

“ALTERACIONES HISTOLÓGICAS DEL HEPATOPÁNCREAS EN JUVENILES DE *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Crustacea: Penaeidae) EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON *Vibrio alginolyticus*”

MONTSERRAT ESTEVE,⁽¹⁾ Y FRANCISCO C. HERRERA ⁽²⁾

1) *Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, Apartado Postal N°621, Porlamar, Venezuela.*

(2) *Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe, Caracas, Venezuela.*

RESUMEN: La finalidad del presente trabajo fue estudiar las alteraciones macroscópicas, esto es, comportamiento general y coloración externa, y las microscópicas, localizadas en el hepatopáncreas, ocurridas al exponer juveniles machos de *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) a agua de mar que contenía $1,44 \times 10^7$ células de *Vibrio alginolyticus* por mililitro. Esta concentración bacteriana provocó en los camarones la aparición de los síntomas típicos de la vibriosis a las 8 horas de exposición. Los organismos exhibieron letargo, pérdida del sentido de orientación, enrojecimiento de los bordes de los pleópodos, urópodos, telson, escamas antenales y pleuras, y opacidad del tejido muscular abdominal. A partir de las 24 horas postinfección, los camarones permanecieron inmóviles, respondiendo al ser tocados con una varilla de vidrio. Posteriormente, la reacción de escape cesó, sobreviniendo la muerte antes de las 48 horas postinfección. Durante este lapso el hepatopáncreas sufrió un proceso degenerativo progresivo por la destrucción de las células que lo componen con la pérdida de la estructura normal. De acuerdo con el criterio citológico, se observaron los periodos de agonía, muerte y lisis celulares. En el primero el citoplasma se fluidifica y el edema celular y la vacuolización se hacen evidentes. Los espacios intertubulares se comprimen, las células pierden su forma y estallan, los núcleos se retraen hasta que el contenido nuclear se fragmenta y es expulsado. Luego de la muerte celular, mucho antes de que ocurra la muerte del organismo, comienza la fase de lisis caracterizada por la autodigestión del tejido debida a la acción de enzimas liberadas por los lisosomas. Las alteraciones de la glándula digestiva son útiles para indicar tempranamente infecciones por *Vibrio sp.* Tanto los hemocitos como las bacterias fueron escasos en los hepatopáncreas observados.

PALABRAS CLAVES: *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Vibrio alginolyticus*, vibriosis, hepatopáncreas.

ABSTRACT: He purpose of this work was to study the macroscopic alterations, i.e. general behavior and external coloration, and the microscopic alterations, located in the pancreas, that took place when male juveniles of *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) were immersed in seawater that contained 1.44×10^7 cells of *Vibrio alginolyticus* per milliliter. After 8 hours of exposure, this bacterial concentration caused in the shrimp the appearance of the typical clinical symptoms of vibriosis: lethargy, loss of orientation, reddening of the borders of pleopods, uropods, telson, antennal scales and pleurae, and opacity of the abdominal muscular tissue. 24 hours after exposure, the shrimp remained motionless, though they still responded when prodded with a glass rod. This escape response then ceased, and death occurred within 48 hours of exposure. During this period, the hepatopancreas underwent a progressive degenerative process, through the destruction of the cells that compose it, and a loss of the normal structure. We observed the periods of agony, death and cellular lysis from the cytological point of view. In the first period, the cytoplasm becomes fluid, and cellular edema and vacuolization become obvious. The intertubular spaces become compressed, the cells lose their shape and, burst and the nuclei contract themselves and the nuclear content fragments itself and is expelled. After cellular death, much before the death of the organism, the lysis phase begins, characterized by the autodigestion of the tissue, due to the action of the enzymes liberated by the lysosomes. The alterations of the digestive gland are useful as an early warning symptom of infections by *Vibrio sp.* Haemocytes as well as bacteria were "scarce in the hepatopancreata observed by us".

