

Hepatopancreatitis Necrotizante asociada al Fenómeno del Niño, en cultivos de camarones del Golfo de Nicoya

AGR. IND. ALEXANDER VARELA MEJÍAS¹ & ING. NELSON PEÑA NAVARRO²

1. Laboratorio de Patologías y Parasitología de Crustáceos, Egresado UNED Agroindustria; alexander.varela@gmail.com
2. Dirección de Investigación, Universidad Técnica Nacional, Sede del Pacífico, UTN; npena@utn.ac.cr

Recibido: 13 febrero 2015

Aceptado: 05 marzo 2015

RESUMEN

Se presenta a continuación la descripción de un brote de Hepatopancreatitis Necrotizante en camarones *Litopenaeus vannamei* cultivados en el Golfo de Nicoya, Costa Rica, exacerbado por las condiciones climáticas típicas del fenómeno del Niño caracterizado por las altas temperaturas y salinidades durante el 2014, se presentan además los diferentes tipos de análisis realizados para su seguimiento y conservación, sus resultados y la descripción de las principales lesiones observadas por esta enfermedad.

Palabras clave: clima, temperaturas, salinidad, brote.

ABSTRACT

Is presented the most important the description of Necrotizing Hepatopancreatitis out break in shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured in the Nicoya Gulf, Costa Rica, exacerbated by the atypical climatic conditions of the Niño phenomena characterized by high temperatures and salinities during 2014, are also different types of analyses performed for monitoring and conservation, their results and the description of the main lesions observed by this disease.

Key words: climate, temperature, salinity.

Históricamente, el impacto de las enfermedades infecciosas en las producciones acuícolas ha sido causa de grandes pérdidas económicas (Peña *et al*, 2013). Este factor de riesgo cobra especial relevancia cuando se presentan condiciones ambientales que favorezcan eventos patológicos, tal como lo demuestra los brotes del virus WSSV en épocas de temperaturas bajas (Varela y Peña, 2014) y la incidencia de la Hepatopancreatitis

Necrotizante Bacterial en épocas de alta temperatura y salinidades intermedias y altas (Vincent y Lotz, 2007; Morales-Covarrubias, 2008; Morales y Cuellar-Ánjel, 2014).

Durante el año 2014 y como consecuencia del fenómeno del Niño, se registraron condiciones anómalas en la mayoría de los estanques de cultivo del golfo de Nicoya, en los cuales la temperatura del agua superó los 34 centígrados y las salinidades fueron superiores a las 35 a 40 ppt. (Registros de fincas, datos no mostrados).

Coincidiendo con ello, durante los meses de junio y julio de ese año se presentó un importante aumento en la presencia de animales con signos clínicos consistentes a infecciones por Hepatopancreatitis Necrotizante o NHP (por sus siglas en inglés), acompañado de mortalidades variables.

Los signos clínicos de esta enfermedad incluyen hepatopáncreas pálidos, intestinos vacíos o con contenidos entrecortados, anorexia, letargia, pérdida de tono muscular caudal y cutícula áspera (Lightner, 1996; Morales. Covarrubias, 2008; Morales y Cuellar-Ánjel, 2014).

Esta enfermedad constituye una de las más importantes en camarones de cultivo, siendo la única de origen bacterial actualmente presente en la lista de declaración obligatoria para crustáceos ante la Organización Mundial de Salud Animal, OIE, por sus siglas en francés (Varela, 2013), y de reporte obligatorio ante las autoridades competentes en nuestro país, según el decreto 34669 (La Gaceta, 2008).

La enfermedad de la Hepatopancreatitis Necrotizante fue inicialmente denominada Hepatopáncreas Granulomatoso, por ser la

formación de granulomas uno de sus efectos citopáticos principales en este órgano y ha sido la causa de eventos infecciosos de gran impacto en América. Se detectó inicialmente en Texas, USA, en 1985. Para propagarse posteriormente a Centro y Sur América. Incluyendo los cultivos de *Litopenaeus vannamei* en Costa Rica (Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2008; Morales y Cuellar-Ánjel, 2014; Vincent y Lotz, 2007).

