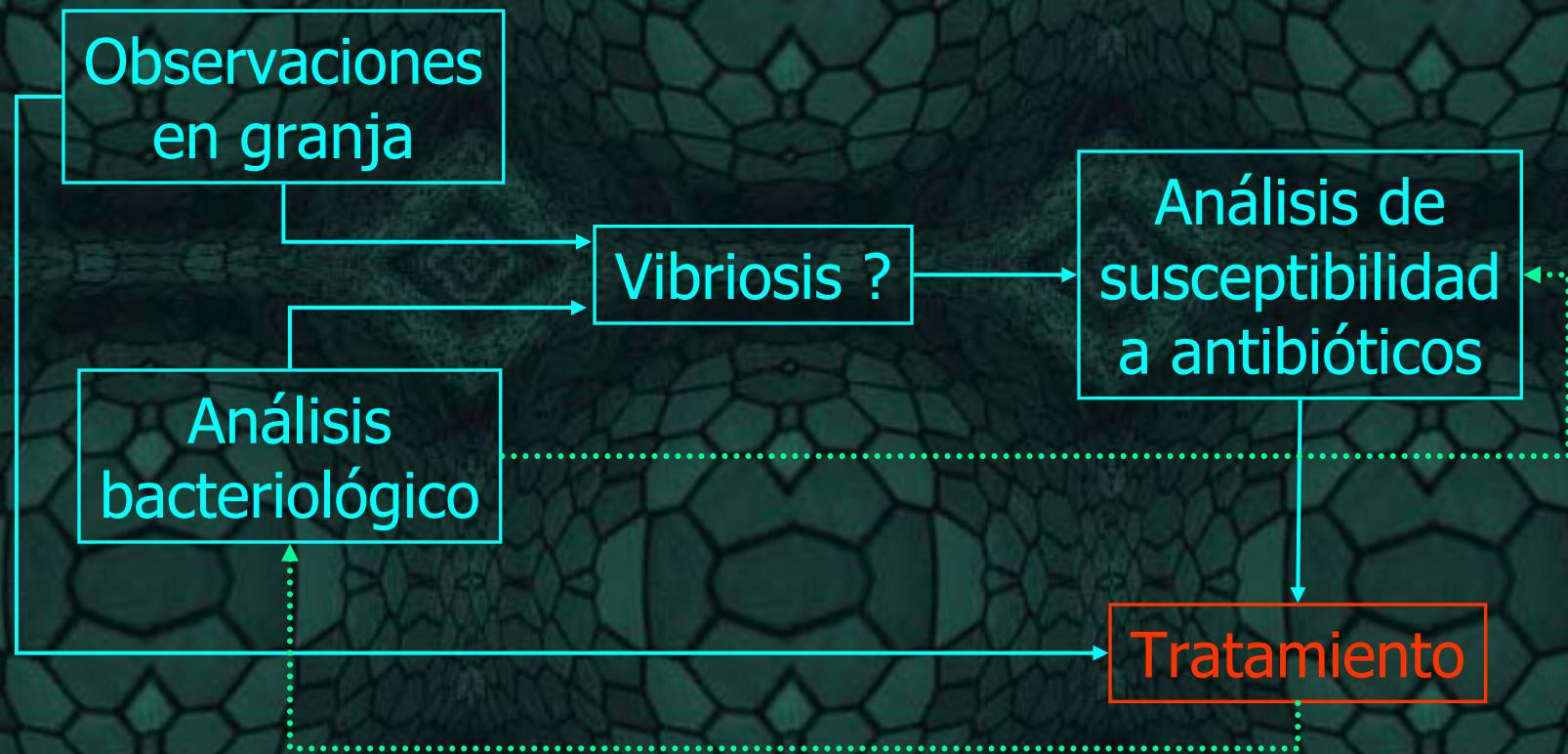
El tubo con 40.0 $\mu\text{g/ml}$ es la MIC para esa cepa bacteriana.



Reporte

- Reportar la MIC para cada antibiótico y cepa.
- Indicar que antibiótico es el recomendado.
- Presentar la concentración a usar en el alimento balanceado (al menos 18-20 veces la MIC).
- Indicar el tiempo de tratamiento (5-10 días).