KEY WORDS: *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Vibrio alginolyticus*, Vibriosis, Hepatopancreas.

INTRODUCCIÓN

La incidencia de enfermedades ha plagado el cultivo de camarón desde sus inicios. Dicho factor ha ocasionado grandes pérdidas a la industria y ha restringido considerablemente la expansión de este rentable sector productivo. De acuerdo con Rosenberry (1997, 1998) la incidencia de enfermedades, entre éstas la vibriosis, ha tenido efectos devastadores en Taiwán

(1987-1988), China (1993-1994), Indonesia (1994-1995), India (1994-1995), Ecuador (1993-1996) y Honduras (1994-1997), representando el obstáculo más grande para el futuro de la actividad. Son diversas las citas bibliográficas sobre dramáticos episodios de mortalidades masivas por vibriosis en varios países, hecho que ha cambiado el rumbo de la producción mundial de camarón (Baticados et al., 1990; Liao, 1990; Chen et al., 1992; Lavilla-Pitogo, 1993; Limsuwan, 1993; Mohny et al., 1994; Lightner, 1996).

Recibido: Mayo 1999. Aprobado: Febrero 2000.

Las bacterias del género *Vibrio* son patógenos oportunistas omnipresentes en los ecosistemas marinos y estuarinos, y son parte de la flora normal de la mayoría de especies en cultivo, moluscos, crustáceos y peces y de las respectivas instalaciones. Su presencia ha sido asociada con diversas infecciones de origen bacterial (Anderson *et al.*, 1987; Nottage y Birkbeck, 1990; Sindermann, 1990). Aislamientos a partir de camarones con signos clínicos de septicemia bacteriana han permitido identificar a *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, como agentes etiológicos (Lightner, 1988). Comparaciones de la patogenicidad de las tres especies en ejemplares juveniles de *Penaeus japonicus* demostraron que *V. alginolyticus* era la más patógena (Vera *et al.*, 1992).

De los diferentes órganos afectados por la vibriosis, el hepatopáncreas resulta ser alterado en considerable grado. Las descripciones de alteraciones histológicas causadas por *Vibrio spp.* parecen indicar patologías comunes, pero las mismas están basadas en observaciones clínicas más que en estudios experimentales sistemáticos (Lewis, 1973; Quijada, 1992; Lightner, 1996). Dada la multiplicidad de funciones fisiológicas que realiza la glándula digestiva, cualquier proceso que afecte la salud del camarón debería evidenciarse como una alteración en el funcionamiento y/o histología del órgano vital, aún antes de que el organismo muestre síntomas clínicos de enfermedad (Gibson y Barker, 1979; Bautista *et al.*, 1994).

Con la finalidad de ampliar la utilidad del hepatopáncreas como órgano indicador de infección por *Vibrio*, en el presente trabajo fue establecida una secuencia temporal de las alteraciones histológicas en el hepatopáncreas de *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817), causadas por una cepa de *Vibrio alginolyticus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los camarones utilizados en las experiencias, pertenecientes a la especie nativa *Farfantepenaeus brasiliensis*, fueron colectados en el sector La Punta de La Gaviota, Laguna La Restinga, Isla de Margarita, Venezuela, mediante un chinchorro playero, durante el mes de julio de 1995. Una vez en el laboratorio, los ejemplares fueron examinados descartándose aquellos individuos que presentaban lesiones, carencia de apéndices o coloración anormal. Fueron seleccionados camarones machos con tallas comprendidas entre 60 y 70 mm de longitud total, los cuales fueron colocados individualmente en cilindros de malla plástica. Los cilindros fueron sumergidos colectivamente en acuarios que contenían agua de mar filtrada (1 µm) y tratada con luz ultravioleta. Todos los ejemplares utilizados tuvieron un periodo de aclimatación a las condiciones de laboratorio (35‰, 25±1 °C, pH de 8,2) de al menos cuatro días, estaban dentro de la fase de intermuda del ciclo de ecdisis

y fueron sometidos a un periodo de ayuno de 48 horas, previa exposición a la bacteria. La alimentación fue *ad libitum* constituida por misidáceos frescos.

