

## Hepatopancreatitis necrotizante (NHP). Identificación etiológica por métodos histopatológicos y moleculares en el camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei*

### Necrotizing hepatopancreatitis (NHP). Etiologic identification for histopathologic and molecular test in shrimp *Litopenaeus vannamei*

Manuel Rubio, Adriana Artilles, Raquel Silveira, Osmel García y Norma González  
Centro de Investigaciones Pesqueras, 5ta. Ave. y calle 246, Santa Fe, Playa,  
La Habana, Cuba, CP: 19100, Teléfono: (537) 209-7852,  
E-mail:mrubio@cip.telemar.cu

#### RESUMEN

La hepatopancreatitis necrotizante (NHP) es una enfermedad que se presenta en el cultivo de camarones *Litopenaeus vannamei* en Cuba y que produce grandes pérdidas económicas. Para el diagnóstico de esta patología han sido utilizadas las técnicas histopatológicas convencionales con tinción por Eosina & Hematoxilina, Giemsa o tinción de Steiner & Steiner y las moleculares Hibridación *in situ* con sondas de ADN específicas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como métodos de diagnóstico confirmatorios (OIE, 2009). En el presente trabajo se realizó una comparación de los resultados de las técnicas histológicas convencionales con tinción (E & H) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de la (NHP) en Cuba, utilizando como datos los resultados obtenidos en el CIP en los muestreos realizados en las granjas de cultivo durante el período 2005-2010, pues algunos signos presentes en esta patología son comunes para diferentes infecciones bacterianas. Los resultados muestran que los métodos utilizados son sensibles y eficaces para realizar el diagnóstico definitivo de la enfermedad, pero que en todos los casos deben realizarse ambas pruebas para identificar con certeza al agente causal de la epizootia.

*Palabras clave:* NHP, diagnóstico, histopatología, PCR, *Litopenaeus vannamei*.

#### ABSTRACT

The necrotizing hepatopancreatitis (NHP) is a disease present in Cuba in cultured shrimp *Litopenaeus vannamei*, which is responsible of large economic loses. For diagnosis of this pathology, conventional histopathological techniques such as Eosine & Hematoxiline (E-H), Giemsa or Steiner & Steiner stains have been used, as well as molecular ones: *in situ* hybridization with DNA specific probes and Polymerase chain reaction (PCR) as confirmatory methods for diagnosis (OIE, 2009). In the present work, a comparison of results obtained by both kinds of techniques was made using a conventional stain (E-H) for histopathology and PCR as molecular tool for NHP identification in Cuba. Results obtained in Fisheries Research Center (CIP, for Spanish abbreviations) from shrimp farms between 2005-2010 years were used because some pathological signs and symptoms are commons for different bacterial infections. The results shows that both methods are sensitive and efficient to make a definitive diagnostic of disease, but in all cases both them should be use for a correct identification of the etiological agent.

*Keywords:* NHP, diagnostic, histopathology, PCR, *Litopenaeus vannamei*.

## INTRODUCCIÓN

La necrosis del hepatopáncreas (NHP), es una severa enfermedad provocada por varios agentes, según estudios histopatológicos y ultraestructurales. Puede ser causada por una bacteria que representa un nuevo género dentro de las Alpha-proteobacterias, altamente pleomórfica, gram negativa y aparentemente un parásito intracelular obligado de replicación citoplasmática a nivel de

las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas (Krol *et al.*, 1991; Lightner, *et al.*, 1992; Loy *et al.*, 1996; Gámez *et al.*, 2007). De este se reportan dos variantes morfológicamente distintas determinadas mediante microscopio de transmisión electrónica: una en forma de bacilo, similar a las rickettsias verdaderas las cuales miden alrededor de 0,3  $\mu\text{m}$  x 9  $\mu\text{m}$ , carente de flagelo y una forma helicoidal que mide de 0,2  $\mu\text{m}$  x 2,6 a 2,9  $\mu\text{m}$ , con ocho flagelos en el ápice basal de la bacteria y un flagelo adicional (o posiblemente dos) en la cresta del hélix (Frelier *et al.*,

1992; Lightner & Pantoja, 2005). Otros agentes pueden ser diferentes cepas extracelulares del género *Vibrio* (Morales, 2010).