Toma de decisión



Contenido

- Vibriosis
- Toma de muestras
- Análisis bacteriológico de organismos
- Determinación de susceptibilidad a antibióticos
- Tratamiento / antibióticos

Tratamiento

- ✓ Cualquier tratamiento con alimento medicado debe incluir siempre un mejoramiento de la calidad del agua
- ✓ Sólo usar antibióticos cuando sea esencial
- ✓ Siempre medicar previo análisis bacteriológico
- ✓ Usar antibióticos frescos de una fuente confiable
- ✓ Usar la dosis correcta por un tiempo adecuado (no menos de 5-7 días)
- ✓ Permitir un tiempo suficiente para su eliminación (14 días antes de la cosecha)

Tratamiento (cont.)

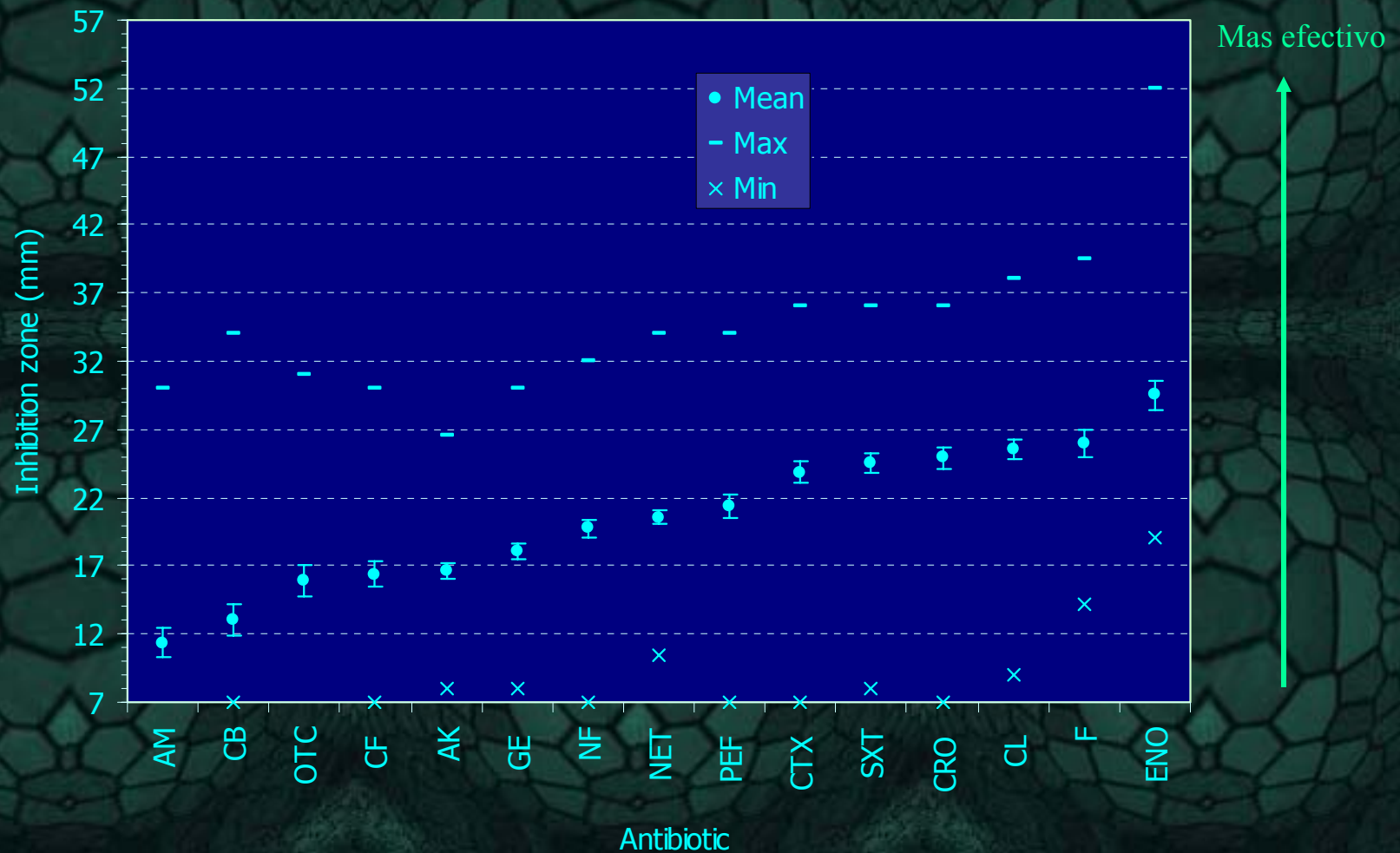
- ✓ Incluir el antibiótico en el alimento
- ✓ Recubrir el alimento generalmente es pérdida de dinero
- ✓ El agua marina degrada los medicamento rápidamente
- ✓ Sólo los camarones sanos y poco enfermos comen

