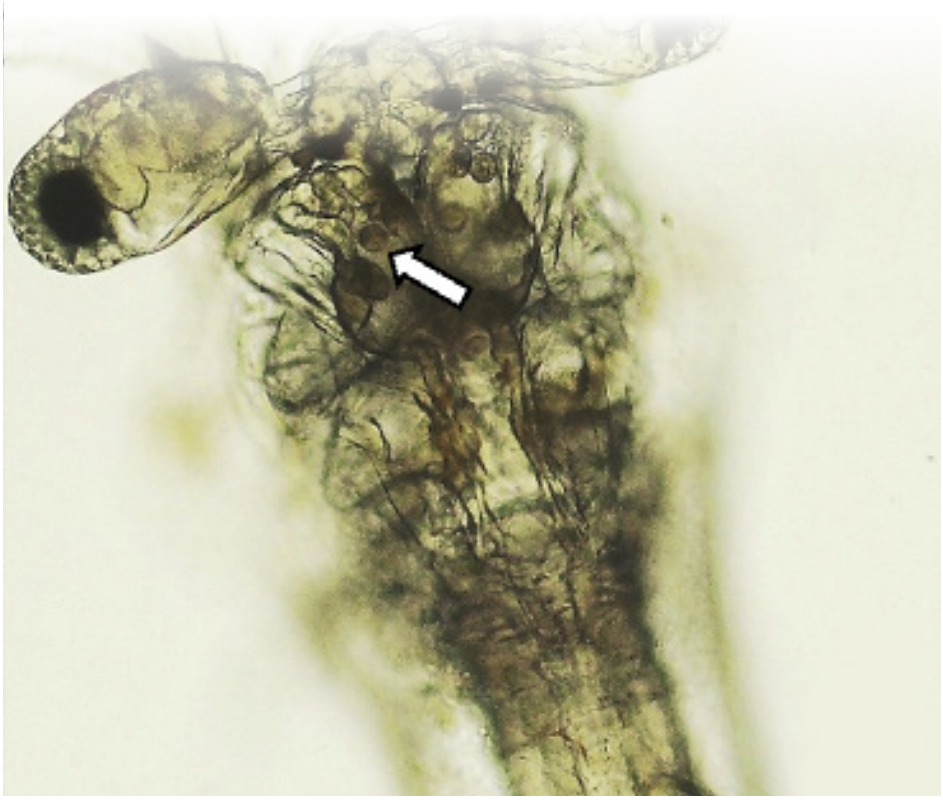
Síndrome de las Bolitas en criaderos de *Penaeus vannamei* en América Latina

Autores:
Pablo Intriago [1,2*]
Bolívar Montiel [2]
Mauricio Valarezo [2]
Xavier Romero [3]
Kelly Arteaga [2]
Nicole Cercado [2]
Milena Burgos [2]
Andrew P. Shinn [4,5]
Alejandra Montenegro [2]
Andrés Medina [2]
Jennifer Gallardo [2]

[1] South Florida Farming Corp., 13811 Old Sheridan St, Southwest Ranches, FL 33330, USA.
[2] South Florida Farming Lab., Av. Miguel Yunez, Km 14.5 vía a Samborondón, Almax 3 Etapa 1 Lote 3 Bodega 2, Samborondón, Guayas, Ecuador.
[3] Ficus 302 y Antonio Sánchez, Calle 11 N-O, Guayaquil, Ecuador.
[4] INVE (Thailand), 471 Bond Street, Bangpood, Pakkred, Nonthaburi 11120, Thailand.
[5] Centre for Sustainable Tropical Fisheries and Aquaculture, James Cook University, Townsville, Australia.

pintriago@southfloridafarming.com

Microorganisms 2024, 12(6), 1186; https://doi.org/10.3390/microorganisms12061186



En septiembre de 2023, varios criaderos en América Latina experimentaron tasas de mortalidad significativas: hasta el 90% en el estadio de zoea 2 de *Penaeus vannamei*. Las observaciones de montajes frescos revelaron estructuras que se asemejaban a gotas lipídicas, similares a las que se observan en una condición conocida como “Síndrome de las Bolitas”. Los exámenes histopatológicos rutinarios identificaron células y tejidos desprendidos en los tractos digestivos de los zoeas afectados, en contraste con el contenido típico de células de algas en los zoeas saludables. Las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para más de 20 patógenos conocidos de camarón indicaron diferencias mínimas entre los lotes enfermos y saludables. Ambos grupos dieron negativo para la enfermedad de Necrosis Hepatopáncreatica Aguda (AHPND), pero positivo para especies de *Vibrio* y bacterias similares a *Rickettsia* en las muestras enfermas. Los análisis histológicos de los zoeas afectados revelaron una degeneración característica del tejido en el hepatopáncreas, formando esferas que eventualmente migraron hacia el intestino superior, el intestino medio y las cecas del intestino medio, una patología identificada como Síndrome de las Bolitas (BS). Las evaluaciones microbiológicas revelaron especies de *Vibrio* en concentraciones de 10^6 UFC zoea/g en los zoeas afectados, aproximadamente dos órdenes de magnitud más alto que en los zoeas saludables.

El aislamiento de bacterias tanto de zoeas saludables como afectados por BS en agar tiosulfato-citrato-sal de bilis-sucrosa (TCBS) y CHROMagar™ (París, Francia), seguido de la identificación utilizando API 20E, identificó seis cepas de *Vibrio alginolyticus*. A pesar de las similitudes con el BS en montajes frescos, se observaron diferencias histopatológicas distintas, particularmente la presencia de células descamadas en los intestinos y variaciones en los lóbulos hepatopancreáticos. Este estudio resalta la necesidad crítica de investigar más a fondo para comprender completamente la etiología y patología de este síndrome en el estadio de zoea 2 de *P. vannamei* para desarrollar estrategias de mitigación efectivas para las operaciones de criaderos.

Durante finales de la década de 1980, la década de 1990 y principios de la de 2000, las patologías más predominantes en los criaderos de América Latina eran el Síndrome de Bolitas Larvales (LBS), el Síndrome de Zoea 2 y el Síndrome de Muda de Mysis [1–3]. Durante el mismo período, las principales patologías reportadas en postlarvas eran las bacterias luminiscentes [4–7]. Después de 2015, los brotes de enfermedades con altas tasas de mortalidad se vieron más comúnmente en la producción de postlarvas, por ejemplo, AHPND en postlarvas (PL-AHPND), enfermedad de postlarvas translúcidas (TPD), etc. [8–11]. El LBS es una condición caracterizada inicialmente por una patología distintiva del hepatopáncreas, donde se produce una descamación celular del epitelio del hepatopáncreas, formando esferas que eventualmente se trasladan al intestino superior [1]. La patología macroscópica del LBS normalmente se desarrolla en cuestión de horas, pasando de zoeas saludables y bien alimentados a animales moribundos y vacíos. Al mismo tiempo, las larvas se vuelven bioluminiscentes, lo que se acompaña de cambios en el comportamiento y pérdida de apetito [2]. Aunque el LBS puede ocurrir durante las etapas postlarvales (PL), se han observado mortalidades masivas, que alcanzan hasta el 90%, principalmente en las etapas tempranas de zoea y mysis. Una característica distintiva del LBS es la presencia de bolitas en el hepatopáncreas, que eventualmente migran al intestino.

LBS ha sido asociado con infecciones de *Vibrio* spp. [2,12]. El Síndrome de Zoea 2 solo se ha asociado con *V. harveyi* y *V. alginolyticus* [3,13], y la especie asociada con el Síndrome de Mysis nunca ha sido identificada. La bioluminiscencia nocturna observada en criaderos tanto en Asia como en las Américas se atribuyó típicamente a *Vibrio* luminiscentes [2,4–7]. En tiempos más recientes, los brotes de mortalidades súbitas y agudas en criaderos de camarones peneidos suelen comenzar en las etapas PL, pasando de un estado activo y aparentemente saludable a moribundo y muerto. La velocidad y virulencia con que ocurren estas mortalidades masivas se han observado en muchas instalaciones de producción, y en la mayoría de los casos se han asociado o vinculado con diferentes cepas de *Vibrio* [8–10]. Intriago *et al.* [10] proporcionaron evidencia de que la causa de estos eventos de mortalidad rápida era una especie de *Vibrio* que portaba los mismos plásmidos que el *Vp*AHPND reportado como causante de la enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) en estanques de cultivo en otras regiones. La condición fue tentativamente denominada AHPND en postlarvas (PL-AHPND) para diferenciarla de otras patologías que afectan a las larvas de camarón peneido. En Asia, la enfermedad de postlarvas translúcidas (TPD) ha sido la principal causa de enfermedades y mortalidades larvales, siendo el agente causante una cepa de *V. parahaemolyticus* portadora de un gen de hemolisina (aislamiento Vp-JS20200428004-2) [8,9,11]. En India, se describió una condición similar referida como Síndrome de Zoea 2 que afecta a los zoeas 2 de *Penaeus vannamei* [14].

