

RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS DE VIBRIOS AISLADOS DE PECES Y CAMARONES MARINOS EN VENEZUELA

Antimicrobial Resistance of Vibrios Isolated from Fish and Marine Shrimp in Venezuela

Julia Dolores Álvarez¹, Brian Austin², Ana María Álvarez¹ y Claudia Paola Agurto¹

¹Área de Bacteriología de Peces y Crustáceos, Instituto de Investigaciones Veterinarias, CENIAP-INIA, Maracay, Edo. Aragua, Venezuela. E-mail: rnaregatti@canfv.net

²Department of Biological Sciences, Heriot-Watt University, Edimburgo, Escocia, Reino Unido

RESUMEN

Una práctica mundial en granjas de cultivo acuícola es el uso rutinario de antimicrobianos, incluyendo compuestos de valor en terapéutica humana; sin embargo, todavía prevalecen las vibriosis atribuibles fundamentalmente a *Vibrio harveyi* luminiscentes. Se determinó la resistencia frente a 12 antimicrobianos y al agente vibriostático, con el método en disco de difusión en agar, de miembros del género *Vibrio* aislados de lisas criollas silvestres (*Mugil curema*) y de camarones peneidos (*Litopenaeus schminni*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*), silvestres y cultivados, así como del agua y sedimento de su entorno. Se tomaron muestras del riñón, hepatopáncreas e intestino de los animales, y también de macerados de larvas de camarones. En general los ejemplares se observaron sanos a su llegada al laboratorio, con excepción de los provenientes de los 3 primeros muestreos realizados en una camaronera en 1996, donde un grupo de larvas de cultivo presentó problemas sanitarios. Fueron aislados 629 vibrios, de los cuales el mayor grupo, claramente identificado, estuvo formado por bacterias de la especie *V. harveyi*. Se detectó que el 93% de los vibrios presentaron resistencia múltiple, la cual fue elevada ($R \geq 50\%$) a la eritromicina, estreptomycin, kanamicina, novobiocina, penicilina G, polimixina B, tetraciclina y triple sulfá. No se encontró diferencia estadística significativa ($P \leq 0,05$) entre la especie *V. harveyi* y el resto de las especies de *Vibrio* ubicadas en un segundo grupo, considerando en conjunto los ambientes silvestre y de cultivo. Sin embargo, el nivel de resistencia de las cepas de esta especie se hizo significativamente mayor ($P \leq 0,05$), al analizar en forma individual las de *V. harveyi* aisladas de las larvas enfermas. Aquí las cepas fueron 100% resistentes en un rango comprendido entre 7 y 10 de los antimicrobianos probados. El alto nivel de resistencia de las bacterias recuperadas

de animales cultivados, puede ser una consecuencia del amplio uso de antimicrobianos. En lo referente a los animales silvestres, la alta resistencia detectada podría involucrar la transferencia de factores R mediante plásmidos.

Palabras clave: Resistencia antimicrobiana, vibrios, *Vibrio harveyi*, *Mugil curema*, *Litopenaeus schmitti*, *L. vannamei*, *L. stylirostris*, salud pública.

ABSTRACT

A worldwide practice in aquaculture rearing facilities is the routine use of antimicrobials, including compounds of value in human medicine, but despite this, vibriosis, caused fundamentally by luminous *Vibrio harveyi*, still prevails. The antimicrobial resistance was determined, by the agar diffusion disk method for twelve antimicrobials and for the vibriostatic agent, for members of the genus *Vibrio*, isolated from wild silver mullets (*Mugil curema*) and from feral and cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus schmitti*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*), as well as from water and sediment from their environment. Samples were taken from kidneys, hepatopancreas, intestines, and from shrimp larval homogenates. In general terms, the animals were apparently healthy, with the exception of the first three samplings in the shrimp farm in 1996, when the larvae had sanitary problems. 629 vibrios were isolated with the mayor group clearly identified formed by the species *V. harveyi*. 93% of the vibrio strains had multiple resistance. The vibrios showed a resistance of $\geq 50\%$ to erythromycin, streptomycin, kanamycin, novobiocin, penicillin G, polymyxin B, tetracycline and triple sulphá. No significant statistical difference ($P \leq 0.05$) was determined between the species *V. harveyi* and the rest of the *Vibrio* species located in a second group, considering both feral and culture conditions. But the level of resistance for *V. harveyi* became significantly greater ($P \leq 0.05$) when considering separately the strains of *V. harveyi* isolated from diseased larvae.

Here the strains were 100% resistant to a range of 7 to 10 of the antimicrobials tested. The high level of resistance among bacteria recovered here from cultured animals, could reflect the widespread use of antimicrobial compounds. The situation regarding feral animals may involve resistance transfer of R factors by means of plasmids.

Key words: Antimicrobial resistance, vibrios, *Vibrio harveyi*, *Mugil curema*, *Litopenaeus schmitti*, *L. vannamei*, *L. stylirostris*, public health.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura en Venezuela ha sido identificada como una actividad económica de alta rentabilidad y gran potencial, si consideramos las características geográficas del país, la diversidad de especies y las condiciones ambientales favorables para su desarrollo [13, 21]. A pesar de esto, el desarrollo de la acuicultura en el país ha sido un proceso lento, en el cual el cultivo de especies exóticas, tales como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la tilapia roja (tetrahíbrido de *Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis homorum* x *O. niloticus* x *O. aureus*) y el camarón peneido (*Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*), son de mayor valor económico que el cultivo de especies nativas.

Mundialmente las enfermedades ocasionan grandes pérdidas a la acuicultura [44], entre las que cabe destacar las de etiología bacteriana. Las bacterias Gram negativas, fundamentalmente los vibrios, predominan en los ambientes marinos y usualmente constituyen la mayor parte de la flora intestinal de peces y crustáceos [11, 37]. Entre los miembros del género *Vibrio* encontramos las siguientes especies asociadas a enfermedades en peces y crustáceos marinos: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. carchariae*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. ordalli* y *V. parahaemolyticus*, entre otros [5, 16, 20, 25, 29, 31].