Esta enfermedad tiene una distribución geográfica documentada. En América, se reporta su aparición inicial en Texas en 1985 en Estados Unidos por Johnson (1990) citado por (Vincent & Lotz, 2005) como hepatopáncreas granulomatoso para posteriormente ser reportada en Perú, Costa Rica, Panamá, Brasil, Venezuela, Ecuador, México, Colombia, Belice, Nicaragua, El Salvador, Guatemala y Honduras (Lightner *et al.*, 1992, 1996; Frelie *et al.*, 1992, 1994; Ibarra *et al.*, 2007; OIE, 2009; Morales, 2010), provocando mortalidades entre el 20 y 95 % en los sistemas de cultivo de *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco del Pacífico) y *Litopenaeus stylirostris* (camarón azul) (Loy *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 2008; Morales, 2010). Esta enfermedad también se ha detectado en camarón blanco cultivado en Eritrea, con mortalidades en cultivo del 15 al 30 % durante el primer y segundo año de su introducción.

El diagnóstico de esta patología inicialmente se realizó mediante el examen clínico de los animales, pero las manifestaciones observadas no resultaban específicas, por lo que el diagnóstico pasó a basarse además en el análisis en fresco del tejido del hepatopáncreas (Lightner, 1996). En la actualidad estos han pasado a ser métodos presuntivos, y se utilizan como métodos de diagnósticos confirmativos los análisis: histopatológico convencional con tinción por Eosina & Hematoxilina, Giemsa o tinción de Steiner & Steiner, y los moleculares hibridación *in situ* o en *dot-blot* con sondas de ADN específicas así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés – Polymerase Chain Reaction) basada en la amplificación de secuencias de ADN de la bacteria para la identificación del patógeno (Gamez *et al.*, 2007; Ibarra *et al.*, 2007; OIE, 2009).

En Cuba el NHP se presentó en el cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* desde el año 2005, empleando diferentes métodos diagnósticos en la identificación de esta patología, que ha mostrado variaciones en cuanto a su agente etiológico. El presente trabajo realiza una comparación del resultado de los diagnósticos de NHP realizados por histopatología convencional (tinción con hematoxilina y eosina) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación del agente causal y su distribución en Cuba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el período comprendido entre los años 2005-2010 se realizaron 77 muestreos aleatorios simples en seis granjas con cultivo semiintensivo del camarón *Litopenaeus vannamei*.

Se estudiaron como sospechosas de la enfermedad las granjas con animales con signos clínicos indicativos de NHP como: reducción del consumo diario de alimento balanceado; tasa de crecimiento reducida, mortandad y animales con cutícula blanda y cuerpos flácidos manifestado por caparazón rugoso, quebradizo y blando; pigmentación acentuada por efecto de la dilatación de los cromatóforos y letargia.

Como los signos clínicos no son específicos, se toman como positivas aquellas muestras que al análisis en fresco en el microscopio de luz presentaron atrofia del hepatopáncreas, estrangulamiento o necrosis tubular, reducción o ausencia de vacuolas lipídicas en el epitelio, infiltración hemocítica y túbulos melanizados, necrosis multifocales, así como presencia de cantidades masivas de bacterias intracelulares y extracelulares en los túbulos.

Los camarones fueron procesados indistintamente para la aplicación de las técnicas histopatológica y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para el estudio histopatológico se tomaron fragmentos de tejido de hepatopáncreas que fueron fijados en solución AFA de Davidson (Humason, 1979; OIE, 2009) para crustáceos durante 48 h y alcohol al 50 % durante 24 h y procesadas según Bell & Lightner (1988) con tinción con Eosina & Hematoxilina de Meyer-Bennett (E & H).

Para el diagnóstico molecular mediante la técnica de PCR, la extracción de ADN y la amplificación de una región conservada del patógeno y el hospedero se realizó siguiendo las instrucciones de los fabricantes del kit (Farming IntelliGene Tech. Corp. <http://www.iq2000kit.com>) a partir de hepatopáncreas de camarón. Las muestras de ADN fueron disueltas en agua libre de nucleasas. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MJResearch, con la mezcla de reacción especificada en el kit y el programa descrito en el manual. Los productos amplificados de las muestras y los respectivos controles fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñida con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador FBTI – 88 (Fisher Biotech). En todos los ensayos se utilizó un control positivo del kit, un control negativo con agua o ARNt de levadura y se aplicó en la corrida electroforética un patrón de peso molecular del kit con tres bandas: 848 pb, 630 pb y 333 pb.

Se consideró una muestra positiva si hay una banda de 325 pares de bases y negativa si esta no está y hay un control interno de 848 pares de bases, correspondiente a una región conservada de camarón.