En septiembre de 2023, algunas instalaciones de cultivo en la región de América Latina experimentaron altas mortalidades en los estadios de zoea 2 y 3. Dada la alta tasa de mortalidad, estos tanques fueron descartados. No se ha reportado el agente causal asociado con estas mortalidades. La observación microscópica de las larvas reveló la presencia de "bolitas" (esferas) en el hepatopáncreas. Generalmente, los indicadores clínicos y la apariencia macroscópica en montajes húmedos coincidían con lo que se había identificado previamente como LBS. El presente estudio informa sobre los hallazgos microbiológicos, las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los hallazgos histológicos en animales saludables y enfermos afectados por esta condición.

Razonamiento del estudio

Las muestras fueron enviadas por clientes para monitorear el estado de salud de los camarones o brotes de enfermedades en sus criaderos. Los animales (zoeas) utilizados como controles estaban saludables y se recolectaron como especímenes de referencia para comparar con los animales afectados. Este estudio no fue una investigación epidemiológica, sino un análisis simple de prevalencia de varios patógenos de camarón en muestras proporcionadas aleatoriamente de un criadero que reportó mortalidades.

Referencias

1. Morales, I. (1992) Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. In: *Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura; Escuela Superior Politécnica del Litoral: Guayaquil, Ecuador*, 1992; pp. 203–207.
2. Robertson, P.A.W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J.K., Zherdmand, M. y Austin, B. (1998) Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 32, 151–155.
3. Vandenberghe, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gomez-Gil, B., Calderon, J., Sorgeloos, P. y Swings, J. (1999) *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2592–2597.
4. Baticados, M.C.L., Lavilla-Pitogo, C.R., Cruz-Lacierda, E.R., de la Pena, L.D. y Sunaz, N.A. (1990) Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis. Aquat. Org.*, 9, 133–139.
5. Lavilla-Pitogo, C.R., Baticados, M.C.L., Cruz-Lacierda, E.R. y de la Pena, L.D. (1990) Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91, 1–13.
6. Song, Y.L. y Lee, S.P. (1993) Characterization and ecological implication of luminous *Vibrio harveyi* isolated from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin.*, 32, 217–220.
7. Nithimathachoke, N., Pratanpipat, P., Thongdaeng, K., Withyachumnarnkul, B. y Nash, G. (1995) Luminous bacterial infection in pond reared *Penaeus monodon*. *Asian Shrimp News*, 23, 1–4.
8. Zou, Y., Xie, G., Jia, T., Xu, T., Wang, C., Wan, X., Li, Y., Luo, K., Bian, X., Wang, X. *et al.* (2020) Determination of the infectious agent of Translucent Post-Larva Disease (TPD) in *Penaeus vannamei*. *Pathogens*, 9, 741.
9. Yang, F., Xu, L., Huang, W. y Li, F. (2022) Highly lethal *Vibrio parahaemolyticus* strains cause acute mortality in *Penaeus vannamei* post larvae. *Aquaculture*, 548, 737605.
10. Intriago, P., Medina, A., Espinoza, J., Enriquez, X., Arteaga, K., Aranguren, L.F., Shinn, A.P. y Romero, X. (2023) Acute mortality of *Penaeus vannamei* larvae in farm hatcheries associated with the presence of *Vibrio* sp. carrying the *Vp*PirAB toxin genes. *Aquac. Int.*, 31, 3363–3382.
11. Yang, F., You, Y., Lai, Q., Xu, L. y Li, F. (2023) *Vibrio parahaemolyticus* becomes highly virulent by producing Tc toxins. *Aquaculture*, 576, 739817.
12. Intriago, P. y Jimenez, R. (1999) The effect of *Vibrio parahaemolyticus*, a luminescent bacteria isolated from grow out ponds in *Penaeus vannamei* larviculture. In: *Book of Abstracts World Aquaculture '99: Bridging the Gap, Proceedings of the Annual International Conference and Exposition of the World Aquaculture Society, Sydney, NSW, Australia, 26 April–2 May 1999, World Aquaculture Society: Sydney, NSW, Australia*, *1999*. p. 353.
13. Wiradana, P.A., Sani, M.D., Mawli, R.E., Ashshoffa, F.N.D., Widhiantara, I.G. y Mukti, A. (2022) Monitoring the occurrence of Zoea Syndrome (ZS) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larval from several hatcheries in East Java, Indonesia. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, 1036, 012003.
14. Kumar, S.T., Vidya, R., Kumar, S., Alavandi, S.V. y Vijayan, K.K. (2017) Zoea-2 syndrome of *Penaeus vannamei* in shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 479, 759–767.
15. Buller, N.B. (2004) *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*. CABI Publishing: Cambridge, MA, USA. eISBN 978-0-85199.
16. Phromjai, J., Boonsaeng, V., Withyachumnarnkul, B. y Flegel, T.W. (2002) Detection of hepatopancreatic parvovirus in Thai shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.*, 51, 227–232.
17. Gangnonngiw, W., Bunnontae, M., Kayansamruaj, P., Senapin, S., Srisala, J., Flegel, T.W. y Wongprasert, K. (2023) A novel ssDNA Bidnavirus in the giant freshwater prawn

Lamentablemente, los propietarios y gerentes no divulgan información sobre los protocolos utilizados ni sobre los parámetros físicos y químicos del cultivo, ya que creen que podría dañar la reputación del criadero. En consecuencia, no podemos realizar muestreos más extensos ni proporcionar información detallada relacionada con la cultura larval.

Materiales y métodos

Recolección de muestras

Se tomaron muestras de larvas de *P. vannamei* de dos criaderos en América Latina (los detalles precisos de ubicación se mantienen en reserva para respetar la solicitud de confidencialidad de las instalaciones). Se tomaron muestras para microbiología, PCR e histopatología de dos tanques de cada criadero. Los criaderos fueron seleccionados porque uno de ellos había reportado una alta mortalidad en los estadios de zoea 2–3, mientras que el otro criadero, con zoeas 2–3 aparentemente saludables, fue seleccionado como control. Cabe señalar que los camarones muestreados para PCR e histología eran individuos diferentes de las mismas poblaciones. Para proteger la privacidad del cliente, el país y la ubicación precisa de cada instalación de cultivo de donde se obtuvieron las muestras no serán divulgados.

Microbiología de las larvas

La concentración total de bacterias en las larvas se determinó sumergiendo primero las larvas (es decir, 1 g o aproximadamente >2000 zoea de estadio 3) en un tamiz de nylon de 200 µm durante 2–3 minutos en una solución de 50 ppm de cloro activo preparada con agua de mar a 35 ppt. Las zoeas se enjuagaron posteriormente con agua de mar estéril en exceso. El peso de las larvas se registró utilizando una balanza digital Metler con una precisión de 0.01 g y luego se colocaron en un mortero con aproximadamente 1 g de arena de playa esterilizada y 10 mL de agua de mar estéril, que se utilizó para facilitar la molienda de la mayoría de las larvas. Después de moler la muestra, se diluyó secuencialmente en tubos de ensayo con agua de mar estéril a 1 × 10^2, 10^3 y 10^4. Luego, se colocaron 100 µL de la dilución relevante en duplicado en placas de Petri que contenían agar de soja tríptica (TSA, Difco) o agar tiosulfato-citrato-bilis-sucrosa (TCBS, Difco) o en CHROMagar™ *Vibrio*, y se incubaron durante 24–48 horas a 30 °C. Posteriormente, se registró el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada placa. Las diluciones se basaron en obtener >20 y <200 colonias por placa. La identificación bacteriana se realizó y las características bioquímicas se examinaron utilizando un Kit API 20E [15].

Métodos de PCR

Se extrajo el ADN de larvas enteras fijadas en alcohol al 95% utilizando un kit de ADN de tejido E.Z.N.A. de Omega (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, cada muestra de 1 g se trituró utilizando un pistón de microcentrífuga. Aproximadamente 200 mg del tejido se transfirieron a un tubo Eppendorf limpio de 1.5 mL, luego se añadieron 500 µL de buffer de lisis de tejido (TL, Omega, Bio-Tek E.Z.N.A.) y 25 µL de solución de proteasa de Omega Biotek (OB, Omega, Bio-Tek E.Z.N.A). La muestra se agitó en vórtice y se incubó en un termobloque a 55 °C durante aproximadamente 3 horas, con agitación cada 30 minutos. El ARN se eliminó añadiendo 4 µL de RNasa A (100 mg/mL), mezclando y manteniendo la muestra a temperatura ambiente durante 2 minutos. La muestra se centrifugó a 13,500 RPM durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL. A esto se le añadieron 220 µL de buffer BL (Omega, Bio-Tek E.Z.N.A.), se agitó en vórtex y se incubó a 70 °C durante 10 minutos. Luego, se añadieron 220 µL de etanol al 100% y se agitó; los contenidos se pasaron a través de una columna HiBind® DNA Mini en un tubo de recolección de 2 mL. Las columnas se centrifugaron a 13,500 RPM durante 1 minuto y el filtrado se descartó. Posteriormente, se añadieron 500 µL de buffer HBC (Omega, Bio-Tek E.Z.N.A.), diluido con isopropanol al 100%, a la columna, y la muestra se centrifugó a 13,500 RPM durante 30 segundos. El filtrado se descartó, la columna se lavó dos veces con 700 µL de buffer de lavado de ADN diluido con etanol al 100% y la muestra se centrifugó a 13,500 RPM durante 30 segundos. El filtrado se descartó y este paso se repitió. La columna se centrifugó a 13,500 RPM durante 2 minutos para secarla. La columna seca se colocó en un nuevo tubo Eppendorf libre de nucleasas de 1.5 mL y se añadieron 100 µL de buffer de elución, previamente calentado a 70 °C. La muestra se dejó reposar durante 2 minutos antes de centrifugarla a 13,500 RPM durante 1 minuto. Este paso de elución se repitió. El ADN eluido se almacenó a −20 °C hasta su uso.