La cepa de *Vibrio alginolyticus* fue aislada de un marcerado de nauplios moribundos de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1939) y caracterizada bioquímicamente mediante el sistema API-NFT BioMérieux. La bacteria fue utilizada a las 20 horas de la siembra, cuando se encontraba en fase exponencial de crecimiento. El conteo de células bacterianas fue realizado mediante un hematocitómetro bajo un microscopio, luego de efectuar las diluciones apropiadas (Esteve y Quijada, 1995). El control de patogenicidad de la bacteria requería que camarones inyectados intramuscularmente con 10⁷ células bacterianas, murieran dentro del lapso de 8 horas.

Los camarones fueron infectados mediante la técnica de inmersión con una suspensión conteniendo 1,44x10⁷ células bacterianas por mililitro, la cual fue directamente añadida al agua. El tiempo de exposición fue de 24 horas. Cada camarón fue incubado individualmente en un vaso de precipitado de 500 ml. Fueron establecidos tres grupos experimentales: un grupo control no expuesto a la bacteria, un grupo infectado y un grupo silvestre control, este último constituido por ejemplares silvestres sometidos a 48 horas de ayuno y sacrificados para análisis del hepatopáncreas. Cada grupo estuvo formado por al menos diez ejemplares. Para establecer la secuencia de alteraciones patológicas, fueron considerados camarones “menos moribundos”, los cuales ejecutaban la respuesta típica de escape al ser tocados con una varilla de vidrio, camarones “más moribundos”, los cuales no exhibían tal respuesta, y finalmente, camarones “recién muertos”.

El cuerpo de los camarones fue separado en cefalotórax y abdomen, y el hepatopáncreas obtenido al ejercer presión con los dedos sobre la región proximal del primero. La glándula así obtenida fue fijada en solución de Bouin durante 24 horas, luego transferida a etanol 50% y preservada en etanol 70%. La rutina histológica y la coloración practicada, hematoxilina férrica-orange G, siguen las recomendaciones de Culling *et al.* (1985) y Stevens (1990) con modificaciones de los autores. Para controlar mejor la decoloración, una vez cumplido el periodo de inmersión en hematoxilina, el tejido se decoloró con ácido pícrico saturado en lugar de la solución al 2% de alumbre de hierro indicada en el método.

RESULTADOS

Los ejemplares de *F. brasiliensis* infectados experimentalmente con *V. alginolyticus* desarrollaron la sintomatología clínica típica de la vibriosis. A partir de las 8 horas postinfección, los camarones alternaban entre periodos

de hiperactividad y nado rápido desorientado, y episodios de letárgicos con pérdida de la posición normal (el camarón se balancea y reposa sobre un lado del cuerpo). A las observaciones de comportamiento anómalo, siguieron cambios de la coloración del cuerpo. Los bordes de los pleópodos, los urópodos, el telson, las escamas antenales y las pleuras se tornaron rojizos, mientras que la musculatura abdominal se volvió opaca. A medida que la infección avanzaba, la actividad de los camarones se redujo, la respuesta de escape cesó, observándose una inmovilización progresiva de los apéndices, paralización del movimiento branquial y muerte súbita. El gradiente de respuestas entre “menos moribundos”, “más moribundos” y “recién muertos” tuvo lugar entre las 24 y 48 horas postinfección.

La Figura 1 corresponde a la preparación de un hepatopáncreas proveniente de un camarón sano. Se muestran cortes transversales de los acinos hepatopancreáticos a diferentes niveles con el lumen tubular en forma de estrella. La superficie luminal de las células del epitelio de los túbulos está cubierta por microvellosidades que le merecen el nombre de ribete en cepillo. En los túbulos cortados a diferentes niveles pueden observarse los cuatro tipos celulares: E (células embrinarias), R (células absortivas cuyo citoplasma contiene múltiples vacuolas), F (células fibrosas con un núcleo grande que posee un nucleólo prominente) y B (células secretoras las cuales contienen una gran vacuola).