## RESULTADOS

La primera sospecha de la presencia del NHP estuvo caracterizada clínicamente por la marcada reducción en el consumo de alimento, letargia, cutícula blanda, cuerpos flácidos y expansión de cromatóforos con pleópodos y

urópodos de coloración oscura, animales agrupados en la orilla de los estanques muertos o moribundos, proceso que se observó en noviembre de 2005 en la granja (Cultisur). Durante el transcurso de ese mismo mes se sospechó la presencia de la enfermedad en la sala de maduración del Centro de Producción de Postlarvas Yaguacam. Esta situación condujo a la realización de un diagnóstico en fresco y análisis histopatológico con resultados positivos a la presencia de hepatopancreatitis necrotizante en las dos camaroneras analizadas que representaban el 33,3 % de las existentes en el país.

A partir del año 2006 con la estandarización del PCR se realizó la identificación de la bacteria a niveles subclínicos y se describieron las lesiones histológicas de la enfermedad en el 100 % de las camaroneras. En el 2007 con la adquisición de los kit IQ-2000 para NHP-B se llevó a cabo la confirmación de los diagnósticos realizados, con resultados positivos en todos los casos evaluados con diferentes niveles de infección. Estos resultados confirmaron, mediante ambos métodos diagnósticos, la presencia durante el período 2005-2007 de NHP-B (Fig. 1), con niveles de leves a moderados.

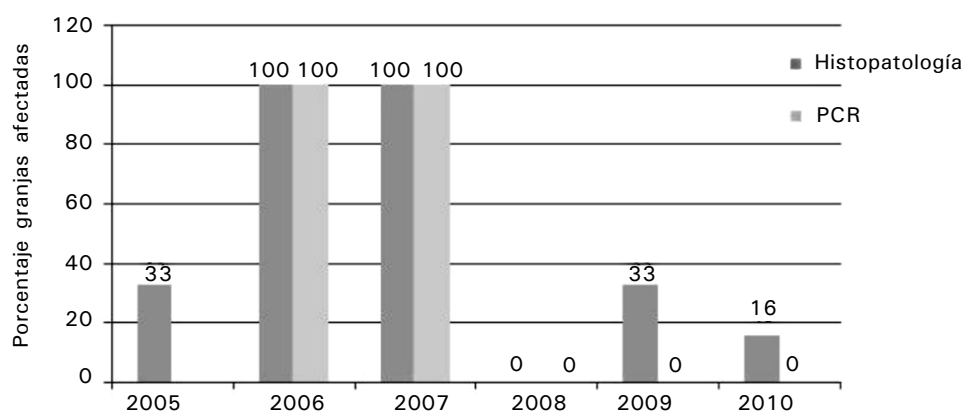


Fig. 1. Comparación de resultados positivos a NHP por diferentes métodos diagnósticos.

Las lesiones histopatológicas observadas durante este período (Fig. 2) se caracterizaron por deformación de los túbulos del hepatopáncreas con células hipertrofiadas, escasas vacuolas lipídicas y secretoras, atrofia y abundante desprendimiento celular, células epiteliales hipertrofiadas con cúmulos bacterianos intracitoplasmático, túbulos atrofiados, melanizados, necrosis multifocal de los túbulos rodeados de un infiltrado hemocítico y fibroblastos.

Para el último trimestre del 2007 fueron declaradas tres granjas sin presencia de la enfermedad como resultados de las pruebas histopatológica y PCR. Esta situación fue mejorando en el 2008 donde los diagnósticos realizados al 100 % de las camaroneras determinaron la no existencia de manifestaciones clínicas de la enfermedad en ninguna de las granjas, diagnóstico confirmado mediante los exámenes histopatológico y PCR donde los resultados coincidieron como de negativos a la presencia de NHP-B.

Para el año 2009 comienzan a manifestarse en el 33,3 % de las camaroneras mediante el diagnóstico histopatológico necrosis del hepatopáncreas, pero al realizar análisis por PCR (Fig. 3), estas resultaron

negativas a la presencia de NHP-B. Igual particularidad se presentó en el 2010 en el 16,6 % de las camaroneras evaluadas.