El ARN se extrajo de larvas enteras, tejidos u órganos fijados en alcohol al 90% siguiendo el protocolo del fabricante (Omega, Bio-Tek E.Z.N.A. Total RNA Kit (TRK)). Aproximadamente 200 mg de tejido se trasladaron a un tubo Eppendorf limpio de 1.5 mL. A esto se le añadieron 700 µL de Buffer de Lisis TRK (Omega, Bio-Tek E.Z.N.A) y el tubo se dejó a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas con agitación vórtex cada 30 minutos. La muestra se centrifugó a 13,500 RPM durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL al que se le añadieron 420 µL de etanol al 70%. Después de agitar para mezclar bien, los contenidos se pasaron a través de una Columna HiBind® RNA Mini en un tubo de recolección de 2 mL. Las columnas se centrifugaron a 13,500 RPM durante 1 minuto y el filtrado se descartó. Posteriormente, se añadieron 500 µL de Buffer de Lavado de ARN I (Omega, Bio-Tek E.Z.N.A) a la columna y la muestra se centrifugó a 13,500 RPM durante 30 segundos. El filtrado se descartó y la columna se lavó dos veces con 500 µL de Buffer de Lavado de ARN II diluido con etanol al 100%. La columna se centrifugó a 13,500 RPM durante 1 minuto para secarla. El filtrado se descartó y este paso se repitió. La columna se centrifugó a 13,500 RPM durante 2 minutos para secarla completamente. La columna seca se colocó en un nuevo tubo Eppendorf libre de nucleasas de 1.5 mL y se añadieron 70 µL de agua libre de nucleasas. La muestra se centrifugó a 13,500 RPM durante 2 minutos. Este paso de elución se repitió. El ARN eluido se almacenó a −70 °C hasta su uso. Los patógenos que se analizaron se enumeran a continuación.

Se realizaron análisis de PCR para los siguientes patógenos en muestras de animales: Hepanhamaparvovirus (DHPV) [16]; *Macrobrachium* bidnavirus (MrBdv) [17]; Virus Iridiscente de Decápodos 1 (DIV1) [18]; Virus del Síndrome de Mancha Blanca

(WSSV) [19]; Virus de Necrosis Hipodérmica e Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) [20–23]; Virus de Camarón de Wenzhou 8 (WzSV8) [24]; Nodavirus de *P. vannamei* [25]; Nodavirus de Mortalidad Encubierta (CMNV) [26]; Virus de Mionecrosis Infecciosa (IMNV) [27]; Virus de la Cabeza Amarilla (YHV) [28]; Virus Asociado a Branquias (GAV) [28]; Virus del Síndrome de Taura (TSV) [29,30]; Nodavirus de *Macrobrachium* (MrNV) [31]; Virus Extra Pequeño (XSV) asociado generalmente con MrNV [32]; *Spiroplasma* [33]; *Vibrio* spp. (fragmento del gen 16S rRNA específico de *Vibrio*) [34]; *V. parahaemolyticus* (gen de colagenasa) [35]; *V. parahaemolyticus* (gen vhvp-1 y gen vhvp-2) [36]; *V. parahaemolyticus* (gen tdh) [37]; *V. harveyi* (gen vhh) [37]; bacterias similares a *Rickettsia* (RLB) [38]; bacterias de Necrosis Hepatopancreática (NHP-B) [39]; *Ecytonucleospora* (*Enterocytozoon*) *hepatopenaei* (EHP) [40]; Microsporidia no-EHP [41]; enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) [42]; y Haplosporidia [43].

Además, se realizó un cribado de los siguientes patógenos en bacterias aisladas: *Vibrio* spp. (fragmento del gen 16S rRNA específico de *Vibrio*) [34]; *V. parahaemolyticus* (gen de colagenasa) [35]; *V. parahaemolyticus* (gen vhvp-1 y gen vhvp-2) [36]; *V. parahaemolyticus* (gen tdh) [37]; *V. harveyi* (gen vhh) [37]; y gen toxR [44].

Histopatología

Para el análisis histológico, las muestras se prepararon siguiendo los procedimientos descritos por Bell y Lightner [45]. En resumen, las larvas se fijaron en alcohol de Davidson, formalina y ácido acético (AFA) utilizando al menos 1 g de larvas de cada tanque. Estas se fijaron durante al menos 24 horas antes de su procesamiento para la inclusión de tejidos y secciones histológicas de rutina. Las secciones de tejido de 5 µm de grosor se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y con la tinción de Gram de Twort para diferenciar bacterias Gram-positivas de Gram-negativas (CP Lab Chemicals, Novato, CA, EE. UU.). Para cada muestra de larvas recolectadas

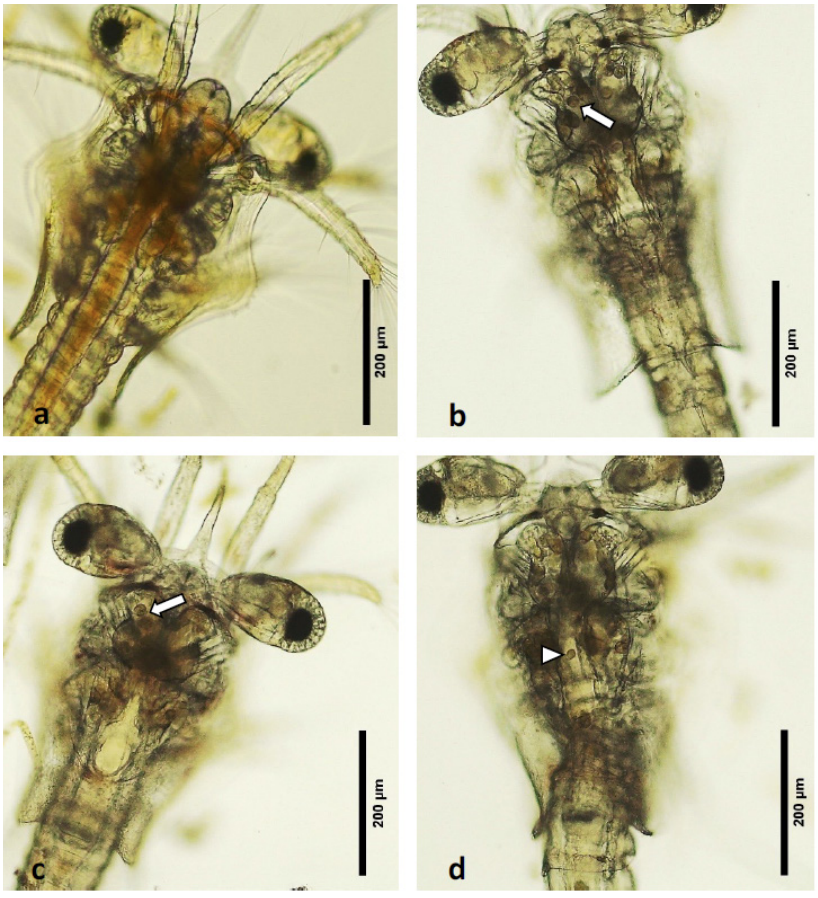


Figura 1. Montaje fresco de larvas de zoea 2. (a) Una larva saludable con un tracto digestivo normal. (b–d) Larva afectada, observe la falta de contenido alimenticio y la presencia de "bolitas" (flechas) en el hepatopáncreas, así como en el intestino superior (cabeza de flecha).