Estudios realizados por Álvarez y col. [1] indican que las altas tasas de mortalidad en peces y camarones peneidos con síntomas de septicemia bacteriana (hemorrágica en peces), comúnmente conocida como vibriosis, han sido ocasionadas por *Vibrio harveyi*. Estos autores, cumpliendo con los Postulados de Koch, inocularon *V. harveyi* en una concentración $\geq 10^5$ células por animal⁻¹. Se produjeron algunas señales externas de enfermedad como melanización, distensión abdominal y nado errático en los peces, y opacidad muscular alrededor del sitio de inoculación en los camarones marinos. Internamente los peces presentaron vísceras congestionadas, el hepatopáncreas de los camarones se observó pálido, y en ambas especies el intestino se llenó de una sustancia mucopurulenta. La bacteria fue aislada en forma pura del riñón de los peces, del hepatopáncreas de los camarones y del intestino de ambos.

Los quimioterápicos son usados ampliamente en acuicultura a nivel mundial [5]. Más aún, el uso de la quimioterapia ha traído gran preocupación por la aparición de cepas bacte-

rias resistentes a uno o más antimicrobianos, y a la presencia de residuos de estos compuestos en el ambiente acuático y en la carne del pez [12]. Es suficiente una corriente moderada de agua para transportar compuestos antimicrobianos por largas distancias, antes de su degradación, deposición en el sedimento o incorporación a otros organismos por vía de la cadena alimentaria [24, 32, 34, 35, 38, 39]. Austin [3] mencionó dos vías básicas para que las bacterias adquieran resistencia a los antibióticos: (a) la adquisición de plásmidos, portadores de genes de resistencia, y (b) la selección de cepas bacterianas genéticamente (cromosómicamente) resistentes.

Los objetivos de este trabajo consistieron en determinar la resistencia a los antimicrobianos de vibrios aislados de diferentes fuentes, en el ambiente natural y en condiciones de cultivo en una granja camarонера.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuente de los animales

Lisas criollas (*Mugil curema* Valenciennes, 1836). Se capturaron juveniles y adultos de poblaciones silvestres en las costas central (Puerto Colombia, estado Aragua) y occidental (Playa Médano Blanco, estado Falcón) de Venezuela.

Camarones peneidos. Las especies muestreadas fueron: Camarón blanco (*Litopenaeus schmitti* Burkenroad, 1838 y *Litopenaeus* spp.), de poblaciones silvestres en las costas occidental (Playa Médano Blanco, estado Falcón y Santa Rita y El Bajo, estado Zulia) y oriental (Laguna de Unare, estado Anzoátegui) de Venezuela; langostino patiblanco (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) y langostino azul (*Litopenaeus stylirostris* Stimpson, 1834), en una granja comercial del oriente del país.

Los estadios de vida muestreados del camarón fueron: larvas (zoea, misis, postlarvas) y juveniles.

Los animales vivos se colocaron en bolsas plásticas dobles con adición de oxígeno, que fueron luego selladas con bandas elásticas. Las bolsas fueron transportadas en cavas de anime o de plástico. La temperatura del agua y del aire se mantuvo baja (20°C), colocando cubos de hielo dentro de las bolsas y de las cavas.

Aislamiento y caracterización de las cepas bacterianas estudiadas

Las muestras fueron tomadas asépticamente de los riñones de los peces, hepatopáncreas de los camarones peneidos e intestino de ambos, de acuerdo con la metodología descrita por Austin y Austin [4]. También fueron procesadas muestras del agua y sedimento del medio ambiente de estos animales. Las muestras del intestino, agua y sedimento, fueron diluidas en solución salina estéril hasta una concentración de 10^5 ; luego, de cada dilución se sembró por duplicado 0,1 mL en agar tripticosa soya (ATS; DIFCO), suplementado con cloruro de

sodio al 1,5%, utilizando para ello una espátula doblada estéril de vidrio. Las larvas fueron maceradas asépticamente en un homogeneizador de tejidos, y luego sometidas al mismo proceso de dilución y siembra utilizado con las muestras del intestino y del ambiente.

Para asegurar su pureza, representantes de cada colonia fueron repicados, por lo menos 2 veces, en ATS suplementado con cloruro de sodio al 1,5%, para asegurar su pureza. Estos aislados frescos fueron usados para la identificación taxonómica, a través del estudio de sus características fenotípicas, basadas fundamentalmente en aquellas pruebas indicadas por Baumann y col. [7] y por Austin y Lee [6].

Resistencia a los compuestos antimicrobianos

Antibiogramas: Los vibrios fueron examinados para determinar su resistencia a 12 compuestos antimicrobianos, usando el método modificado de Bauer et al. [10]. Cada cepa fue subcultivada en 3 mL de caldo tripticosa soya (CTS; DIFCO) suplementado con 1,5% de cloruro de sodio, incubándolo a 30°C durante 18 horas. Luego, por comparación con la densidad del tubo N°1 del nefelómetro de MacFarland [8], se prepararon diluciones en una concentración de $1,5 \times 10^8$ células por mL⁻¹ en CTS. Finalmente, las suspensiones estandarizadas fueron inoculadas en placas de agar Mueller-Hinton (AM-H; DIFCO), utilizando un hisopo estéril. Después de dejar secar la superficie de este agar, se colocaron los siguientes discos de antimicrobianos: cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), kanamicina (30 µg), ácido nalidixico (30 µg), novobiocina (30 µg), penicilina G (10 UI), polimixina B (300 µg), estreptomycin (10 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim/sulfametoxazol (25 µg) y triple sulfá (300 µg). Adicionalmente también se probó *in vitro* el compuesto sarafloxacin (DIFCO), sólo contra las bacterias aisladas de las larvas. Las placas se incubaron durante la noche. Los resultados fueron interpretados de acuerdo al método del Manual DIFCO [17].

Sensibilidad al agente vibriostático 01129 (2,4-diaminono-6,7-diisopropil teridina sal fosfato): La sensibilidad al vi-

briostato 01129 fue determinada utilizando una solución acuosa, esterilizada por filtración (con filtros de 0,22 µm de porosidad), con una concentración de 10 pg/disco y de 150 µg/disco. En esta prueba se utilizaron discos estériles (121°C/15 min) de 0,7 mm de diámetro (S&S Filter Paper N°740-E), impregnados con la solución acuosa antes indicada y secados a 37°C [19]. Los discos fueron colocados sobre la superficie de placas recién sembradas de AM-H.

Análisis estadístico

Con el fin de determinar si hubo diferencia estadística significativa, se aplicó la Prueba de Ji Cuadrado y la Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher [41, 43], utilizando el Programa Statistix para Windows 95 (Versión 1.0; Analytical Software).