NHP da lugar a una infección severa provocada por bacterias intracelulares obligadas, pleomórficas, y recientemente clasificadas por análisis filogenético de la secuencia 16S rRNA y la Girasa B gene como rickettsias, bajo el nombre de propuesto de *Candidatus Hepatobacter penaei* (Nunan *et al*, 2013); este tipo de bacterias, por su carácter de intracelulares obligadas, no puede ser cultivadas en medios artificiales típicos, su estructura es Gram negativa, mótilis mediante ocho flagelos localizados en su ápex basal. Presenta dos variantes morfológicas, en forma helicoidal, sus dimensiones son de 0,25 µm por 3,5 µm, y la forma bacilar predominante con 0,25 µm por 0,9 µm (Lightner, 1996; Morales y Cuellar-Ánjel, 2014; Nunan *et al*, 2013), las cuales infectan y se multiplican en el citoplasma de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas (Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2008). Alcanzando altas concentraciones en los tejidos afectados, incluso, mediante cuantificación por de PCR en tiempo real se ha determinado que las infecciones letales contienen 10⁶ a 10⁷ copias/mg de hepatopáncreas (Vincent y Lotz, 2005).

Los signos clínicos de esta enfermedad no son específicos y se requiere análisis laboratorial de los animales sospechosos para su confirmación. En brotes severos y persistentes es capaz de causar mortalidades acumuladas superiores al 90% de las poblaciones de estanques afectados, tanto en sistemas de cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* como de camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2013 y 2010; Morales y Cuellar-Ánjel, 2014; Vincent y Lotz, 2007).

En muestras procesadas para análisis mediante montajes en fresco del hepatopáncreas es común observar una reducción o ausencia de

reservas lipídicas con túbulos melanizados, desprendimiento de células epiteliales y deformaciones tubulares; por análisis histopatológicos teñidos con tinción de hematoxilina y eosina (H&E), se observan las características lesiones granulomatosas multifocales en el hepatopáncreas, así como una infiltración hemocítica masiva acompañada de melanosis. Las células desprendidas muestras citoplasmas basofílicos por la colonización bacterial y atrofia severa en fase la terminal sin respuesta inflamatoria. Mediante análisis moleculares, es posible detectar secuencias específicas del genoma bacterial, utilizado la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), método de gran valor por su sensibilidad y especificidad (Briñez *et al*, 2003; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2008 y 2010; Morales y Cuellar-Ánjel, 2014; Varela, 2007).

Se han desarrollado además, métodos alternativos no destructivos, mediante PCR en tiempo real para cuantificación de NHP en heces (Vincent y Lotz, 2005).

Dado que los signos clínicos son comunes a otras enfermedades y ante la necesidad de verificar la etiología del brote sospechoso reportado se realizó una serie de análisis para confirmar la etiología, incluyendo análisis en fresco, bacteriología, histopatología y Reacción en Cadena de Polimerasa.

Materiales y métodos

Se procesaron muestras selectivas de diez animales, capturados de estanques que presentaban signos clínicos de la enfermedad. Para el procesamiento de las muestras se siguieron las metodologías descritas por Morales-Covarrubias (2010) en análisis en fresco; Bell y Lightner (1988) para histopatología y Lightner (1996) para PCR.

Adicionalmente, se realizó bacteriología en Agar Tripticosa Soya (TSA) y Agar Tiosulfato, Citrato y Bilis (TCBS) para *Vibrio* sp., con el fin de descartar posibles infecciones bacteriales secundarias. Según la metodología descrita por Cuellar-Ánjel (2008) modificada para estómagos y hepatopáncreas.

Resultados

Análisis en fresco

Los tejidos procesados presentaron lesiones típicas de infecciones severas en las dos etapas extremas de la enfermedad. Durante la etapa aguda se detectó la presencia de túbulos necróticos, fuertemente melanizados, una marcada disminución de reservas lipídicas, (Fig. 1). En muestras procesadas en la etapa crónica no se observó una disminución en la respuesta inflamatoria, con ninguna o pocas lesiones melanizadas y necróticas. Los túbulos se observaban ectásicos, con ausencia total de reservas lipídicas, edemas y sin pigmentos así como una severa atrofia general del hepatopáncreas (Fig. 2).

Este tipo de lesión, en especial la necrosis observada en la figura 1, es fácilmente confundible con otras enfermedades bacteriales, tales como provocada por la Necrosis Séptica del Hepatopáncreas, SHPN (Dr. Pantoja, C; Comunicación personal). Por lo que los montajes en fresco requieren de experiencia y generalmente, ante dudas razonable, se recomienda la realización de cortes histopatológicos. Del mismo modo, las infecciones por NHP y SHPN

no son excluyentes, por lo cual es conveniente realizar análisis bacteriológicos en paralelo, ante la posible coexistencia de infecciones bacteriales secundarias.

Resultados de bacteriología

Se presentan a continuación los resultados obtenidos a las muestras de camarones procesados con sintomatología clínica de NHP. Realizados con 5 repeticiones. Se indican los conteos promedio y las desviaciones estándar de muestra.