Macrobrachium rosenbergii. *Aquaculture*, 568, 739340.
18. Qiu, L., Chen, M.M., Wan, X.Y., Li, C., Zhang, Q.L., Wang, R.Y., Cheng, D.Y., Dong, X., Yang, B., Wang, X.H., *et al.* (2017) Characterization of a new member of Iridoviridae, Shrimp Hemocyte Iridescent Virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Sci. Rep.*, 7, 11834.
19. Lo, C.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su, M.S., Wang, C.H., *et al.* (1996) White Spot Syndrome Baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Organ.*, 27, 215–225.
20. Nunan, L.M., Poulos, B.T. y Lightner, D.V. (2000) Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, 2, 319–328.
21. Tang, K.F.J., Durand, S.V., White, B.L., Redman, R.M., Pantoja, C.R. y Lightner, D.V. (2000) Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, 190, 203–210.
22. Tang, K.F.J. y Lightner, D.V. (1999) A yellow-head virus gene probe: Application to *in situ* hybridization and determination of its nucleotide sequence. *Dis. Aquat. Organ.*, 35, 165–173.
23. Tang, K.F.J., Navarro, S.A. y Lightner, D.V. (2007) PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and the virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Organ.*, 74, 165–170.
24. Srisala, J., Thaiue, D., Sanguanrut, P., Aldama-Cano, D.J., Flegel, T.W. y Sritunyalucksana, K. (2021) Potential universal PCR method to detect decapod hepanhamaparvovirus (DHPV) in crustaceans. *Aquaculture*, 541, 736782.
25. Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Redman, R.M. y Lightner, D.V. (2007) Development of *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Organ.*, 75, 183–190.
26. Zhang, Q., Xu, T., Wan, X., Liu, S., Wang, X., Li, X., Dong, X., Yang, B. y Huang, J. (2017) Prevalence and distribution of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustacean. *Virus Res.*, 233, 113–119.
27. Poulos, B.T., Lightner, D.V. (2006) Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Dis. Aquat. Org., 73, 69–72.
28. Mohr, P.G., Moody, N.J., Hoad, J., Williams, L.M., Bowater, R.O., Cummins, D.M., Cowley, J.A. y Crane, M.S. (2015) New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, 115, 263–268.
29. Nunan, L.M., Poulos, B.T. y Lightner, D.V. (1998) Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Dis. Aquat. Organ.*, 34, 87–91.
30. Navarro, S.A., Tang, K.F.J. y Lightner, D.V. (2009) An improved Taura syndrome virus (TSV) RT-PCR using newly designed primers. *Aquaculture*, 293, 290–292.
31. Gangnonngiw, W., Bunnontae, M., Phiwsaiya, K., Senapin, S. y Dhar, A.K. (2020) In experimental challenge with infectious clones of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV), MrNV alone can cause mortality in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Virology*, 540, 30–37.
Senapin, S., Jaengsanong, C., Phiwsaiya, K., Prasertsri, S., Laisutisan, K., Chuchird, N., Limsuwan, C. y Flegel, T.W. (2012) Infections of MrNV (*Macrobrachium rosenbergii* nodavirus) in cultivated whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* in Asia. *Aquaculture*, 338–341, 41–46.
33. Nunan, L.M., Pantoja, C.R., Salazar, M., Aranguren, F. y Lightner, D.V. (2004) Characterization and molecular methods for detection of a novel *Spiroplasma* pathogenic to *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Organ.*, 62, 255–264.
34. Yong, L., Guanpin, Y., Hualei, W., Jixiang, C., Xianming, S., Guiwei, Z., Qiwei, W. y Sun, X. (2006) Design of *Vibrio* 16S rRNA gene specific primers and their application in the analysis of seawater *Vibrio* community. *J. Ocean. Univ. China*, 5, 157–164.
35. Khimmakthong, U. y Sukkarun, P. (2017) The spread of

Tabla 1. Resultados de PCR de ADN, ARN, bacterias, Microsporidia EHP y no EHP, y Haplosporidia en 1 g de zoea de tanques tanto LBS como saludables.

	Virus de ADN									
	HPV [1]	MrBdv [2]	DIV [3]	WSSV [4]	IHHNV [5] 309 FR	IHHNV [5] 392 F/R	IHHNV [5] 389 F/R	IHHNV [5] 77012/773	Virus *[6]	EVE **[6]
LBS	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)
Saludable	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)

	Virus de ARN								
	WzSV8 [7]	PvNV [8]	CMNV [9]	IMNV [10]	YHV [11]	GAV [12]	TSV [13]	MrNV [14]	XSV [15]
LBS	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
Saludable	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)

	Bacterias / Microsporidia / Haplosporidia												
	Spirop [16]	*Vibrio* [17]	*Vp* [18]	*Vp* (tdh) [19]	*Vp* (vhp 1) [20]	*Vp* (vhp 2) [20]	*Vh* (vhh) [21]	AHPND [22]	RLB [23]	NHP [24]	EHP [25]	Microsp [26]	Haplosp [27]
LBS	0/2 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)
Saludable	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)

1 Hepanhamaparvovirus (DHPV) [16]; 2 *Macrobrachium* Bidnavirus (MrBdv) [17]; 3 Virus Iridiscente de Decápodos 1 (DIV1) [18]; 4 Virus del Síndrome de Manchas Blancas (WSSV) [19]; 5 Virus de Necrosis Hipodérmica e Hematopoyética (IHHNV) [20–23]; 6 IHHNV * como infeccioso o ** EVE; 7 Virus del Camarón de Wenzhou 8 (WzSV8) [24]; 8 Nodavirus de *P. vannamei* [25]; 9 Nodavirus de Mortalidad Encubierta (CMNV) [26]; 10 Virus de Mionecrosis Infecciosa (IMNV) [27]; 11 Virus de Cabeza Amarilla (YHV) [28]; 12 Virus Asociado a Branquias (GAV) [28]; 13 Virus del Síndrome de Taura (TSV) [29,30]; 14 Nodavirus de *Macrobrachium* (MrNV) [31]; 15 Virus Extra Pequeño (XSV) generalmente asociado con MrNV [32]; 16 *Spiroplasma* [33]; 17 *Vibrio* spp. fragmento del gen 16S rRNA específico de *Vibrio* [34]; 18 *V. parahaemolyticus*. Gen colagenasa [35]; 19 *V. parahaemolyticus*. Genes vhvp-1 y vhvp-2 [36]; 20 *V. parahaemolyticus.* Gen tdh [37]; 21 *V. harveyi*. Gen vhh [37]; 22 Enfermedad Aguda de Necrosis Hepatopancreática (AHPND) [42]; 23 Bacterias Tipo *Rickettsia* (RLB) [38]; 24 Bacterias de Hepatopancreatitis Necrótica (NHP-B) [39]; 25 *Ecytonucleospora (Enterocytozoon) hepatopenaei* (EHP) [40]; 26 Microsporidia no EHP [41]; 27 Haplosporidia [43].

de cada tanque, se preparó un bloque, cada bloque conteniendo aproximadamente 1 g de zoea en los estadios 2–3. Se cortaron cuatro secciones de tejido de cada bloque de parafina.

Resultados

La observación microscópica de las larvas reveló la presencia de "bolitas" (esferas) en el hepatopáncreas (Figura 1a–d). En las preparaciones frescas de zoea 2–3 sanos, se observó material algal en el tracto digestivo, que le daba una coloración marrón-dorada (Figura 1a). En comparación, las larvas afectadas/enfermas presentaban un tracto digestivo vacío y material de forma redonda que aparecía como gotas de lípido (Figura 1b–d) y falta de alimento en el intestino. Este signo clínico general es el que usualmente describen los técnicos y biólogos de criaderos de camarones como el conocido "Síndrome de las Bolitas".

Resultados de PCR

El análisis de PCR de las muestras de zoea tanto saludables como afectadas resultó negativo para diecisiete patógenos conocidos de camarones, incluidos DHPV, MrBdv, SHIV, WSSV, PvNV, CMNV, IMNV, YHV, GAV, TSV, MrNV, XSV, *Spiroplasma*, NHPB, EHP, AHPND y Haplosporidia (Tabla 1). Sin embargo, las zoea aparentemente sanas fueron positivas para IHHNV EVE (2/2), WzSV8/PvSV (2/2), RLB (1/2) y Microsporidia (1/2). En comparación, las zoea afectadas por LBS fueron positivas para IHHNV EVE (1/2), para *Vibrio* spp. (2/2), para RLB (2/2) y para Microsporidia (1/2). En resumen, la única diferencia entre los dos conjuntos de muestras fue la detección de *Vibrio* en las zoea afectadas por LBS y WzSV8 en las zoea sanas.

Microbiología

Las concentraciones de bacterias heterotróficas totales (TSA) y *Vibrio* presuntivos (TCBS y CHROMagar™ *Vibrio*) se muestran en la Tabla 2. Las concentraciones de bacterias totales en las zoea afectadas fueron casi un orden de magnitud superiores a las determinadas para la muestra de zoea sanas. Los valores de *Vibrio* presuntivos fueron casi dos órdenes de magnitud más altos en las zoea afectadas que en las zoea sanas. Los *Vibrio* presuntivos representaron el 17% y el 6% de la población total de bacterias en las zoea enfermas y sanas, respectivamente. Las colonias verdes (en TCBS) y las colonias moradas (en CHROMagar™ *Vibrio*) representaron el 0,2% y el 82% de las recuperadas de las zoea afectadas, mientras que se encontró una imagen inversa del 56% y el 1% en el análisis de las zoea sanas (Tabla 2).

Se aisló un total de once cepas de las zoea afectadas por LBS y tres de las zoea sanas (Tabla 3a). El perfil bioquímico de las once cepas recuperadas de las zoea afectadas identificó seis como *V. alginolyticus*, dos como *V. fluvialis* y una como *V. vulnificus*, una como *Aeromonas* (no determinada) y una como *Pasteurella* (no determinada). De las tres cepas aisladas de las zoea sanas (Tabla 3a), una cepa fue identificada como *V. alginolyticus*, una como *V. fluvialis* y una como *Aeromonas*. Curiosamente, las 14 cepas resultaron positivas para *Vibrio* por PCR, lo que sugiere que el 27% de los resultados devueltos por los perfiles bioquímicos API 20E fueron falsos negativos. Ninguna

Tabla 2. Resultados de microbiología de zoeas afectadas y saludables.