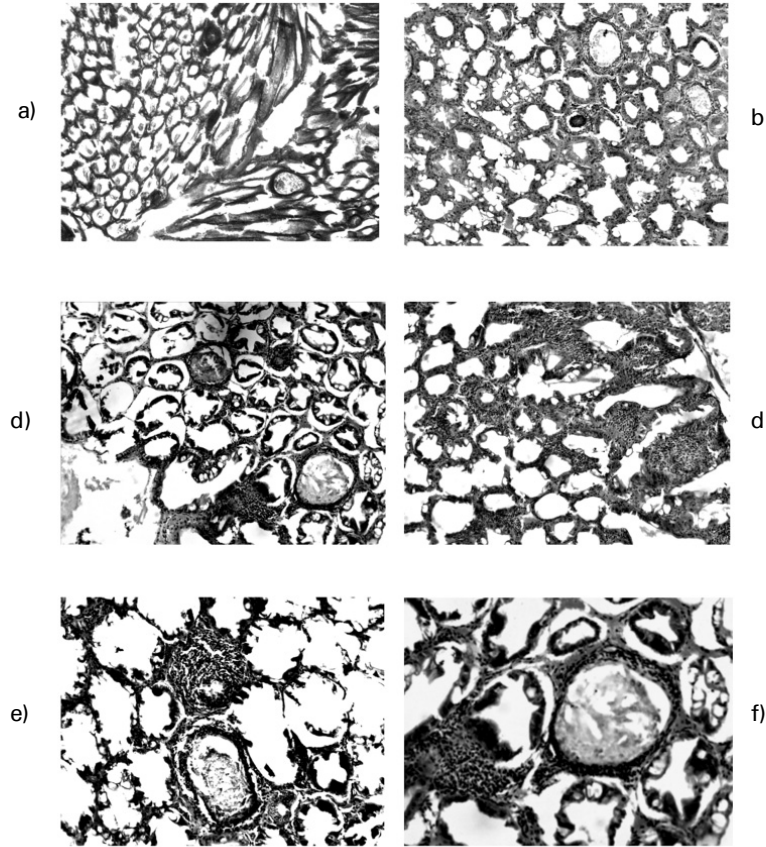
Los estudios histopatológicos realizados durante el período 2009-2010 mostraron diversos grados de afectación tisular del hepatopáncreas, describiéndose como lesiones principales atrofia de los túbulos con células epiteliales hipertrofiadas, reducción marcada de los niveles de lípidos, severa infiltración hemocítica intertubular en respuesta a la necrosis y a la citólisis, presencia de túbulos necróticos, melanizados rodeados de una fuerte reacción inflamatoria, formación de nódulos hemolíticos con agregados bacterianos en su centro además de la edematización del tejido.

A nivel celular, el epitelio columnar de los túbulos presentó hipertrofia convirtiéndose en un epitelio cuboidal, núcleos picnóticos, cariólisis y en ocasiones desprendimiento de las células epiteliales o necrosis total del mismo. Los túbulos atrofiados con células con pocas vacuolas de lípidos (células R) y vacuolas secretoras (células B).

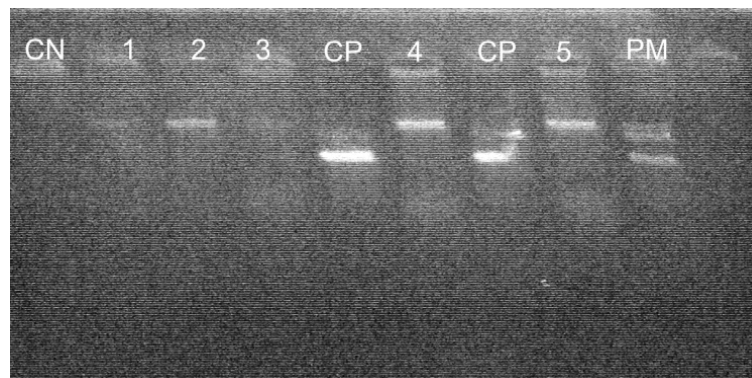
En el análisis por PCR durante igual período, los resultados fueron negativos. En la figura 3 se muestra la

visualización en transiluminador de una corrida en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio para verificar la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos para NHP-B. Como se observa, en las columnas 1; 2; 3; 4 y 5 solamente aparece el control interno de 848 pb, lo que indica un resultado negativo.

Las columnas con la abreviatura CP contienen producto amplificado correspondiente al control positivo del kit IQ 2000 con banda de 325 pb, mientras que en la identificada como CN se utilizó agua en vez de ADN. La columna identificada como PM, es el marcador de peso molecular con bandas de 848 pb, 630 pb y 333 pb.