Los análisis se realizaron en Agar TSA y Agar TCBS, ambos con salinidades ajustadas para especies marinas.

Tal como se observa en las tablas 1 y 2 y usando como referencia la tabla 3 para conteos en HP (Morales-Covarrubias, 2008) los resultados de bacteriología no sugieren de la presencia de infecciones secundarias por *Vibrio* sp., la alta desviación estándar de la muestra no indica un patrón infeccioso estable. No se dispone de tablas de referencia para conteos en estómagos.

Con respecto a los tiempos de coagulación de hemolinfa, los resultados fueron normales (<30 seg) y el conteo de hemograma total

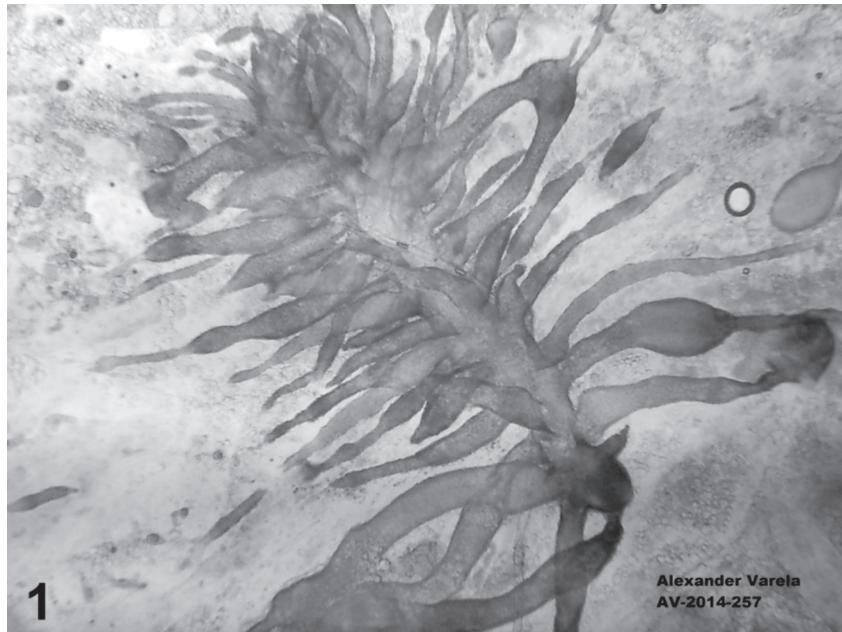


Figura 1. Montaje en fresco de hepatopáncreas, se observa tejido fuertemente afectado, con masiva necrosis y melanosis. Se observan pocas reservas lipídicas. 400x, sin tinción. Foto A. Varela.

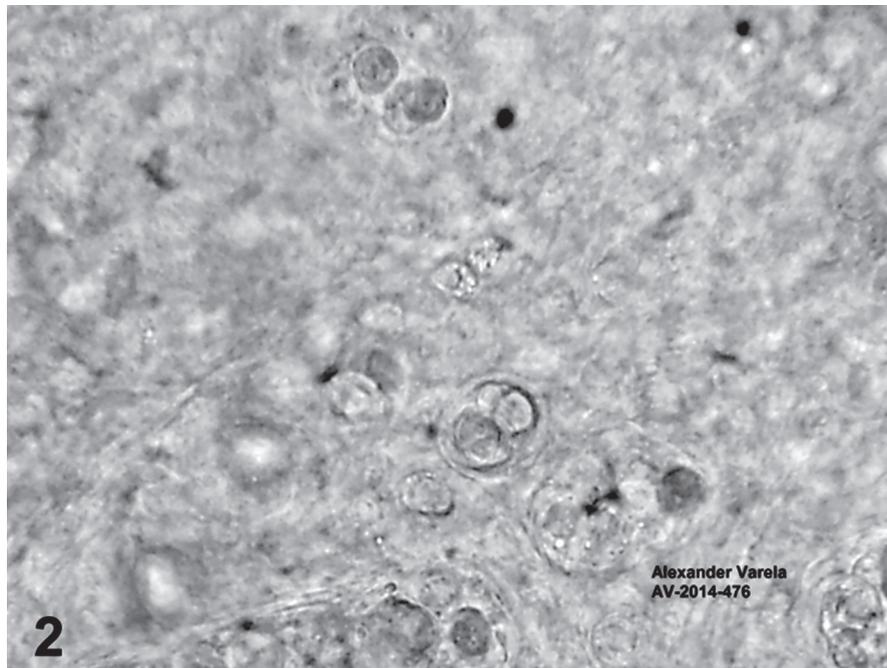


Figura 2. Montaje en fresco de hepatopáncreas en transición hacia la fase crónica, se observan nódulos multifocales. Presencia múltiple de células hipertrofiadas y escasa respuesta inflamatoria 1000x, sin tinción. Foto A. Varela.