		UFC/g de larvas				
		TSA [1]	TCBS [2]	Verde [3]	CHROMagar [4]	Púrpura [5]
LBS	Tanque 7	$1.20E \times 10^7$	4.40×10^5	1.00×10^4	4.80×10^5	2.40×10^5
	Tanque 19	1.36×10^7	4.00×10^6	0.00×10^0	3.90×10^6	3.40×10^6
	Promedio	**1.28×10^7**	**2.22×10^6**	**5.00×10^3**	**2.19×10^6**	**1.82×10^6**
	d.e.	**1.13×10^6**	**2.52×10^6**	**7.07×10^3**	**2.42×10^6**	**2.23×10^6**
			17.3% [6]	**0.2% [7]**		**83.1% [8]**
Saludable	Habitación 2	1.46×10^6	7.60×10^4	7.60×10^4	6.20×10^4	2.00×10^3
	Habitación 3	8.90×10^5	6.10×10^4	0.00×10^0	5.00×10^4	1.00×10^0
	Promedio	**1.18×10^6**	**6.85×10^4**	**3.80×10^4**	**5.60×10^4**	**1.00×10^3**
	d.e.	**4.03×10^5**	**1.06×10^4**	**5.37×10^4**	**8.49×10^3**	**1.41×10^3**
			5.8% [6]	**55.5% [7]**		**1.8% [8]**

1 Agar Soytrypticase (TSA, Difco); 2 Agar tiosulfato-citrato-bilis-sacarro (TCBS, Difco); 3 Colonias verdes en TCBS; 4 CHROMagarTM *Vibrio*; 5 Colonias moradas en CHROMagarTM *Vibrio*; 6 Porcentaje de *Vibrio* presuntivos (TCBS) de la población bacteriana total; 7 Porcentaje de colonias verdes de la población total de *Vibrio* presuntivos (TCBS); 8 Porcentaje de colonias moradas de la población total de *Vibrio* presuntivos en CHROMagarTM *Vibrio*.

de las 14 bacterias dio positivo para los genes específicos de *V. parahaemolyticus*, incluidos ToxR, Vhp-1 y Vhp-2, que codifican las proteínas altamente virulentas de *V. parahaemolyticus* (Tabla 3a). Las cepas identificadas como *Aeromonas* y *V. fluvialis* por el API 20E (LBS-9 y H-2) pero como *Vibrio* por PCR resultaron positivas para Pir AB (AHPND). La cepa H-3 identificada por API 20E como *A. hydrophila* fue identificada positivamente como *V. harveyi* por PCR.

La caracterización bioquímica de las 13 cepas de *Vibrio* aisladas se muestra en la Tabla 3b. Esta tabla está dividida entre dos tipos de *Vibrio* aislados de las zoea afectadas por LBS (*V. alginolyticus* y *Vibrio* spp. identificados por API 20E) y tres especies de *Vibrio* aisladas de las zoea sanas. La disponibilidad de fermentación/oxidación de arabinosa fue la principal diferencia entre *Vibrio* spp. aislados de zoea con LBS y los otros dos grupos de bacterias, a saber, *V. alginolyticus* de LBS y *Vibrio* spp. de zoea sanas. Por otro lado, *V. alginolyticus* de zoea afectadas por LBS puede diferenciarse de los otros dos grupos por su incapacidad para fermentar.

Histopatología

Ocho diapositivas de microscopía teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) fueron preparadas, cada una conteniendo aproximadamente 120 larvas de zoea 2–3 en estado normal y de tanques enfermos. Estas diapositivas fueron examinadas exhaustivamente para identificar diferencias histopatológicas entre larvas saludables y enfermas.

Observaciones en larvas de zoea 2–3 saludables:

Contenido del tracto digestivo: las larvas de zoea 2–3 saludables exhibieron restos de alimento dentro de sus tractos digestivos. El sistema digestivo en esta etapa aún está en desarrollo, y la presencia de restos de alimento indica procesos normales de alimentación y digestión.

Desarrollo del hepatopáncreas: el desarrollo temprano del hepatopáncreas se evidenció a través de la presencia de lóbulos laterales, que son precursores del hepatopáncreas completamente funcional [47]. Estos lóbulos eran claramente visibles en las secciones de tejido (Figura 2a,b).

Integridad de la membrana peritrófica: se observó una membrana peritrófica intacta en las larvas saludables. Esta membrana juega un papel crucial en la protección del epitelio digestivo y en la facilitación de la digestión.

Material algal: el material algal consumido por las larvas en esta etapa se vio como pequeños restos marrones dentro del tracto digestivo (Figura 2c,d). Esto indica que las larvas estaban alimentándose activamente de materia algal, lo cual es típico para esta etapa de desarrollo.

Vibrio parahaemolyticus in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology. *Microb. Pathog.*, 113, 107–112.
36. Liu, S., Wang, W., Jia, T., Xin, L., Xu T-t Wang, C., Xie, G., Luo, K., Li, J., Kong, J. y Zhang, Q. (2023) *Vibrio parahaemolyticus* becomes lethal to post-larvae shrimp via acquiring novel virulence factors. *Microbiol. Spectr.*, 11, e0049223.
37. Wang, Z., Aweya, J.J., Yao, D., Zheng, Z., Wang, C., Zhao, Y., Li, S. y Zhang, Y. (2022) Taurine metabolism is modulated in *Vibrio*-infected *Penaeus vannamei* to shape shrimp antibacterial response and survival. *Microbiome*, 10, 213.
38. Nunan, L.M., Poulos, B., Redman, R., Groumellec, M.L. y Lightner, D.V. (2003) Molecular detection methods developed for a systemic *Rickettsia*-like bacterium (RLB) in *Penaeus monodon* (Decapoda: Crustacea). *Dis. Aquat. Organ.*, 53, 15–23.
39. Aranguren, L.F., Tang, K.F.J. y Lightner, D.V. (2010) Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, 307, 187–192.
40. Jaroenlak, P., Sanguanrut, P.,Williams, B.A.P., Stentiford, G.D., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K. y Itsathitphaisarn, O. (2016) A nested PCR assay to avoid false positive detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environmental samples in shrimp farms. *PLoS ONE*, 11, e0166320.
41. Pasharawipas, T. y Flegel, T.W. (1994) A specific DNA probe to identify the intermediate host of a common microsporidian parasite of *Penaeus merguiensis* and *P. monodon*. *Asian Fish. Sci.*, 7, 157–167.
42. Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Mavichak, R., Proespraiwong, P. y Flegel, T.W. (2015) AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquacult Rep.*, 2, 158–162.
43. Utari, H.B., Senapin, S., Jaengsanong, C., Flegel, T.W. y Kruatrachue, M. (2012) A haplosporidian parasite associated with high mortality and slow growth in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* cultured in Indonesia. *Aquaculture*, 366–367, 85–89.
44. Aguilera-Rivera, D., Prieto-Davó, A., Rodríguez-Fuentes, G., Escalante-Herrera, K.S. y Gaxiola, G. (2019) A vibriosis outbreak in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc and clear seawater. *J. Invertebr. Pathol.*, 167, 17246.
45. Bell, T.A. y Lightner, D.V. (1998) *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. The World Aquaculture Society: Baton Rouge, LA, USA. ISBN 0-935868-37-2.
46. Thompson, J.R., Randa, M.A., Marcelino, L.A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E. y Polz, M.F. (2004) Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 4103–4110.
47. Abubakr, M.A. y Jones, D.A. (1992) Functional morphology and ultrastructure of the anterior mid-gut diverticulae of larvae of *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 (Decapoda, Natantia). *Crustaceana*, 62, 142–158.
48. Intriago, P., Medina, A., Cercado, N., Arteaga, K., Montenegro, A., Burgos, M., Espinoza, J., Brock, J.A., McIntosh, R. y Flegel, T. (2023) Passive surveillance for shrimp pathogens in *Penaeus vannamei* submitted from 3 Regions of Latin America. *Aquac. Rep.*, 36, 102092.
49. Soto-Rodriguez, S.A., Lozano-Olvera, R., Palacios-Gonzalez, D.A., Bolan-Mejia, C. y Rendon-Aguilar, K.G. (2019) Characterization and growth conditions of *Vibrio parahaemolyticus* strains with different virulence degrees that cause acute hepatopancreatic necrosis disease in *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.*, 50, 1002–1015.
50. Overman, T.L., Kessler, J.F. y Seabolt, J.P. (1985) Comparison of API 20E, API rapid E, and API rapid NFT for identification of members of the family Vibrionaceae. *J. Clin. Microbiol.*, 22, 778–781.
51. Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., Toti, L., Ottaviani, D., Pruzzo, C., Serratore, P., Fischetti, R. y Goffredo, E. (2007) *Vibrio parahaemolyticus* Working Group. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Appl. Microbiol.*, 102, 229–237.

Tabla 3. (a). Caracterización de bacterias aisladas de zoeas afectadas y saludables. (b). Caracterización de bacterias aisladas de zoeas afectadas y saludables mediante API 20E.