RESULTADOS

Fueron realizados 25 muestreos desde enero de 1996 a diciembre de 1997, procesándose los siguientes ejemplares: 82 lisas criollas silvestres, un número indeterminado de larvas y postlarvas de cultivo, 99 camarones marinos silvestres y 70 cultivados. Se clasificaron 629 aislados como pertenecientes al género *Vibrio*. Dentro de los vibrios, TABLA I, el mayor grupo, claramente identificado estuvo conformado por *V. harveyi* (N=187) [36].

Es importante destacar que durante los primeros 4 muestreos realizados en la camaronera comercial en 1996, se presentaron problemas sanitarios en las poblaciones de las cuales fueron tomadas las larvas a procesar. Éstas se observaron letárgicas y muchas se ubicaron en el fondo del envase, presentaron intestinos vacíos y puntos de necrosis en el exoesqueleto.

Patrones de resistencia

Se realizaron estudios de sensibilidad a los 629 aislados obtenidos. Los porcentajes de resistencia resultantes se indican en los FIGS. 1 y 2, que corresponden a las cepas aisladas

TABLE I
ESPECIES DE **VIBRIO** AISLADAS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS PROCESADAS (1996-1997)

Ambiente	Fuente de Aislamiento	Especie Bacteriana
Silvestre	Agua	<i>Vibrio</i> spp., <i>V. harveyi</i>
	Sedimento	<i>Vibrio</i> spp., <i>V. carchariae</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. harveyi</i> .
	Lisas criollas	<i>Vibriospp.</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. carchariae</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. harveyi</i> ,
	Camarones	<i>Vibrio</i> spp., <i>V. carchariae</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. furnisii</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. natriegens</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> .
Cultivo	Agua	<i>Vibriospp.</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>
	Sedimento	<i>Vibrio</i> spp., <i>V. harveyi</i>
	Larvas	<i>Vibrio</i> spp., <i>V. carchariae</i> , <i>V. harveyi</i> .
	Camarones	<i>Vibrio</i> spp., <i>V. campbelli</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. hollisae</i> , <i>V. metchnikovii</i> , <i>V. natriegens</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> .

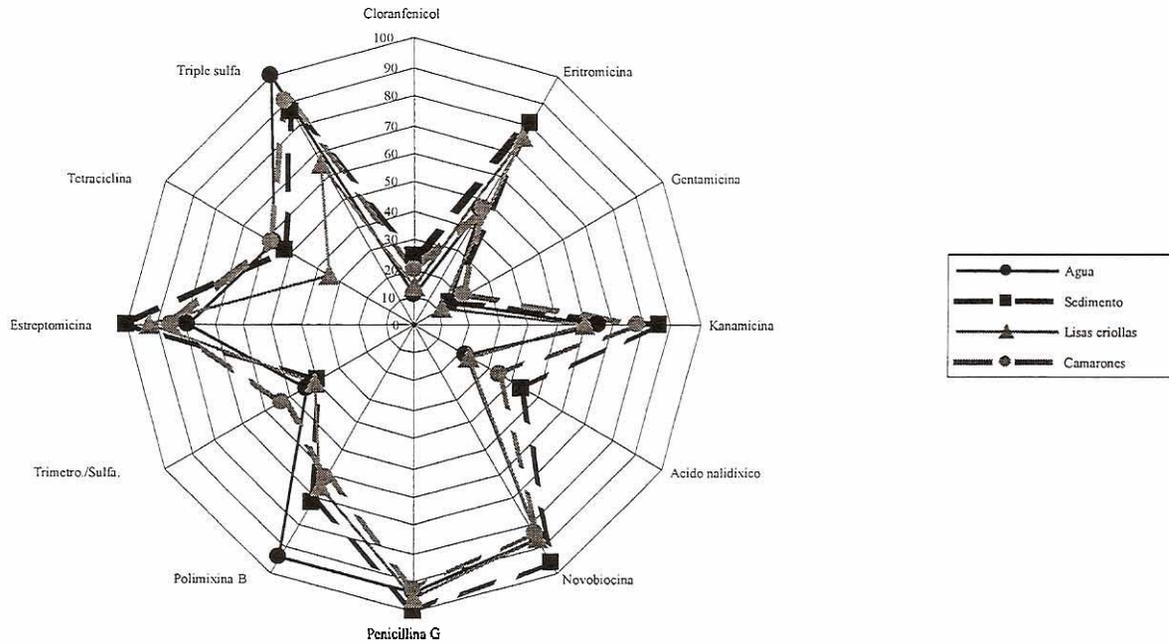


FIGURA 1. RESISTENCIA (%) DE LOS **VIBRIOS** DEL AMBIENTE NATURAL A LOS ANTIMICROBIANOS PROBADOS (1996-1997).