Antibióticos más comunes

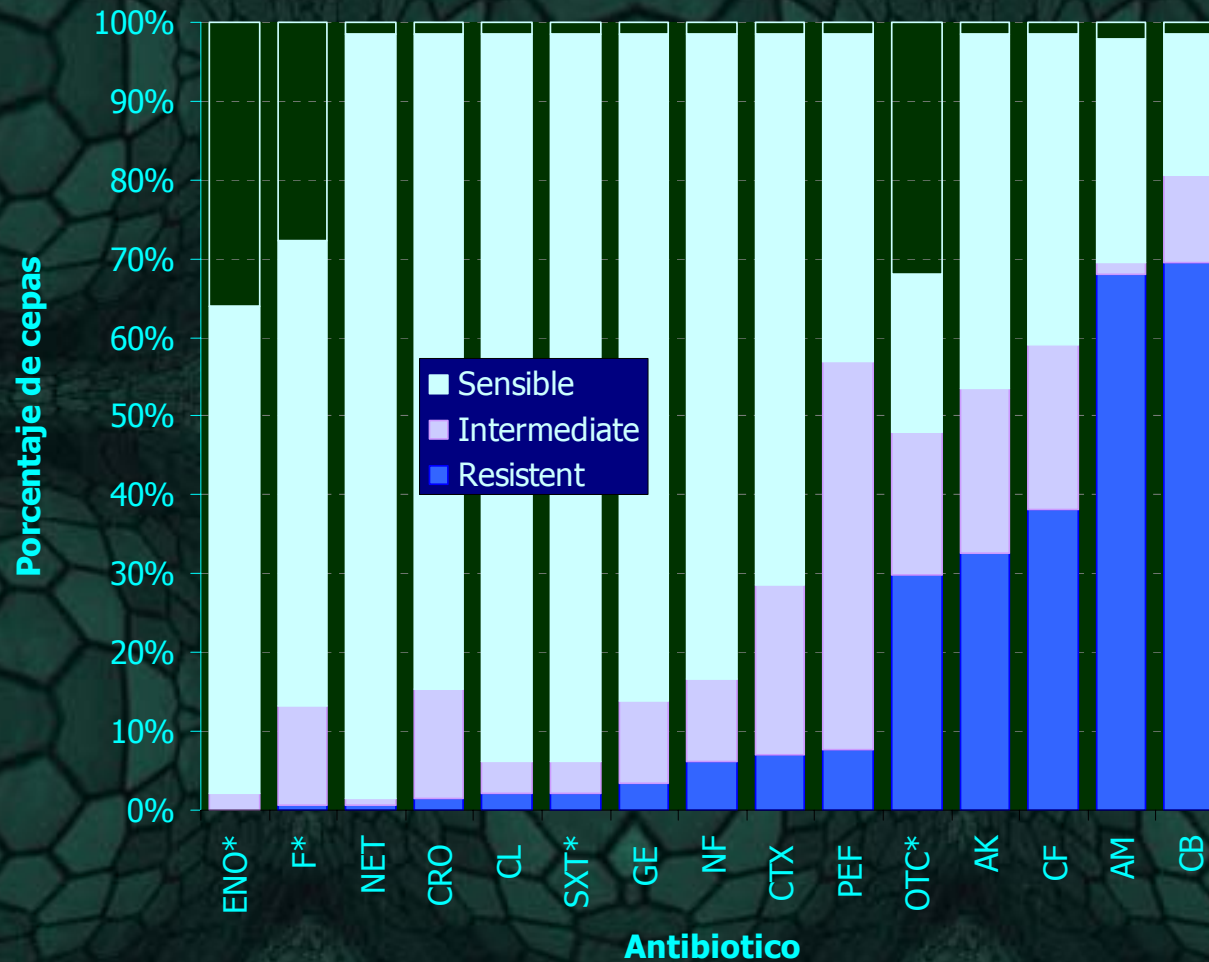
- Enrofloxacin, muy eficaz contra vibrios.
- Florfenicol, eficaz aunque recientemente se han observado cepas menos sensibles.
- Oxytetraciclina, sólo para bacterias intracelulares.
- Sarafloxacin, presencia de cepas poco sensibles.
- Norfloxacin, nitrofuranos, etc. poco efectivos.
- Cloranfenicol, peligroso, daños a la salud.

NOTA: ningún antibiótico está aprobado por la FDA

Sensibilidad de 100 cepas aisladas de camarones enfermos a 15 antibióticos.