Cepa	Fecha	AHPND [1]	toxR [2]	*Vibrio* [3]	*Vibrio* [4]	Vhp-1 [5]	Vhp-2 [5]	Vhp-3 [5]	Vp [6]	Vhh [7]	TCBS	CHROMagar	API 20NE code	Identificado como
LBS-8	9/18/2023	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Yellow	Blanco	4047124	*V. alginolyticus* 97.8%
LBS-1	9/18/2023	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Yellow	Blanco	4047124	*V. alginolyticus* 97.8%
LBS-10	9/18/2023	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Yellow	Blanco	4047124	*V. alginolyticus* 97.8%
LBS-11	9/18/2023	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Yellow	Blanco	4047124	*V. alginolyticus* 96.5%
LBS-6	9/18/2023	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Yellow	Blanco	4047124	*V. alginolyticus* 85.9%
LBS-5	9/18/2023	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Yellow	Blanco	4045120	*V. alginolyticus* 80.2%
LBS-2	9/18/2023	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Yellow	Claro	1040127	*V. fluvialis* 76.9%
LBS-12	9/18/2023	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Yellow	Púrpura	0040027	*V. fluvialis* 63.9%
LBS-4	9/18/2023	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Green	Turquesa	5046005	*V. vulnificus* 99.9%
LBS-9	9/18/2023	+	-	+	+	-	-	-	-	-	Yellow	Blanco	0044427	*Aeromonas hydrophila / caviae / sobria* 1 71.1%
LBS-7	9/18/2023	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Yellow	Púrpura	0044526	*Pasteurella multocida* 2 98.4%
H-1	9/23/2023	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Yellow	Blanco	4147125	*V. alginolyticus* 92.1%
H-2	9/23/2023	+	-	+	+	-	-	-	-	-	Yellow	Blanco	1042025	*V. fluvialis* 84.1%
H-3	9/23/2023	-	-	+	+	-	-	-	-	+	Yellow	Blanco	5044165	*Aeromonas hydrophila / caviae / sobria* 1 90.6%

Las cepas identificadas como zoeas LBS fueron aisladas de zoeas afectadas por LBS, y las identificadas como saludables de zoeas aparentemente saludables o no afectadas. 1 Enfermedad Aguda de Necrosis Hepatopancreática (AHPND) [42]; 2 Gen toxR [44]; 3 *Vibrio* spp. [46]; 4 Fragmento del gen 16S rRNA específico de *Vibrio* [34]; 5 Gen de proteína altamente virulenta de *Vibrio* [36]; 6 *V. parahaemolyticus* [35]; 7 *V. harveyi* (vhh) [37]. - como negativo + como positivo. a Cepas positivas/total de cepas.

Ausencia de células desprendidas: no se observaron materiales celulares desprendidos en el lumen del sistema digestivo en desarrollo de las larvas saludables. La ausencia de células desprendidas indica una falta de degeneración tisular o patología dentro del tracto digestivo (Figura 2c,d).

Desprendimiento de células epiteliales y necrosis: la mayoría de las zoeas afectadas por LBS mostraron desprendimiento de células epiteliales dentro del lumen y pérdida estructural debido a necrosis en el hepatopáncreas (Figura 3a–c). Este desprendimiento varió de mínimo a severo y contrastó de manera pronunciada con los epitelios intactos en las larvas saludables (Figura 3d–f).

Epitelio del intestino medio: en las larvas afectadas por LBS, se observó un notable desprendimiento de células epiteliales del intestino medio hacia el lumen. Esta característica patológica estaba ausente en las larvas saludables, donde el epitelio del intestino medio permanecía intacto.

Membrana peritrófica: se observaron células dentro de la membrana peritrófica en

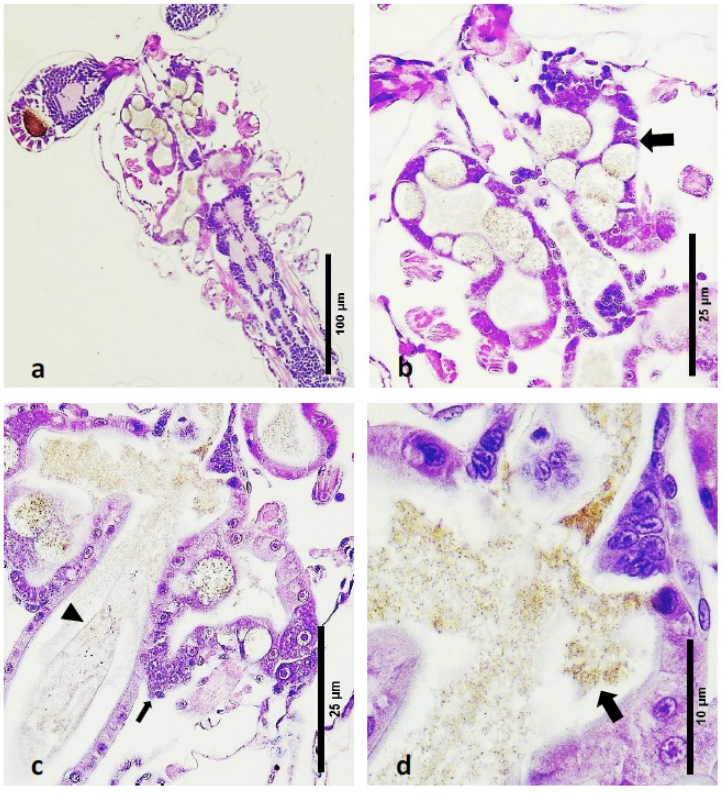


Figura 2. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina de larvas normales y afectadas de zoea 2. (a) Larva de zoea 2 normal. (b) Vista más cercana de la imagen a, mostrando la formación temprana del hepatopáncreas (flecha gruesa). Observe el contenido alimenticio del sistema digestivo y la ausencia de restos de tejido. (c) Lóbulos que formarán el hepatopáncreas (flecha delgada). Note la membrana peritrofica intacta y el contenido alimenticio (cabeza de flecha). (d) Vista más cercana del tracto digestivo con partículas marrones de posibles microalgas (flecha gruesa).

las larvas afectadas por LBS (Figura 3g). Esto indica una disrupción en el papel protector de la membrana peritrófica.

Bacterias Gram-negativas: la tinción de Twort reveló la presencia de bacterias Gram-negativas, con o sin material desprendido, en las larvas afectadas (Figura 4a,b). Este hallazgo fue consistente con los análisis microbiológicos que mostraron concentraciones más altas de *Vibrio* spp. en las zoeas enfermas.

Diferencias intestinales: se observaron diferencias significativas en el área intestinal entre las larvas normales y las afectadas por LBS. En las larvas normales, los intestinos parecían saludables, sin sobrecrecimiento bacteriano y con membranas peritróficas intactas (Figura 2c). En contraste, las larvas afectadas por LBS presentaban una abundancia de bacterias Gram-negativas y membranas peritróficas comprometidas (Figura 4d).

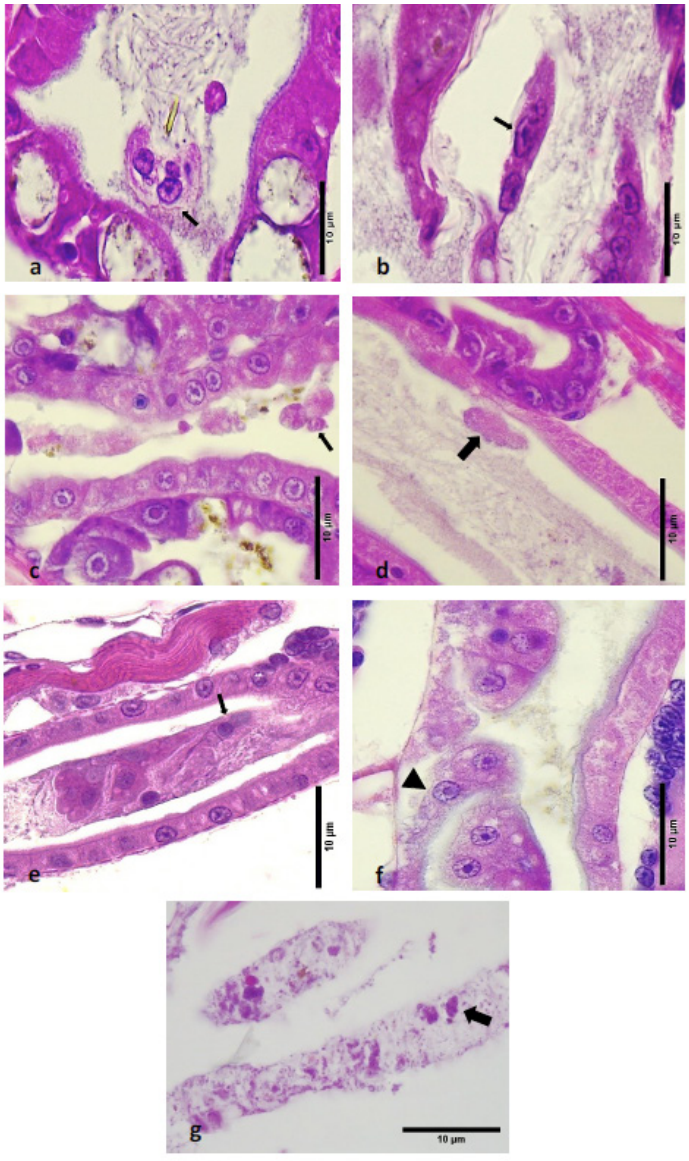


Figura 3. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina de larvas normales y afectadas de zoea 2. (a) Hepatopáncreas de larvas de zoea 2–3 afectadas. Observe el desprendimiento de células dentro del lumen (flecha delgada). (b) Pérdida estructural debido a necrosis en el hepatopáncreas (flecha delgada). (c) Área del hepatopáncreas y del intestino, presencia de material descamado (flecha delgada). (d) Descamación de células epiteliales del intestino medio en el lumen, observe el exterior de la membrana peritrofica (flecha gruesa). (e,f) Área del intestino con material descamado severo (flecha delgada), incluyendo la membrana basal (cabeza de flecha). (g) Heces con material celular descamado (flecha gruesa).