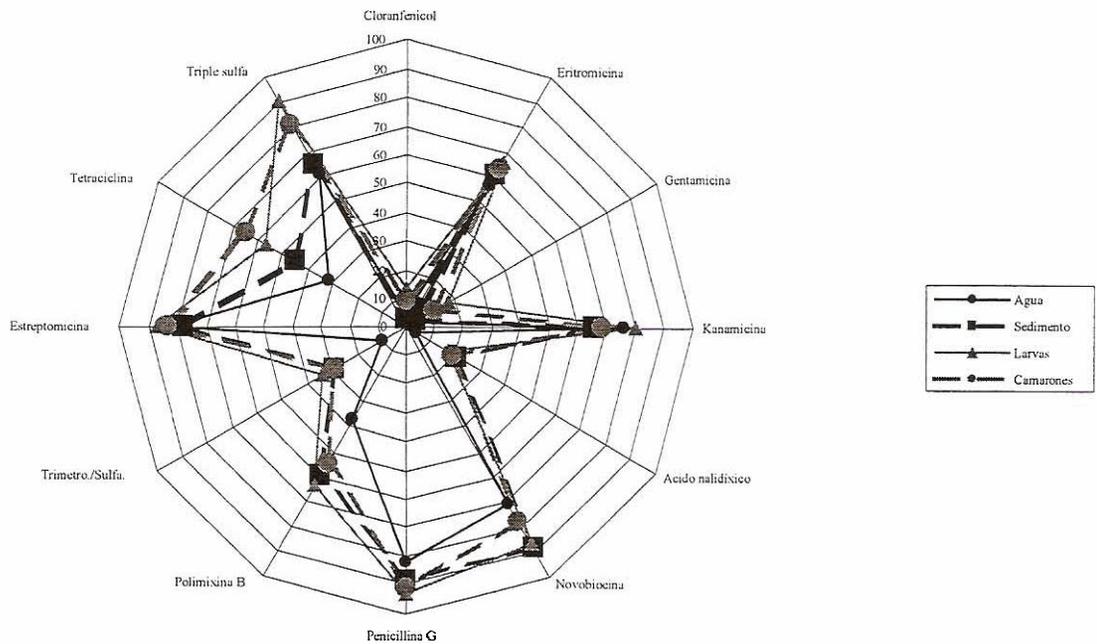


FIGURA 2. RESISTENCIA (%) DE LOS **VIBRIOS** AISLADOS DE LA CAMARONERA A LOS ANTIMICROBIANOS PROBADOS (1 996-1997).

del medio ambiente natural y bajo condiciones de cultivo, respectivamente. Estos resultados fueron agrupados de acuerdo al tipo de muestra: agua, sedimento, lisas criollas silvestres y larvas y juveniles de camarones peneidos silvestres v cultivados, esto para los 2 años de muestreos (1996-1997). Fueron obtenidos numerosos patrones de resistencia, detectándose que el 93% de las cepas presentó resistencia múltiple, es decir, cepas resistentes al menos a 3 de los antimicrobianos probados. En todos los tipos de muestra del medio ambiente na-

tural, fueron halladas cepas resistentes a los 12 antimicrobianos probados; sin embargo, en muestras de la camaronera comercial esta resistencia total fue encontrada sólo en cepas aisladas de juveniles.

Considerando los vibrios en general, se observó una alta resistencia ($R \geq 50\%$) a la eritromicina, estreptomisina, kanamicina, novobiocina, penicilina G, polimixina B, tetraciclina y triple sulfa, no así al ácido nalidixico, cloranfenicol, gentamicina y la sulfonamida potenciada.

Las cepas de *Vibrio* aisladas del ambiente natural (animales y entorno) presentaron una mayor resistencia al ácido nalidíxico, cloranfenicol, estreptomina, gentamicina, kanamicina, sulfonamida potenciada y triple sulfá. ya que se detectó diferencia estadística significativa ($P \leq 0,05$) entre los valores obtenidos.

Debido a que *Vibrio harveyi* fue la segunda especie bacteriana aislada en orden de frecuencia, tanto en condiciones silvestres como de cultivo (después de *Vibrio* spp.), y considerando su emergencia como patógeno potencial en cultivos acuícolas en aguas tropicales, con fines comparativos los patrones de resistencia de *V. harveyi* fueron separados del total de vibrios, FIGS. 3 y 4. Agrupando el resto de las especies del género *Vibrio* aisladas de los ambientes silvestre y cultivado, se observó que los niveles de resistencia de *V. harveyi* a los compuestos antimicrobianos fue muy similar al del total de otros vibrios, ya que no se encontró diferencia estadística significativa ($P \leq 0,05$) entre estos 2 grupos, en relación con los 12 antimicrobianos estudiados. Este nivel de resistencia fue alto (250%) para los siguientes compuestos: eritromicina, estreptomina, kanamicina, novobiocina, penicilina G, polimixina B, sulfonamidopotenciada, tetraciclina y triple sulfá.

Los quimioterápicos que presentaron menores valores de resistencia ($R \leq 20\%$) en el ambiente natural, fueron el cloranfenicol, gentamicina y ácido nalidíxico, y en la granja camaronera, los 3 anteriores más la sulfonamidopotenciada.

Todos los vibrios aislados de larvas de cultivo resultaron 100% sensibles a la sarafloxacin.

Considerando que en los primeros 4 muestreos realizados en 1996, se detectaron problemas sanitarios en las larvas examinadas, los datos de resistencia de *Vibrio harveyi* en estos muestreos fueron analizados individualmente. En el primer muestreo, las 2 cepas aisladas de *V. harveyi* fueron 100% resistentes a 10 de los antimicrobianos probados; en el segundo muestreo, la cepa aislada presentó resistencia a 8 compuestos, y en el tercer muestreo, las 2 cepas aisladas mostraron alta resistencia a 7 antimicrobianos. En el cuarto muestreo, aún y cuando ninguna de las especies fue identificada de manera clara como *V. harveyi*, debe mencionarse que las 3 cepas de *Vibrio* (muy relacionadas por sus características fenotípicas a *V. harveyi*) aisladas, tuvieron una alta resistencia a por lo menos 7 antimicrobianos (100% a 6 de éstos).

No se observó diferencia estadística significativa ($P \leq 0,05$) entre la especie *V. harveyi* y el resto de las especies de *Vibrio* ubicadas en un segundo grupo, considerando en conjunto los ambientes silvestre y de cultivo. Sin embargo, el nivel de resistencia de las cepas de esta especie se hizo significativamente mayor ($P \leq 0,05$) cuando se analizaron individualmente las cepas de *V. harveyi* aisladas de las larvas enfermas.

Por último, todas las cepas de *Vibrio* fueron sensibles al agente vibriostático.

DISCUSIÓN

La importancia de los compuestos antimicrobianos en el control de enfermedades infecciosas, ha sido reconocida en acuicultura desde hace años (Gutsell, 1946: citado por [23]). Muchos de estos compuestos han sido empleados en este sector productivo, pero no se cuenta con estudios comparativos detallados [5]. Se argumenta que el uso extensivo de antibiótico se ha convertido en un problema global para la acuicultura, y que esto ha causado serios problemas de resistencia [30]. En este estudio se utilizaron 12 compuestos antimicrobianos, para determinar la sensibilidad a ellos de un gran número de cepas bacterianas, aisladas de poblaciones de peces silvestres sanos y de camarones peneidos aparentemente sanos y enfermos, así como del agua y sedimento del entorno de éstos.