Figura 1. Preparación de un hepatopáncreas proveniente de un ejemplar *F. brasiliensis* sano, seccionado transversalmente, mostrando la estructura acinosa del órgano. Los túbulos hepatopancreáticos que conforman los acinos tienen una disposición compacta. Se observan los cuatro tipos de células clásicamente descritas: embrionarias (E), absortivas (R), fibrosas (F) y secretoras (B), el lumen tubular (LT) en estrella y el “ribete en cepillo” (RC). Coloración hematoxilina férrica/orange G. Barra=20 μ

El hepatopáncreas proveniente de camarones en estado “menos moribundo” presenta alteraciones de la morfología acinosa, desaparece el lumen en estrella, la degeneración celular se evidencia en las áreas donde la luz tubular aparece totalmente dilatada. Dentro de los espacios lumbinales queda disperso el contenido celular. En algunos casos se conservan los núcleos aún cuando la picnosis es extensa. Los núcleos se retraen hasta que el contenido nuclear se fragmenta y es expulsado. Hay un alto grado de vacuolización. Las abundantes vacuolas contienen un material de aspecto granuloso. Los espacios intertubulares están comprimidos a consecuencia del edema celular. La envoltura de tejido conjuntivo que rodea a cada túbulo permanece bien conservada (Figura 2).

Figura 2. Preparación de un hepatopáncreas proveniente de un ejemplar *F. brasiliensis* en estado “menos moribundo”, seccionado transversalmente, mostrando la fase inicial de degeneración celular. Se observa extensa vacuolización de las células acinares en toda la figura. Desaparición de los espacios intertubulares. El lumen tubular pierde la forma de estrella. Las células alteran su forma. Coloración hematoxilina férrica/orange G. Barra=20 μ m.

La glándula digestiva de camarones “más moribundos” presenta áreas mostrando marcada degeneración celular con la consiguiente desaparición de los acinos tubulares. La citólisis y la picnosis son extensivas. Puede notarse el desprendimiento de las células del epitelio tubular o “sloughing off”. Se observan los restos de las envolturas de tejido conectivo que contenían a los túbulos hepatopancreáticos ahora disgregados (Figura 3).

Tras la muerte del organismo se inicia la fase de lisis celular. Se observan los restos del tejido hepatopancreático disgregados, en los cuales pueden notarse algunos núcleos tanto de las células hepatopancreáticas como de las mioepiteliales que rodeaban a cada túbulo en el tejido aún no afectado (Figura 4).

Se observó consistentemente que a medida que la infección avanza, las alteraciones histológicas proceden desde la región proximal de la glándula hacia la apical. Igualmente, en todas las muestras analizadas la presencia de hemocitos y de células bacterianas fue escasa.

DISCUSIÓN

Los organismos infectados mostraron la sintomatología considerada propia de la vibriosis por diversos autores, en especial con relación a las características macroscópicas como los cambios de comportamiento y coloración. Este hecho valida el uso del término de "vibriosis" para referirse a todas aquellas patologías cuyo agente etiológico es el género *Vibrio*, independientemente de la especie o cepa y de la especie de camarón. La simple inmersión en la suspensión bacteriana fue suficiente para infectar a los camarones, corroborando la utilidad de la técnica para estudios de sintomatología y de secuencia patológica. Esta, además de ser más rápida, no requiere la manipulación de los organismos, lo cual puede generarles estrés y oportunidades adicionales de infección (Esteve y Quijada, 1995). En cuanto a las características microscópicas, la observación general consiste en alteraciones de la estructura de los acinos hepatopancreáticos por destrucción de las células que forman el epitelio tubular, infiltración hemocítica, formación de granulomas y acumulación de bacterias (Lightner y Lewis, 1975; Conroy y Conroy, 1990; Lavilla-Pitogo, 1993; Song *et al.*, 1993; Lightner, 1996; Esteve y Herrera, 1997). Al igual que lo referido por Lightner (1996) para *Penaeus monodon* y *P. vannamei* infectados con *Vibrio sp.*, en el presente caso la infección también avanzó desde la región proximal de la glándula digestiva hasta la distal. Tanto los hemocitos como las bacterias resultaron escasos en los cortes analizados contrario a lo observado por otros autores en otras especies de penaeidos pero similar a lo encontrado en la especie en cuestión experimentalmente infectada con *V. anguillarum* (Quijada, 1992). Las enzimas liberadas durante la fase de necrosis celular podrían afectar tanto a los hemocitos, disminuyendo la capacidad de defensa del organismo, como a las bacterias presentes.