52. Fabbro, C., Cataletto, B. y Del Negro, P. (2010) Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* through biochemical and molecular-based methodologies in coastal waters of the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *FEMS Microbiol. Lett*., 307, 158–164.
53. Lydon, K.A., Kinsey, T., Le, C., Gulig, P.A. y Jones, J.L. (2021) Biochemical and virulence characterization of *Vibrio vulnificus* isolates from clinical and environmental sources. *Front. Cell Infect. Microbiol*., 11, 637019.
54. Vivijs, B., Moons, P., Aertsen, A. y Michiels, C.W. (2014) Acetoin synthesis acquisition favors *Escherichia coli* growth at low pH. *App. Environ. Microb*., 80, 6054–6061.
55. Oh, Y.T., Kim, H.Y., Kim, E.J., Go, J., Hwang, W., Kim, H.R., Kim, D.W. y Yoon, S.S. (2016) Selective and efficient elimination of *Vibrio cholerae* with a chemical modulator that targets glucose metabolism. *Front. Cell. Infect. Microbiol*., 6, 156.
56. Muhammad, F., Zhang, Z.F., Shao, M.Y., Dong, Y.P. y Muhammad, S. (2012) Ontogenesis of digestive system in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Crustacea: Decapoda). *Ital. J. Zool*., 79, 77–85.
Sun, J.,Wang, X.Y., Yang, Q., Xie, G.S., Dong, X. y Huang, J. (2019) Case studies: Pathogenic agent and microbiome analysis of zoea of *Litopenaeus vannamei* suffering from an unknown disease. *Progress. Fish. Sci*., 40, 134–144. (In Chinese).
58. Wolkenfelt, B. y Blonk, R. (2021) Balanced shrimp breeding in Ecuador, for now and the future. In: *Proceedings of the Aqua Expo 2021, World Aquaculture Conference and Trade Show, Cámara Nacional de Acuacultura, Guayaquil, Ecuador, 25–28 October 2021.*
59. Hameed, A.S.S. (1993) A study of the aerobic heterotrophic bacterial flora of hatchery-reared eggs, larvae and postlarvae of *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 117, 195–204.
60. Garcia, A.T. y Olmos, J.S. (2007) Quantification by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria associated with *Litopenaeus vannamei* larvae in Mexican shrimp hatchery. *Aquaculture*, 262, 211–218.
61. Intriago, P., Espinoza, J., Medina, A., Altamirano, L., Enriquez, X., Sanchez, A., Navarrete, A., Alvarez, E. y Forestieri, J. (2018) Microbiological dynamics of a *Litopenaeus vannamei* hatchery in Ecuador. In: *Proceedings of the Aqua Expo 2018, World Aquaculture Conference and Trade Show, Cámara Nacional de Acuacultura, Guayaquil, Ecuador, 15–18 October 2018.*
62. Kurmaly, K., Jones, D.A., Yule, A.B. y East, J. (1989) Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae, from protozoea 1 to postlarva 1, on live feeds, artificial diets and a combination of both. *Aquaculture*, 81, 27–45.
63. Soto-Rodriguez, S.A., Simoes, N., Jones, D.A., Roque, A. y Gómez-Gil, B. (2003) Assessment of fluorescent labeled bacteria (FLB) for evaluation of *in vivo* uptake of bacteria (*Vibrio* spp.) by crustacean larvae. *J. Microbiol. Methods*, 52, 101–114.
64. Aguirre-Guzman, G., Vazquez-Juarez, R. y Ascencio, F. (2001) Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. *J. Invert. Pathol*., 78, 215–219.
65. Intriago, P. y Jimenez, R. (1997) The effect of bacteria isolated from an outbreak of haemocytic enteritis in pond reared shrimp in *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae in Ecuador. Unpublished Internal Report Aqualab 1997, Ayangue-Peninsula de Santa Elena, Ecuador, 1997.
66. Carella, F. y Sirri, R. (2017) Editorial: Fish and shellfish pathology. *Front. Mar. Sci.*, 4, 375.
67. Reyes, G., Andrade, B., Betancourt, I., Panchana, F., Solorzano, R., Preciado, C., Sorroza, L., Trujillo, L.E. y Bayot, B. (2023) Microbial profiles of *Penaeus vannamei* larvae in low survival hatchery tanks affected by vibriosis. *Peer J*., 11, e15795.

Ausencia de bolitas: durante este estudio, no se observaron bolitas (esferas) en ninguna de las diapositivas histológicas, y dichas estructuras no están documentadas en la literatura [1,2]. Se sugiere que las bolitas podrían ser de naturaleza lipídica, dado que la preparación de muestras de tejido para histología implica el procesamiento a través de varios solventes que podrían potencialmente disolver estructuras basadas en lípidos.

Discusión

El presente estudio describe las lesiones histopatológicas, los resultados de PCR y los análisis microbiológicos de muestras de zoea de *P. vannamei* recolectadas en dos criaderos diferentes: uno con un brote de LBS y otro con animales aparentemente sanos. De todos los patógenos analizados por PCR, las únicas diferencias clave entre las zoeas afectadas por LBS y las saludables fueron la detección de *Vibrio* y una mayor abundancia de bacterias similares a *Rickettsia* (RLB) en las zoeas enfermas. La presencia del virus WzSV8 en las zoeas saludables requiere más estudio; este virus de ARN se ha encontrado en una amplia gama de ambientes y regiones, incluyendo la población silvestre de reproductores, y su efecto en la producción de peneidos necesita ser objeto de estudios adicionales [48].

Los análisis microbiológicos mostraron que el número total de bacterias cultivables (TSA) era un orden de magnitud mayor en las zoeas afectadas, y el número de *Vibrio* presuntivos era casi dos órdenes de magnitud mayor en comparación con las zoeas saludables. Los *Vibrio* presuntivos representaron el 17% y el 6% de la población bacteriana total en las zoeas enfermas y saludables, respectivamente. Las colonias verdes (en TCBS) y las colonias color malva, que son presuntivamente *V. parahaemolyticus* (en CHROMagar™ *Vibrio*), representaron el 0.2% y el 82% del recuento total de *Vibrio* en las zoeas afectadas, mientras que se observó un patrón inverso en las zoeas saludables, con el 56% y el 2%, respectivamente (Tabla 2). Este hallazgo es interesante porque la suposición común es que las colonias verdes en TCBS y las colonias moradas en CHROMagar™ *Vibrio* típicamente representan *V. parahaemolyticus*. En este sentido, Soto-Rodríguez *et al.* [49], al estudiar las características fenotípicas y la cinética de crecimiento de tres cepas de *V. parahaemolyticus* con diferentes virulencias y una cepa no patógena, encontraron que, independientemente de la virulencia de la cepa, había una alta diversidad metabólica, lo que resultaba en fenotipos de diferentes colores en el CHROMagar™ *Vibrio*.

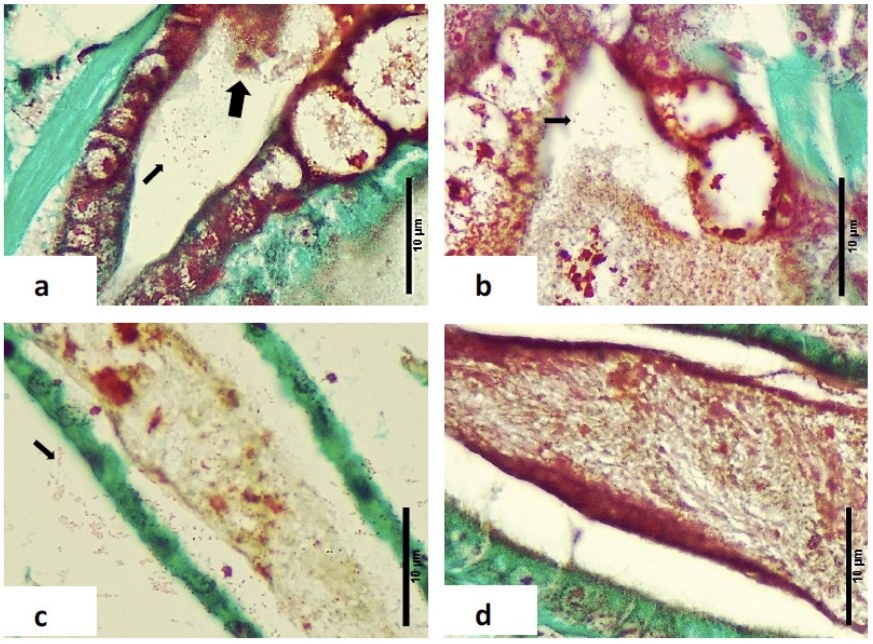


Figura 4. Secciones teñidas con Gram de Twort a través de larvas normales y afectadas de zoea 2. (a) Hepatopáncreas de zoea afectada con material descamado (flecha gruesa) y células bacterianas en el lumen (flecha delgada), color que indica bacterias Gram-negativas. (b) Células bacterianas normales en el lumen (flecha gruesa). (c) Zoea afectada, área del intestino con una presencia abundante de bacterias (flecha delgada). (d) Membrana peritrofica intacta de zoea normal. Note la ausencia de bacterias.