Es preocupante que el 93% de las cepas mostraron resistencia múltiple a los compuestos antimicrobianos. El alto nivel de resistencia de las bacterias recuperadas de animales cultivados, puede ser el reflejo del amplio uso de antimicrobianos, entre ellos de la eritromicina, estreptomina, furazolidona, kanamicina, novobiocina, sulfas y tetraciclina [2, 5, 33], entre otros; sin embargo, en forma general los niveles de resistencia a estos compuestos encontrados en este estudio, no fueron mayores que para algunos de los otros compuestos probados. En lo que se refiere a los animales silvestres, esta alta resistencia podría involucrar la transferencia, mediante plásmidos, de factores R (Aoki, 1988: citado por Austin y col. [5]). La resistencia del género *Vibrio* a los antimicrobianos, ha sido estudiada en un amplio rango de compuestos, que incluyen la ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, nitrofurantoína, novobiocina, estreptomina, sulfonamidas potenciadas y tetraciclinas (Aoki, 1988: citado por Austin y col. [5]).

Ciertamente, debe enfatizarse que los animales silvestres fueron capturados en la cercanía relativa a áreas costeras densamente pobladas, algunas de las cuales ya presentan cierto grado de contaminación. También los plásmidos (factores R) pueden haber tenido su origen en bacterias presentes en otras poblaciones animales cultivadas en granjas, donde el uso de antimicrobianos es frecuente e intenso, ya sea en la prevención de enfermedades predecibles (de presentación frecuente en las diversas etapas de desarrollo animal), en el control de ellas, e incluso como promotores del crecimiento [22]. El uso de agentes antimicrobianos en medicina veterinaria y humana, ejerce una fuerte presión selectiva sobre las bacterias, que conduce al surgimiento y diseminación de genes que actúan sobre el carácter: resistencia a los antibióticos [45]. El incremento de la resistencia de los microorganismos a los agentes quimioterápicos, dificulta el tratamiento de infecciones en el hombre, por las limitaciones que se presentan en la elección de los antibióticos [18]. Los resultados de un estudio realizado por Chandrasekaran y col. [15], sugieren que las bacterias terrestres que penetran en las aguas marinas con plásmidos de resistencia a los antibióticos, pueden ser responsables

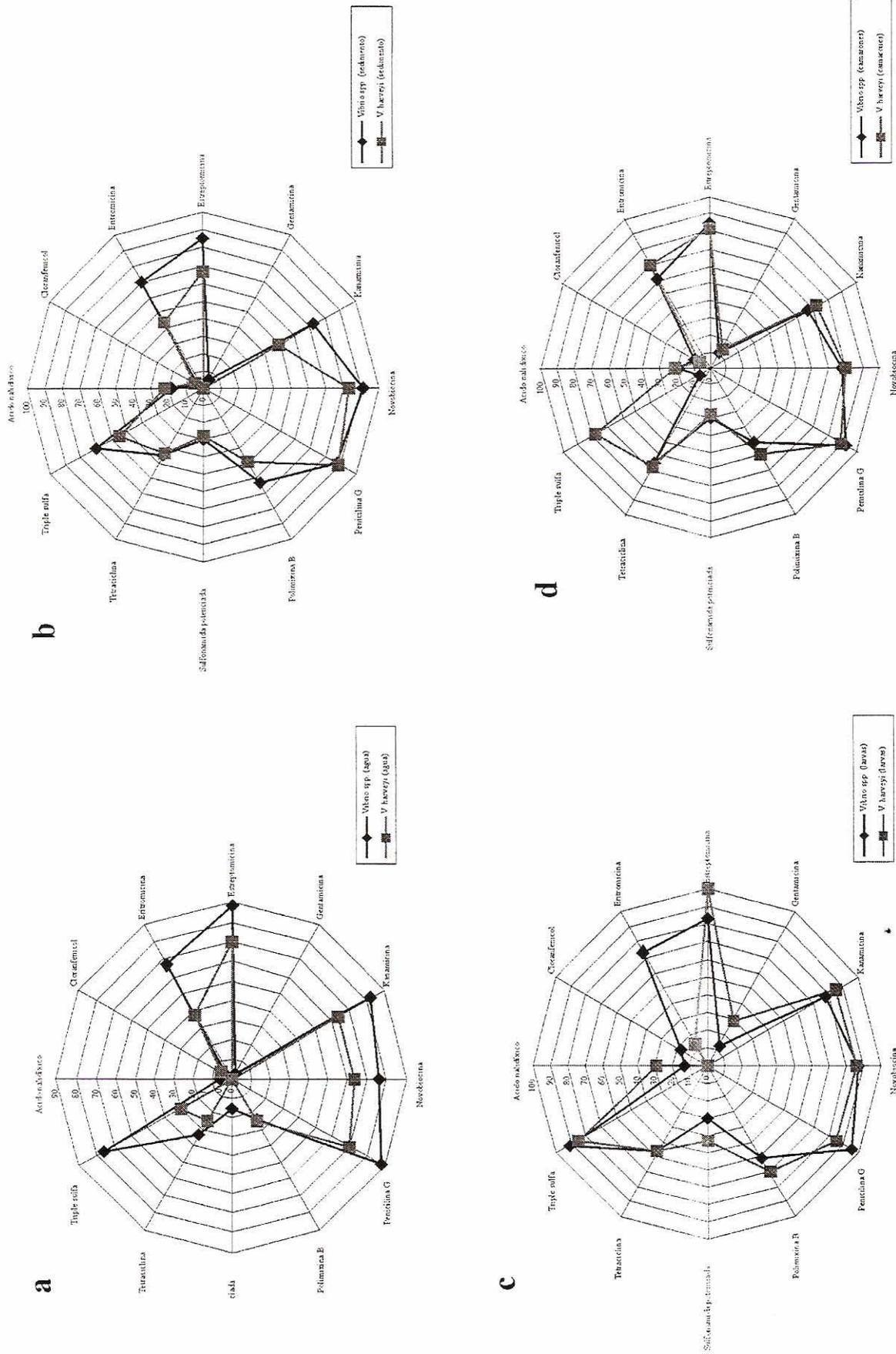


FIGURA 3. RESISTENCIA (%) A LOS ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE VIBRIO AISLADAS DEL AGUA (a), DEL SEDIMENTO (b), DE LISAS CRIOLLAS SILVESTRES (c) Y DE CAMARONES (d), DEL MEDIO AMBIENTE NATURAL (1996-1997).