El comportamiento letárgico es síntoma de otras infecciones tales como aquellas ocasionadas por rickettsias, mollicutes y virus de acuerdo con Anderson *et al.* (1987), Krol *et al.* (1991) y Brock *et al.* (1995). Los autores describen las siguientes patologías para los hepatopáncreas de *P. marginatus*, *P. monodon* y *P. vannamei* infectados con los microorganismos mencionados: inclusión de células epiteliales en el lumen tubular, necrosis celular, acumulación de hemocitos en los senos hemales asociados con

Figura 3. Preparación de un hepatopáncreas proveniente de un ejemplar *F. brasiliensis* en estado "más moribundo", seccionado transversalmente, mostrando un mayor grado de degeneración celular. El epitelio se ha desprendido de su basamento conjuntivo. Un túbulo muy alterado conserva su luz en estrella (región centro izquierda). Se pierde totalmente la estructura acinosa del órgano. Los túbulos que restan están rotos y escasamente se distinguen los cuatro tipos de células. El "sloughing off" es extensivo, especialmente en el acino localizado abajo y a la izquierda. Coloración hematoxilina férrica/orange G. Barra=20 mm.

Figure 4. Preparación de un hepatopáncreas proveniente de un ejemplar *F. brasiliensis* en estado "recién muerto", seccionado transversalmente. Se observa desintegración total de la estructura tisular. Restos celulares en acúmulos que recuerdan la estructura acinar, con algunos núcleos de células mioepiteliales en su periferia (zona central y superior izquierda). Restos celulares en espacios que corresponden al edema intersticial (abajo y a la derecha). Coloración hematoxilina férrica/orange G. Barra= 8 μ m.

los túbulos y formación de granulomas, alteraciones histológicas que coinciden en buen grado con las descritas en casos de vibriosis.

La degeneración y congestión de los túbulos hepatopancreáticos también tienen lugar cuando los camarones reciben una dieta inapropiada con exceso de carbohidratos, desbalances de la proporción proteína/carbohidrato o presencia de aflotoxina B₁ (Pascual *et al.*, 1983; Bautista, 1986; Bautista *et al.*, 1994).

La secuencia presentada permite distinguir de acuerdo al criterio citológico, los periodos de agonía, muerte y necrosis celulares (Bessis, 1959). En el primero se observa fluidificación y edema citoplasmático. La membrana celular se hace permeable al agua lo que da lugar al edema. Las células pierden su forma y eventualmente estallan. Los núcleos sufren picnosis, haciéndose progresivamente más pequeños hasta fragmentarse y expulsar el contenido nuclear. Luego de la muerte celular se inicia el periodo de necrosis caracterizado por la autodigestión del tejido debido a la acción de enzimas activadas o liberadas por la destrucción de los lisosomas. El material que resta queda disperso en el medio circundante. Dado que estas alteraciones pueden tener lugar al ocurrir la muerte celular, mucho antes de la muerte del organismo, pueden hacerse difíciles de separar de aquellas ocasionadas directamente por la bacteria. Este es un factor de primordial importancia ya que si la fijación del organismo no es realizada oportuna y adecuadamente, las alteraciones del tejido pueden ser consecuencia de procesos espontáneos que podrían ser confundidos con los causados por la infección.