Es importante destacar que todas las 14 cepas fueron identificadas por PCR como miembros del género *Vibrio*, por lo que se puede concluir que los resultados del API 20E (21% de identificación errónea a nivel de género) no fueron confiables y deben tomarse con cautela (Tabla 3a). Aunque Overman *et al.* [50] afirmaron que el API 20E es un sistema válido para la identificación de los miembros más comunes de la familia Vibrionaceae, se ha reportado que el sistema puede resultar en falsos negativos [51,52]. La identificación por API se basa en perfiles bioquímicos, pero se ha encontrado que los perfiles bioquímicos y el genotipo no están necesariamente asociados con el potencial de virulencia [53]. La relación entre las variaciones o diferencias en las identificaciones del API 20E y la posible virulencia y variación de género de cada cepa es algo que requiere una exploración más profunda.

La Tabla 3b proporciona detalles sobre la caracterización de las bacterias aisladas utilizando el sistema API 20E. Esta tabla está dividida en dos grupos: bacterias aisladas en zoea de LBS (*V. alginolyticus* y *Vibrio* spp., con seis y cinco cepas, respectivamente) y bacterias (tres cepas) aisladas de zoea saludables. La fermentación/oxidación de arabinosa y amigdalina fue diferente entre los tres grupos de *Vibrio* aislados de zoea afectada versus saludable (Tabla 3b). La producción de acetoína fue la principal diferencia entre *V. alginolyticus* y otras especies de *Vibrio* aisladas de zoea saludables y afectadas. La capacidad de producción de acetoína por *Vibrio* spp. aislados de animales afectados por LBS es interesante, ya que generalmente este metabolito se produce cuando los microorganismos utilizan la vía de 2,3-butanodiol para fermentar azúcares, y esta vía genera productos finales menos ácidos y más neutros, como acetoína y 2,3-butanodiol. Dado que la acetoína es un producto de fermentación neutro y esta reacción biosintética consume protones intracelulares, el crecimiento bacteriano

puede ocurrir en una fuente de carbono de glucosa sin disminución del pH [54,55]. Además, se ha sugerido que la inhibición de la producción de acetoína podría ser un mecanismo potencial para controlar *V. cholerae*, que se sabe es sensible al ácido [55]. La diferenciación de cepas de *Vibrio* por sus propiedades bioquímicas no es rara. Por ejemplo, *V. anguillarum* podría separarse principalmente en función de su reacción en la producción de indol y la fermentación de amigdalina y arabinosa [56].

Una comparación entre la histología de este estudio y el primer informe de LBS descrito por Morales [1] es imposible. Lamentablemente, solo se presentaron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y no se registraron secciones de tejido teñidas con H&E. La publicación de Robertson *et al.* [2] muestra la presencia de racimos necróticos melanizados en los túbulos hepatopancreáticos (Figura 2 en [2]). Esta característica nunca se observó durante la presente investigación. La razón más probable es que los animales utilizados para la histología no eran zoea, sino que estaban al menos en la etapa PL1 al comparar la anatomía de los que se presentaron con otras descripciones detalladas sobre el desarrollo larval de *P. vannamei* [57]. Las diferencias importantes entre la patología presentada aquí para LBS y para PL-AHPND [10] es que no hay una descamación masiva de células en el hepatopáncreas como se describió para PL-AHPND. Además, PL-AHPND nunca se encontró ni se describió en zoea [10]. Además, no se detectaron PirAB ni otros genes patogénicos. Un material similar presente en larvas de camarón criadas en China y que sufren mortalidades durante la etapa zoea 2 ha sido descrito por otros autores; en su caso, esto se asoció con una cepa de *V. alginolyticus* [58].

Históricamente, el sector camaronero latinoamericano ha seguido el modelo ecuatoriano, donde las postlarvas se producen a partir de reproductores obtenidos de estanques de producción. Los reproductores se seleccionan en función de su peso y luego se trasladan a una incubadora para producir la siguiente generación de postlarvas. Este proceso ofrece poco o ningún control a largo plazo sobre la bioseguridad [59]. Además, altas concentraciones de *Vibrio* spp. pueden ser muy comunes en incubadoras de peneidos no bioseguras o aquellas que no son libres de patógenos específicos, tanto libres como adheridos a las larvas. Desde la incubación hasta la cosecha, el entorno microbiológico es una sopa de bacterias y partículas similares a virus (VLPs) [60–62]. A medida que las larvas transitan de una dieta basada en algas como zoea a animales que obtienen proteínas como misis, las larvas sufren un cambio dramático en el volumen del hepatopáncreas y la bioquímica de las enzimas digestivas [63]. En zoea, la filtración de partículas es casi indiscriminada. A medida que las etapas de zoea se exponen a concentraciones muy altas de bacterias, tanto libres como adheridas, incluyendo *Vibrio* que son fácilmente ingeridos y capaces de pasar al tracto digestivo [64], se pueden observar los efectos perjudiciales de estos dependiendo de varios factores como el subestado larval involucrado, las especies de *Vibrio* presentes y su concentración [65].

Intriago y Jiménez [66] replicaron el Síndrome de las Bolitas en zoea de *P. vannamei* utilizando una cepa luminiscente de *V. harveyi* a concentraciones tan bajas como 10^3 células/mL. Curiosamente, esta cepa fue aislada de *P. vannamei* enfermo cultivado en granja, afectado por enteritis hemocítica. Postularon que los patógenos podrían estar rebotando de las incubadoras hacia los reproductores o viceversa, y que las diferencias encontradas en la histopatología entre las larvas y los adultos podrían atribuirse, por un lado, a las diferencias en el grado de desarrollo de los órganos y, por otro, a las especies de patógenos, su virulencia y su concentración.

El evento clave en la aparición de enfermedades podría atribuirse al estrés (temperatura, salinidad, densidad, toxinas, etc.) debido a alteraciones en el entorno, lo que ejerce un cambio en la interacción huésped-patógeno y la transmisión de bacterias entre especies. Tales modificaciones actúan sobre los patógenos para facilitar su mayor transmisión entre los huéspedes individuales y su mayor contacto con nuevas poblaciones o especies de huéspedes, así como sobre la presión de selección que lleva a la dominancia de cepas patógenas adaptadas a estas nuevas condiciones ambientales [46,67]. Desafortunadamente, no hay forma de comparar la histología de este estudio con la de informes publicados anteriormente, aunque la histología de este estudio se asemeja al síndrome de zoea 2 reportado por Kumar *et al.* [14]. Sin embargo, las diferencias en la patología podrían ser el resultado de diferentes respuestas del huésped a una amplia dinámica de genotipos bacterianos y la concentración de patógenos bacterianos [12]. Además, dos patógenos también podrían producir la misma patología macroscópica (LBS), pero las diferencias en el daño a nivel tisular dependerán de todos los factores descritos anteriormente.

Conclusiones

A partir de la información anterior, queda claro que no se encontró ningún virus involucrado en esta enfermedad. Aunque algunos fueron detectados por PCR, no se encontraron cuerpos de inclusión ni lesiones asociadas. También podemos descartar patologías comunes de *Vibrio* como AHPND o la nueva y altamente letal *V. parahaemolyticus* descrita para larvas de *P. vannamei* que llevan los genes Vhp1- y Vhp-2. Las 14 cepas bacterianas aisladas fueron identificadas como *Vibrio* por PCR. Es tentador sugerir que *Vibrio* jugó un papel en la patogenicidad; sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de RLB o toxicidad del agua. Sin embargo, podemos concluir que las especies de *Vibrio*, ya sea como bacterias patógenas u oportunistas, juegan un papel importante tanto en los tanques afectados por LBS como en los saludables, y en general se caracterizaron por una alta diversidad metabólica, lo que dio lugar a fenotipos de diferentes colores en el CHROMagar™ *Vibrio*. El examen histopatológico de las larvas de zoea etapas 2–3 afectadas por LBS reveló cambios patológicos significativos, incluidos el desprendimiento de células epiteliales, necrosis hepatopancreática, membranas peritróficas alteradas y la presencia de bacterias Gram-negativas. Estos hallazgos destacan el grave impacto de LBS en el sistema digestivo de las larvas de *P. vannamei*, contrastando marcadamente con las estructuras intactas y la ausencia de características patológicas en las larvas saludables. Se necesita más investigación para comprender completamente la etiología del Síndrome de las Bolitas y desarrollar intervenciones efectivas para mitigar sus efectos en los criaderos de camarones •