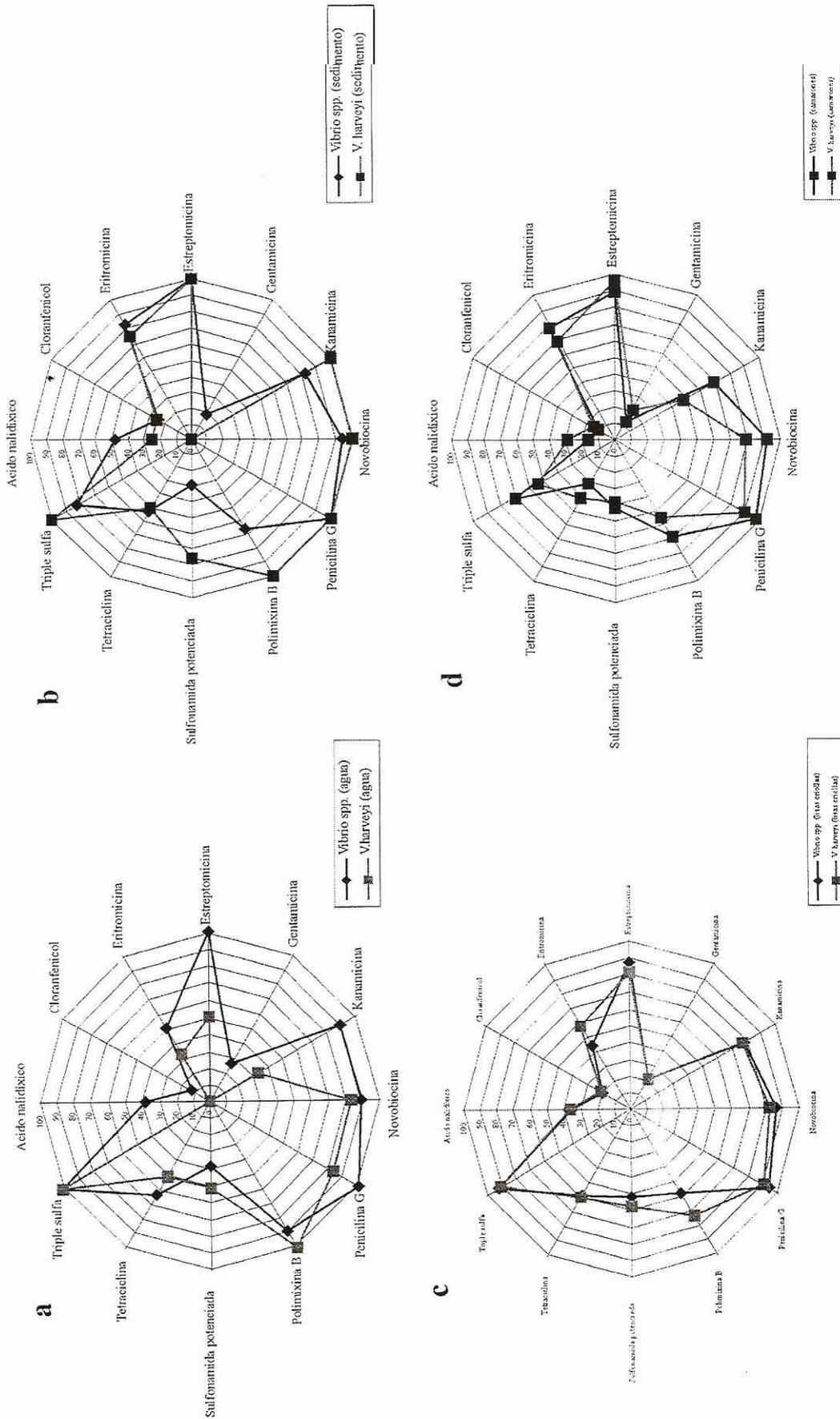


FIGURA 4. RESISTENCIA (%) A LOS ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE VIBRIO AISLADAS DEL AGUA (a), DEL SEDIMENTO (b), DE LARVAS (c) Y DE CAMARONES (d), DE UNA GRANJA DE CULTIVO (1996-1997).

de la prevalencia de estos genes en el ambiente marino. Estas bacterias provendrían de ambientes con altos niveles de resistencia, tales como hospitales, granjas pecuarias y acuícolas, efluentes contaminados con agentes antimicrobianos, acumulaciones de basura, etc.

Considerando el nivel de resistencia observado en compuestos comúnmente aplicados, debe centrarse la atención en un nuevo compuesto antibacteriano, la sarafloxacin (DIFCO), también probado *in vitro* en la presente investigación, contra las bacterias aisladas de larvas de camarones marinos, resultando éstas 100% sensibles. La sarafloxacin es una de las 4-quinolonas de nueva generación, cuyo empleo puede ser de gran utilidad en las granjas de cultivo.

Todos los vibrios resultaron sensibles al agente vibriostático. Shukla y col. [40] detectaron aislados de *Vibrio cholerae* que fueron resistentes al agente vibriostático, la mayoría de los cuales también se mostró sensible al trimetoprim (10 y 150 µg); este fenómeno fue observado igualmente en experiencias anteriores por otros autores. Aoki y col. [2] aislaron cepas de *Vibrio anguillarum* resistentes al trimetoprim, que a su vez fueron sensibles al agente vibriostático, lo que sugiere que estas 2 drogas son compuestos relacionados [42]. Asimismo, Muroga y col. (1979: citado por Aoki y col. [2]) también reportaron el aislamiento de cepas de *V. anguillarum* insensibles al agente vibriostático 01129, y sugirieron que estas cepas a su vez tuvieron una resistencia cruzada con trimetoprim y sulfadoxina. Las características fenotípicas de las cepas de *V. anguillarum* mencionadas en los trabajos anteriores, se correspondieron con las descritas para *V. anguillarum* en el Manual de Bergey [7]. Es por ello que la sensibilidad al vibriostato 01129 tendrá un valor cada vez más limitado, como prueba de rutina para la identificación de *V. anguillarum* [2] y de *V. cholerae*.

La especie *Vibrio harveyi* merece especial mención, ya que ha sido aislada de peces y camarones peneidos silvestres y cultivados en aguas venezolanas [1]. El nivel de resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *V. harveyi*, aisladas del total de muestras analizadas, fue similar al del total de otros vibrios, es decir, de mediano a alto en 9 compuestos. Sin embargo, el nivel de resistencia de las cepas de esta especie aumenta, si se analizan individualmente los 3 primeros muestreos realizados en la camaronera comercial en 1996. Como se dijo anteriormente, durante estos muestreos las larvas procesadas provinieron de poblaciones con problemas sanitarios. Las cepas de *V. harveyi* aisladas fueron 100% resistentes a un rango de 6 a 10 de los antimicrobianos probados.