Porcentaje de cepas aisladas de camarones enfermos sensibles a antibióticos.



Roque, A. *et al.* 2001. *In vitro* susceptibilities of *Vibrio* isolates isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico to 15 antibiotics. Intl. J. Antimicrob. Agents.

Promedio de MICs para cepas aisladas de camarones enfermos.

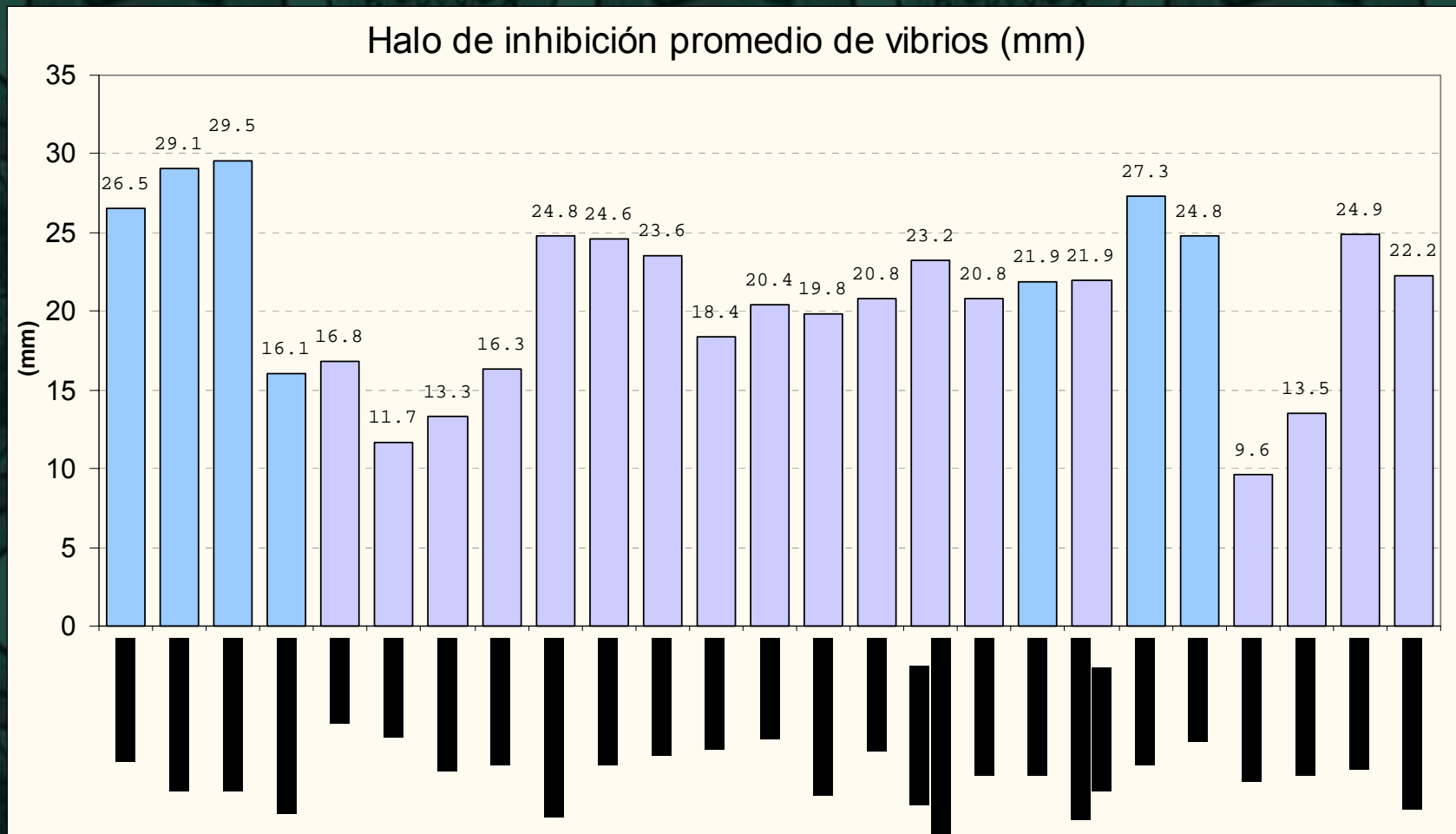
Concentraciones Mínimas Inhibitorias ($\mu\text{g ml}^{-1}$)* de 3 antibioticos a cepas de *Vibrio* aisladas de camarones enfermos.