De acuerdo con los resultados, se confirma la utilidad del análisis histológico del hepatopáncreas para determinar alteraciones del estado fisiológico o de salud general del camarón, y en particular para la infección por *Vibrio sp.*

A pesar de que no se observó acumulación de bacterias ni de hemocitos en el tejido, no hay duda de que el hepatopáncreas tuvo una respuesta histológica a la infección bacteriana, la cual se evidenció a las pocas horas de la exposición de los camarones a la bacteria, mucho antes de ocurrir la muerte del organismo.

CONCLUSIONES

1. Los ejemplares de *F. brasiliensis* infectados experimentalmente con *V. alginolyticus* exhibieron los síntomas macroscópicos típicos de la vibriosis a partir de las 8 horas de exposición a la bacteria.

2. Los ejemplares de *F. brasiliensis* infectados experimentalmente con *V. alginolyticus* desarrollaron el gradiente de respuestas de “menos moribundos”, “más moribundos” y “recién muertos” entre las 24 y 48 horas postinfección.

3. Los hepatopáncreas de los ejemplares de *F. brasiliensis* infectados experimentalmente con *V. alginolyticus* exhibieron las alteraciones histológicas típicas de la vibriosis descritas para otras especies de penaeidos, a excepción de la infiltración hemocítica y la presencia de bacterias.

4. La secuencia histológica obtenida permitió distinguir los periodos de agonía, muerte y lisis celulares.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación Código CI-4-020-0060/94-95 financiado por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente. La fotografía fue financiada y realizada por el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, I.G., SHARIFF, M., NASH, G. y NASH, M. 1987. Mortalities of juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with *Penaeus monodon* baculovirus, cytoplasmic reo-like virus, and rickettsial and bacterial infections, from Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fish. Sci.* 1: 47-64.
- BATICADOS, M., CRUZ-LACIERDA, M.C., DURENDEZ-FERNANDEZ, R.C., GACUTAN, R.Q., LAVILLA-PITOGO, C.R. y LIOPO, G.D. 1990. Diseases of penaeid shrimps in the Philippines. *Aquaculture Extension Manual* N°16, SEAFDC.
- BAUTISTA, M.N. 1986. The response of *Penaeus monodon* juveniles to varying protein/energy ratios in test diets. *Aquaculture* 53: 229-242.
- BAUTISTA, M.N., LAVILLA-PITOGO, C.R., SUBOSA, P.F. y BEGINO, E.T. 1994. Aflatoxin B₁ contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of preadult shrimp. *J. Sci. Food Agricult.* 65: 5-11.
- BESSIS, M. 1959. La muerte de la célula. *Triángulo* 9: 191-199.