Epizootias debidas predominantemente a esta bacteria y en forma ocasional a *Vibrio splendidus* (Pitogo, 1988: citado por Baticados y col. [9]), han tenido efectos devastadores en el cultivo de larvas de *Penaeus monodon* en Filipinas. Se cree que los vibrios luminiscentes, habitantes naturales de las aguas costeras, pasan a los huevos y de éstos a las larvas en

el laboratorio de cultivo [9]. El uso rutinario, incluso 2 veces por día, de compuestos antimicrobianos, incluidos algunos utilizados en terapéutica humana, como el cloranfenicol, es una práctica mundial común en los laboratorios de cultivo de larvas. Este uso conlleva a la liberación de compuestos bioactivos en el ambiente acuático. Ejemplos de esto incluyen la liberación de cloranfenicol, oxitetraciclina y el Prefuran en las Filipinas, y el cloranfenicol y la furazolidona en Indonesia. Sin embargo, aun así las vibriosis atribuibles a bacterias luminosas todavía prevalecen en estos países, lo que demuestra la ineficacia de estos compuestos antimicrobianos, o de las dosis usadas, para evitar el desarrollo de resistencia en los patógenos [9]. Baticados y col. [9] realizaron estudios de sensibilidad a los antimicrobianos en larvas de *P. monodon* en el agua de cultivo, determinando sensibilidad al cloranfenicol, ácido nalidíxico, tetraciclina y nitrofuranos, pero resistencia a la eritromicina, kanamicina, penicilina y estreptomycin. En otros estudios los datos presentados demuestran la incapacidad del cloranfenicol, oxitetraciclina y trimetoprim para controlar las vibriosis en granjas camaroneras del Ecuador [14].

Previamente, cepas de *V. harveyi* han resultado resistentes a la estreptomycin, cloranfenicol, eritromycin y co-trimoxazole, pero sensibles a la oxitetraciclina, neomicina y gentamicina [26, 27, 28].

Sin duda alguna, la resistencia a los compuestos antimicrobianos en la acuicultura, es una consecuencia del uso no racional y en gran escala, de un gran número de sustancias utilizadas para combatir las diversas enfermedades de peces y crustáceos [5].

Finalmente, considerando todas las observaciones y datos analizados en este estudio, se concluye que el uso de los antimicrobianos debe ser antecedido por un estudio previo, que establezca claramente la etiología del problema y la susceptibilidad del agente causal a los compuestos antimicrobianos, con el fin de aplicar el tratamiento correcto. Sin embargo, si el cultivo no se realiza en condiciones ambientales y de manejo satisfactorias, la frecuencia de los tratamientos sintomáticos con antimicrobianos aumentará, trayendo consigo el aumento paralelo de la resistencia. Es por ello importante realizar estudios destinados a encontrar vías alternativas al control de las enfermedades bacterianas a través del uso de los antimicrobianos, una de las cuales pudiera ser la aplicación de vacunas y el empleo de agentes terapéuticos que eviten o reduzcan la resistencia.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-MCT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT-MCT), por el financiamiento de esta investigación a través de los Proyectos: INIA 02-241-04003 y CONICIT SI-95000700.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ÁLVAREZ, J.D.; AUSTIN, B.; ÁLVAREZ, A.M.; REYES, H. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimp and fin fish in Venezuela. *J. Fish Dis.* **21**: 313-316. 1998.
- [2] AOKI, T.; KITAO, T.; KAWANO, K. Changes in drug resistance of *Vibrio anguillarum* in cultured ayu *Plecoglossus altivelis* Temminck and Schlegel, in Japan. *J. Fish Dis.* **4**: 223-230. 1981.
- [3] AUSTIN, B. Chemotherapy of Bacterial Fish Diseases. *Fish and shellfish Pathology*: 19-26. 1985.
- [4] AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. Methods for the **microbiological examination** of fish and shellfish. Ellis Horwood Limited. Chichester, England, U.K.. 317 pp. 1989.
- [5] AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. Bacterial Fish Pathogens - **Disease** in Farm and **Wild** Fish. 2nd. Ed. Ellis Horwood Limited. Chichester. England, U.K. 384 pp. 1993.
- [6] AUSTIN, B.; LEE, J.V. Aeromonadaceae and Vibrionaceae. In: Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology. Technical Series of the Society for Applied Bacteriology: 163-182. 1992.
- [7] BAUMANN, P.; FURNISS, A.L.; LEE, J.V. Genus *Vibrio*. Pacini 1854, 411^{AL}. In: N. R. Krieg and J. G. Holt (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.: 518-538. 1984.
- BRANSON, D. Métodos en bacteriología **clínica**. Manual de tests y procedimientos. Editorial Médica Panamericana, S. A., Buenos Aires, Argentina. 256 pp. 1974.
- BATICADOS, M.C.L.; LAVILLA-PITOGO, C.R.; CRUALACIERDA, E.R.; DE LA PENA, L.D.; SUNAZ, N.A. 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. 1990.
- [10] BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Path.* **45**: 493-496. 1966.
- [11] BRISOU, J.; TYSSET, C.; RAUTLIN DE LA ROY, Y.; CURCIER, R. Marine Bacteria *specially* Micrococcaceae. *J. Gen. Microbiol.* **41**: 23. 1965.
- [12] CAPONE, D.G.; WESTON, D.P.; MILLER, V.; SHOEMAKER, C. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture*, **145**: 55-75. 1996.
- [13] CERVIGÓN, F. (Ed.). La acuicultura en Venezuela. Estado actual y perspectivas. Caracas, Venezuela. **121** pp. 1983.
- [14] CEVALLOS, F.; PRADO, C.; FREIRE, A. Commercial management techniques for the control of vibriosis in South American shrimp farms. The 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society. January 29 - February 2. Queen Sirikit. National Convention Center. Bangkok, Thailand. Book of abstracts: 67. 1996.
- [15] CHANDASEKARAN, S.; VENKATESH, B.; LALITHAKUMARI, D. Transfer and Expression of a Multiple Antibiotic resistance Plasmid in Marine Bacteria. *Current Microbiology*. **37**: 347-351. 1998.
- [16] DEMPSEY, A.C.; KITTING, C.L. Characteristics of bacteria isolated from penaeid shrimp. *Crustaceana*. **52**: 90-98. 1987.
- [17] DIFCO. Antimicrobial Susceptibility Test System. **DIFCO** Technical Information **Bulletin 0344**, DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A. 42 pp. 1986.
- [18] FARÍA, J.; RIVERO, Z.; GALLEGOS, B.; ALLARA, M. Resistencia a los antimicrobianos y concentración inhibitoria mínima (CIM) de BGNNGF aislados de leche cruda (II). *REVISTA CIENTÍFICA*, FCV-LUZ. Vol. IX, No. 1, 11-16. 1999.
- [19] FURNISS, A.L.; LEE, J.V.; DONOVANT, J. The Vibrios. *Public Health Laboratory Service. Monograph Series 11*. London, England. U.K. 58 pp. 1978.
- [20] GARRIQUES, D.; ARÉVALO, G. An evaluation of the production and use of live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei postlarvae* in Ecuador. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, U.S.A.: 53-59. 1995.
- [21] GIMÉNEZ, A.; SALAYA, J.J. El financiamiento para la investigación y desarrollo de la acuicultura en Venezuela. **I** Simposio Asociación Latinoamericana de **Acuicultura**, Maracay, Venezuela: 4-8. 1977.
- [22] GUSTAFSON, R.H.; BOWEN, R.E. Antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 531-541. 1997.
- [23] HAMEED, A.S.S.; RAO, P.V. Studies on the chemical control of a *Vibrio campbelli*-like bacterium affecting hatchery-reared *Penaeus indicus* larvae. *Aquaculture*. **127**: 1-9. 1994.
- [24] HUSEVAG, B.; LUNESTAD, B.T.; JOHANNSEN, P.J.; ENGER, O.; SAMUELSEN, O.B. Simultaneous Occurrence of *Vibrio salmonicida* and antibiotic resistant bacteria in sediments at abandoned aquaculture sites. *J. Fish Dis.* **14**: 631-640. 1991.
- [25] ITAMI, T.; TAKAHASHI, Y.; KAWAMURA, Y. Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured Kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *J. Aquat. Anim. Health*. **1**: 238-242. 1989.