CUADRO 1

Resultados de bacteriología en Hepatopáncreas

| | UFC/HP | Desv. Est. |
|------------------------|----------|------------|
| TSA | 7,20E+04 | 64699,3 |
| TCBS | 5,20E+04 | 27313,0 |
| TCBS, No sacarolíticas | <10% | |
| TCBS, Luminiscentes | <10% | |

CUADRO 2

Resultados de bacteriología en estómago

| | UFC/Estom | Desv. Est. |
|------------------------|-----------|------------|
| TSA | 2,00E+05 | 128945,4 |
| TCBS | 6,15E+04 | 46285,0 |
| TCBS, No sacarolíticas | >75% | |
| TCBS, Luminiscentes | <25% | |

CUADRO 3

Tomado de Morales-Covarrubias, 2008

| Tipos de colonias | UFC/g de hepatopáncreas | |
|---------------------------|-------------------------|--------------|
| | >100 000 | <100 000 |
| 100% Verdes luminiscentes | Grave | Grave |
| Verdes >50% | Serio | Serio |
| Verdes <50% | Serio | Serio-Normal |
| Amarillas | Normal | Normal |

presentó resultados normales (TCH=31 500 ± 2 000 cel/mm³) (Cuellar-Ánjel, 2008; Morales y Cuellar-Ánjel, 2014).

Histopatología

Los tejidos procesados mediante histopatología para NHP, presentan inicialmente una

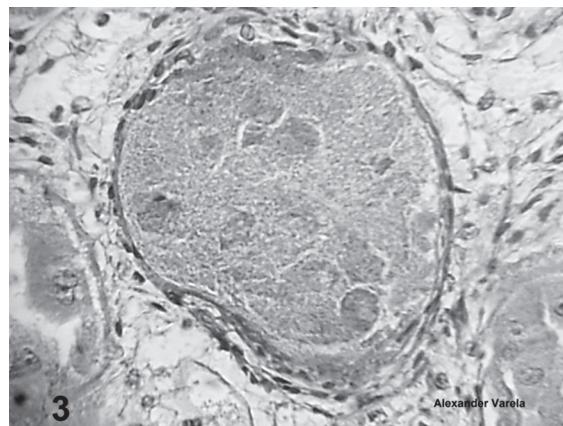


Figura 3. Corte histopatológico de HP afectado por NHP-B, se observan múltiples granulomas, con células basofílicas en su interior y capas de hemocitos rodeándolo. No se observan reservas lipídicas. 400x, Tinción H&E. Foto A. Varela.

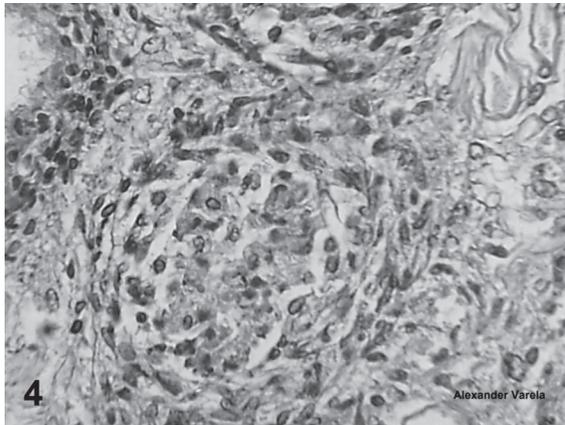


Figura 4. Corte histológico de hepatopáncreas con infección por NHP-B, se observa una fuerte respuesta inflamatoria. Rodeando los túbulos afectados. Las células desprendidas presentan núcleos picnóticos. 400x, Tinción H&E. Foto A. Varela.

disminución de las reservas lipídicas, exfoliaciones tubulares de células basofílicas, granulomas y necrosis tubular (figuras 3 y 4). Durante la fase crónica, la respuesta inflamatoria disminuye hasta desaparecer, los túbulos se atrofian y se presentan regiones edematizadas.

Reacción en Cadena de Polimerasa PCR

Mediante envío de muestras conservadas en etanol al Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios, LANASEVE, en el mes de agosto, se confirmó la etiología del brote como Hepatopancreatitis Necrotizante, NHP. Reportado en el protocolo de análisis LSE0402-14.