- BROCK, J.A., GOSE, R., LIGHTNER, D.V. y HASSON, K.W. 1995. An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. En: Swimming through Troubled Water. World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp. 84-94.
- CHEN, S.N., HUANG, S.L. y KOU, G.H. 1992. Studies on the epizootics and pathogenicity of bacterial infections in cultured giant tiger prawns, *Penaeus monodon* in Taiwan. En: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. Fulks and W., Main, K.L. (Eds.). The Oceanic Institute, pp. 195-205.
- CONROY, D.A. y CONROY, G. (Eds.). 1990. Manual de Patología de Camarones peneidos. Maracay, 197 pp.
- CULLING, C.F.A., ALLISON, R.T. y BARR, W.T. 1985. Cellular Pathology Technique. Ed. Butterworth and Co., New York, 4th Edition, 642 pp.
- ESTEVE, M. y QUIJADA, R. 1995. Evaluation of three experimental infection techniques with *Vibrio anguillarum* in *Penaeus brasiliensis* Latreille, 1817. En: Calderón J. y Sorgeloos, P. (Eds.). Memorias II Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, pp. 205-208.
- ESTEVE, M. y HERRERA, F. 1997. Histological alterations of the hepatopancreas of *Penaeus vannamei* experimentally infected with a *Vibrio anguillarum* strain. Abstracts of the World Aquaculture Society 97, p. 72.
- GIBSON, R. y BARKER, P.L. 1979. The decapod hepatopancreas. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 17: 285-346.
- KROL, R.M., HAWKINS, W.E. y OVERSTREET, R.M. 1991. RICKETTSIAL AND MOLLICUTE INFECTIONS IN HEPATOPANCREATIC cells of cultured Pacific white Shrimp (*Penaeus vannamei*). J. Invert. Pathol. 57: 362-370.
- LAVILLA-PITOGO, C.R. 1993. Bacterial diseases of penaeid shrimps: an Asian view. En: Asian Fisheries Society (Eds.), 2nd Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, p. 13.
- LEWIS, D.H. 1973. Response of brown shrimp to infection with *Vibrio sp.* Proceedings World Mariculture Society 14: 333-338.
- LIAO, I.C. 1990. The world's marine prawn culture industries: today and tomorrow. En: Hirano, R. and Hanya, I. (Eds.). Asian Fisheries Society, Manila, pp. 11-29.
- LIGHTNER, D.V. 1988. Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. En: Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. Sindermann, C.J. and Lightner, D.V. (Eds.), Elsevier, New York, pp. 8-127.
- LIGHTNER, D.V. (Ed.). 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Vibriosis: culture and identification. World Aquaculture Association, Baton Rouge, s/n.
- LIGHTNER, D.V. y LEWIS, D.H. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. Mar. Fish. Rev. 37: 25-28.
- LIMSUWAN, C. 1993. Diseases of black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius) in Thailand. En: Akiyama, D.M. (Ed.). Technical Bulletin American Soybean Association, Singapore, pp. 33-54.
- MOHNEY, L.L., LIGHTNER, D.V. y BELL, T.A. 1994. An epizootia of vibriosis in Ecuadorian pond reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). J. World Aquacult. Soc. 25: 116-125.
- NOTTAGE, A.S. y BIRKBECK, T.H. 1990. Interactions between different strains of *Vibrio alginolyticus* and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis*. J. Invert. Pathol. 56: 15-19.
- PASCUAL, F.P., COLOSO, R.M. y TAMSE, C.T. 1983. Survival and some histological changes in *Penaeus monodon* Fabricius juveniles fed various carbohydrates. Aquaculture 31: 169-180.
- QUIJADA, R.J. 1992. Sintomatología y patología de la vibriosis en *Penaeus brasiliensis* Latreille, 1817 (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). Trabajo de Grado, Universidad de Oriente, 72 pp.
- ROSENBERRY, B. (Ed.). 1997. World Shrimp Farming 1997. En: Shrimp News International, San Diego, 78 pp.
- ROSENBERRY, B. (Ed.). 1998. World Shrimp Farming 1998. En: Shrimp News International, San Diego, 98 pp.
- SINDERMANN, C.J. 1990. Principal diseases of marine fish and shellfish. Vol. 2, Second Edition, Academic Press, San Diego, 516 pp.
- SONG, Y.L., CHENG, W. y WANG, C.H. 1993. Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. J. Invert. Pathol. 61: 24-31.

STEVENS, A. 1990. Micro-organisms. En: Theory and Practice of Histopathological Techniques. Bancroft, J.D., Stevens, A. y Turner, A. (Eds.). Third Edition, Churchill Livingstone, London, pp. 289-308.

VERA, P., NAVAS, J.I. y QUINTERO, M.C. 1992. Experimental study of the virulence of three species of *Vibrio* bacteria in *Penaeus japonicus* (Bate 1881) juveniles. Aquaculture 107: 119-123.