- [26] KARUNASAGAR, S.; PAI, R.; MALATHI, G.H. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistance *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*. 128: 203-209. 1994.
- [27] KARUNASAGAR, I.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Effect of chlorination on shrimp pathogenic *Vibrio harveyi*. In: The 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society January 29- February 2, Queen Sirikit National Convention Centre Bangkok, Thailand. Book of abstracts: 193. 1996a.
- [28] KARUNASAGAR, I.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Vibrio haweyi* on surfaces. *Aquaculture* 140: 241-245. 1996b.
- [29] LIGHTNER, D.V.; LEWIS, D. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Rev.* 37: 25-28. 1975.
- [30] MARTINSEN, B.; MYHR, E.; REED, E.; HASTEIN, T. In vitro antimicrobial activity of sarafloxacin against clinical isolates of bacteria pathogenic to fish. *J. Aquat. Anim. Health*. 3: 235-241. 1991
- [31] MOHNEY, L.L.; LIGHTNER, D.V.; BELL, T.A. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *J. World Aquaculture Society*. 25:116-125. 1994.
- [32] MOHNEY, L.L.; WILLIAMS, R.R.; BELL, T.A.; LIGHTNER, D.V. Residues of Oxytetracycline in cultured juvenile blue shrimp, *Penaeus stylirostris* (Crustacea: Decapoda), fed medicated feed for 14 days. *Aquaculture*. 149: 193-202. 1997.
- [33] NUSBAUM, K.E.; SHOTTS, E.B. Action of selected antibiotics on four common bacteria associated with diseases of fish. *J. Fish Dis.* 4: 397-404. 1981.
- [34] PARK, E.D.; LIGHTNER, D.V.; MILNER, N.; MAYER-SOHN, M.; PARK, D.L.; GIFFORD, J.M.; BELL, T.A. Exploratory bioavailability and pharmacokinetic studies of sulphadimethoxine and ormetoprim in the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 130: 113-128. 1995.
- [35] PEARSON, M.; INGLIS, V. A sensitive microbiology assay for the detection of antibacterial agents in the aquatic environment. *J. Fish Dis.* 16: 255-260. 1993.
- [36] PEDERSEN, K.; VERDONCK, L.; AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A.; BLANCH, A.R.; GRIMONT, P.A.D.; JOFRE, J.; KOBLAVI, S.; LARSEN, J.L.; TIAINEN, T.; VIGNEULLE M.; SWINGS, J. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* (Grimes et al. 1984b) is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Baumann et al. 1980). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 749-758. 1998.
- [37] SAKATA, T. Microflora of healthy animals. In: Austin, B. & D.A. Austin (Ed). *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, U.K.: 141-163. 1989.
- [38] SAMUELSEN, O.B. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture*. 83: 7-16. 1989.
- [39] SANO, T.; FUKUDA, H. Principal microbial diseases of mariculture in Japan. *Aquaculture*. 67: 57-69. 1987.
- [40] SHUKLA, B.N.; SINGH, D.V.; SANYAL, S.C. Attachment of nonculturable toxigenic *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp. to the aquatic arthropod *Gerris spinolae* and plants in the River Ganga, Varanasi. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 12: 113-120. 1995.
- [41] SIEGEL, S. El caso de dos muestras independientes. Capítulo 6. En: *Estadística no Paramétrica. Aplicadas a las ciencias de la conducta*. 3ra. ed. Español. Editorial Trillas. Distrito Federal, México: 120-186. 1994.
- [42] SMITH, C.C.; GENTHER, C.S. Cross-resistant and collateral susceptibility to antifolate antimalarial compounds. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 2: 103-108. 1972.
- [43] WARDLAW, A.C. **Practical** Statistics for Experimental Biologists. John Wiley & Sons Limited, New York, New York, U.S.A. 380 pp. 1985.
- [44] WEDEMEYER, G.A.; WOOD, J.W. Stress as a predisposing factor in fish diseases. **United States Department of the Interior**. Fish **Disease** Leaflet 38, Washington, U.S.A. 8 pp. 1974.
- [45] YOUNG, H.K. Antimicrobial resistance in aquatic environment. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 627-635. 1993.