Antibiotico	Enrofloxacin	Florfenicol	Oxytetraciclina
Promedio	0.455	1.817	300.981
Max	1.500	8.000	1064.000
Min	0.304	0.250	0.260
n	84	101	98

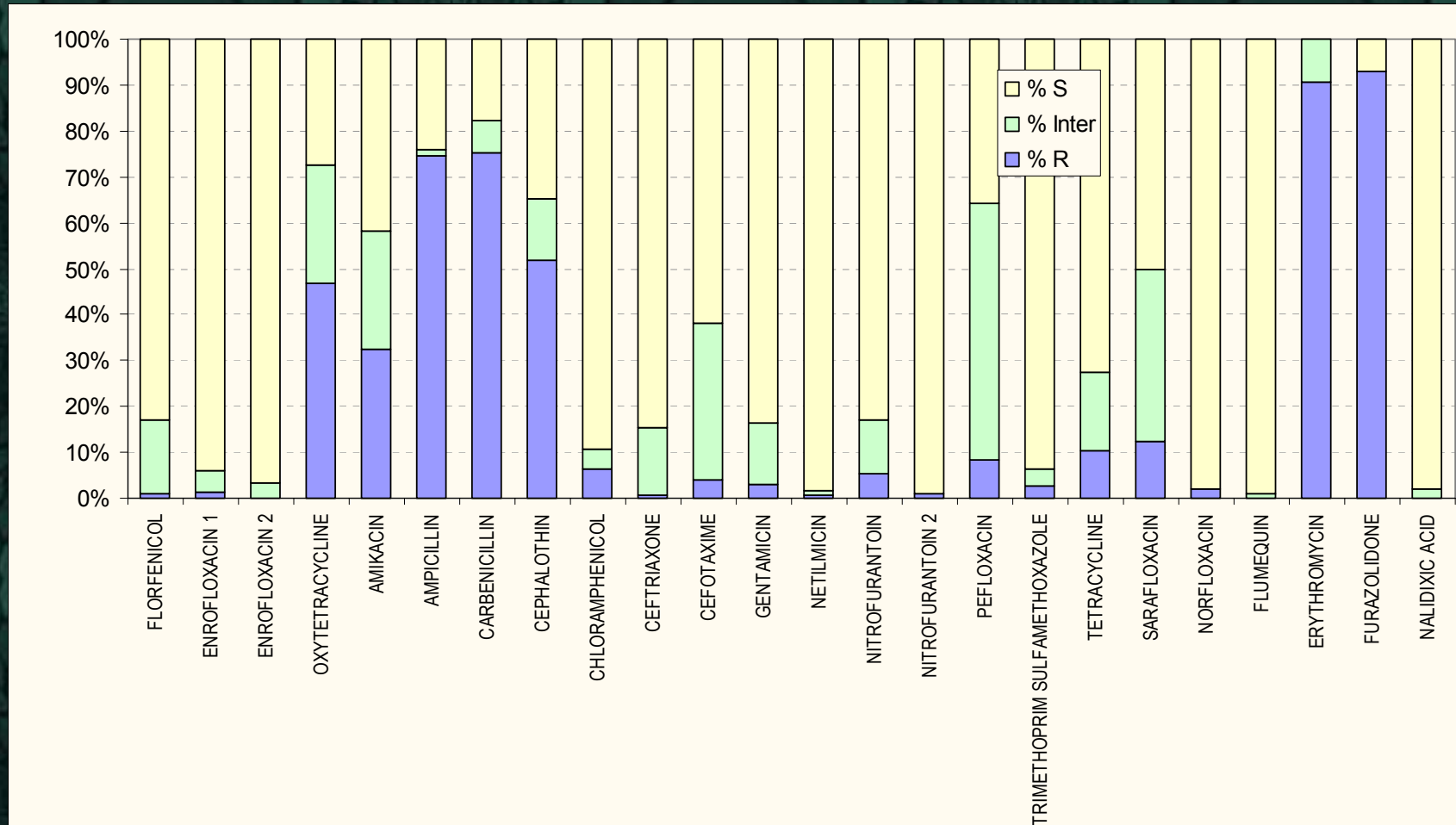
* equivalente a g/tonelada de alimento

Roque, A. *et al.* 2001. *In vitro* susceptibilities of *Vibrio* isolates isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico to 15 antibiotics. Intl. J. Antimicrob. Agents.

Sensibilidad a 23 antibióticos



Porcentaje de sensibilidad





Gracias

02/09/2005

59