Discusión y recomendaciones finales

La utilización de análisis en fresco al inicio del brote infeccioso, brindó resultados consistentes con NHP en fases aguda, transición y crónica, apoyado con resultados bacteriológicos, se descartó la participación de bacterias tipo *Vibrio* sp. Como posibles patógenos secundarios.

Los resultados de histopatología son consistentes a infección aguda por NHPB, corroborando las observaciones generadas por los análisis en fresco y las observaciones de campo y signos clínicos.

El resultado de la Reacción en Cadena de Polimerasa, confirmó la presencia de *Candidatus Hepatobacter penaei* como el agente etiológico del brote y a Hepatopancreatitis Necrotizante como la enfermedad presente.

Determinada la identidad del agente causal, es posible desarrollar protocolos de manejo y terapias para los tratamientos de los estanques. Entre las terapias que se reportan con efectividad para estas infecciones, se encuentran el uso de antibióticos (Morales-Covarrubias en www.oie.int).

Es importante considerar que toda terapia requiere de identificación irrefutable del agente causal, del mismo modo, la antibioterapia, su dosis, tiempo de aplicación y periodo de retiro, deben ser supervisados por profesionales responsables y calificados.

Finalmente, la presencia de NHP en camarones de cultivo, no representa un riesgo para los consumidores, debido a que esta se concentra en un órgano ubicado en la cabeza de los camarones, generalmente no son consumidas, además, la bacteria causante de esta enfermedad infecta exclusivamente este tejido y no es capaz de infectar o enfermar a otras especies, incluyendo a la humana, por lo que no representa un riesgo zoonótico.

Bibliografía consultada

- Bell, T. A. & Lightner, D. V. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Briñez, B; Aranguren, F; Salazar, M. 2003. Fecal samples as DNA source for the diagnosis of Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. Dis Aquat Org [55] 69-72.
- Cuéllar-Ánjel, J. 2008. Métodos de diagnósticos de enfermedades en camarones marinos de cultivo. pp 1-54. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Ánjel (eds.). Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, República de Panamá. 270 p.
- La Gaceta (2008). Decreto sobre el Listado de enfermedades animales de declaración obligatoria. Diario Oficial La Gaceta No. 156: 3-5.

- Lightner D,V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Morales, M.S. 2013. Camarón Análisis en Fresco, herramienta de diagnóstico. 1era. edición. CIAD-OIRSA, pp 86.
- Morales-Covarrubias, M. S. 2010. Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas. México, D.F. 130 p.
- Morales-Covarrubias, M.S. 2008. Enfermedades bacteriales. In: Guía técnica patología e inmunología de camarones penaeidos. Morales, V. y J. Cuéllar- Ánjel. Eds. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá.
- Morales, V; Cuellar-Ánjel, J (2014) Guía técnica. Patología e inmunología de camarones penaeidos, OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382p.
- Nunan, L; Pantoja, C; Gómez-Jiménez, S; Lightner, D. 2013. "Candidatus *Hepatobacter penaei*" an Shrimp *Penaeus vannamei* in the Hepatopancreas of the Marine Intracellular Pathogenic Enteric Bacterium (Crustacea: Decapoda). Appl. Environ. Microbiol. 10.1128/AEM.02425-12. 2013, 79(4):1407.
- Peña, N., R. Vargas, A. Varela 2013. Productos naturales como estimuladores del sistema inmunológico de *Litopenaeus vannamei*, infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. Rev. Agron. Mesoam. 24 (1):133-147.
- Varela, A (2013). Enfermedades bacteriales en camarón de cultivo de mayor importancia para C. R. Presentación en el Taller Internacional de Patologías de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con fines de cultivos comerciales en Costa Rica. Dirección de Investigación, Universidad Técnica Nacional, Sede Puntarenas.
- Varela, A. 2007. Manual para la interpretación de resultados de laboratorio. Alicorp, Publicis- Asociados, Perú. 24 p.
- Varela, A; Peña, N. 2014. Fluctuaciones térmicas y su relación con el Virus del Síndrome de las Manchas en *Litopenaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya. Revista UTN Informa, 68, [80-83], Universidad Técnica Nacional. Costa Rica.
- Vincent, A; Lotz, J. 2007. Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to Kona stock *Litopenaeus vannamei*. Dis Aquat Org [75] 265-268.
- Vincent, A; Lotz, J. 2005. Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP-bacterium using real-time PCR. Dis Aquat Org [67] 163-169.