**Fig. 2. Lesiones histopatológicas de hepatopancreatitis necrotizante (NHP) en *Litopenaeus vannamei*.**  
H & H a) Degeneración y atrofia de los túbulos; b) hipertrofia, infiltración intertubular de hemocitos y fibroblastos; c) atrofia severa de los túbulos y desprendimiento celular; d) necrosis multifocal y melanización; e) desprendimiento celular severo, necrosis y formación multifocal de cápsulas envolviendo uno o más túbulos; f) encapsulamiento, material necrótico conteniendo agregados bacterianos en el centro.



**Fig. 3. Visualización en transiluminador del gel de agarosa al 2 % con cebadores específicos para NHPB. CP: control positivo del kit IQ 2000. CN: control negativo, PM: marcador de peso molecular. Columnas 1; 2; 3; 4 y 5: muestras negativas.**

## DISCUSIÓN

En los sistemas de cultivo utilizados en las granjas de producción, se crea un ambiente artificial que propicia el crecimiento de patógenos, entre ellos bacterias causantes de patologías que afectan significativamente la producción por causar mortalidad cuando no son detectadas oportunamente mediante diferentes medios diagnósticos.

Entre las patologías descritas para el camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* se encuentra la hepatopancreatitis necrotizante que puede estar causada por bacterias extracelulares (*Vibrios*), cepas patogénicas de las especies *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. campbelli* productoras de la necrosis séptica del hepatopáncreas (NHP-S) y por bacterias intracelulares (tipo rickettsias) que provocan la necrosis bacteriana del hepatopáncreas (NHP-B) (Morales, 2010), procesos con diferencias histopatológicas y en sus implicaciones sanitarias, que en muchos casos tiende a confusión y que, cuando se observan organismos con hepatopáncreas atrofiado, túbulos deformes, melanizados y necróticos se piense en la patología causada por bacterias tipo rickettsias y se declare la presencia de NHP-B, induciendo la realización de un falso diagnóstico.

La presencia durante el período 2005-2010 de ambos agentes etiológicos determinó las particularidades observadas en los diagnósticos realizados durante el período y que durante los años 2009 y 2010 la evaluación histopatológica y por PCR concuerda con la situación descrita por Pantoja (2003) y Morales (2008), donde al analizar muestras de hepatopáncreas de animales enfermos mediante análisis en fresco e histopatología diagnosticaron hepatopancreatitis necrotizante con presencia de masa bacteriana intertubular y en el lumen, pero al aplicar técnicas como hibridación *in situ* o el PCR las muestras resultaron negativas a NHP-B.

Las lesiones histológicas observadas en hepatopáncreas de los casos positivos del período 2009-2010 coinciden con las reportadas por (Lightner & Pantoja, 2005; Morales, 2010) cuando describen mediante el análisis en fresco del órgano deformación y atrofia severa de los túbulos con y sin melanización, desprendimiento celular y formación de nódulos hemocíticos en el tejido conectivo intertubular, y para la fase crónica gran cantidad de túbulos necróticos, textura blanda y edematosa, y por histopatología, la infiltración de hemolinfa y hemocitos en el tejido intertubular, formación de nódulos hemocíticos con cúmulo de bacterias (Gamez *et al.*, 2007), transformación del epitelio a cuboidal, desprendimiento de células con núcleos hipertrofiados en el lumen de los túbulos, procesos de necrosis rodeados por hemocitos y fibroblastos (Morales, 2010) correspondiente a la NHP-S.

Las diferentes patologías presentadas entre los períodos 2005-2008 y 2009-2010 confirman la necesidad de utilizar diferentes métodos para el diagnóstico de la necrosis del hepatopáncreas señalado por Vincent & Lotz (2005) para diferenciar de forma confirmatoria la hepatopancreatitis necrotizante por rickettsia con presencia de cápsulas multifocales causantes de NHP-B, de la hepatopancreatitis necrotizante por bacterias infecciosas principalmente *Vibrios* formadoras de nódulos hemocíticos (Briñez *et al.*, 2003; Morales, 2010) causantes de la NHP-S.

Estudios de sensibilidad de los métodos histopatológico (Steiner-Steiner Silver), PCR y PCR en tiempo real a partir de hepatopáncreas infectados de juveniles de *Litopenaeus vannamei* realizados por Vincent & Lotz (2005), determinaron como métodos más sensibles para la detección temprana del NHP-B la histopatología y PCR en tiempo real. En sus resultados a los seis días postinfección el 33,3 % de los animales analizados resultaron positivos al diagnóstico histopatológico, mientras que los primeros resultados positivos por PCR y PCR en tiempo real se obtuvieron a los 16 días, confirmando la correspondencia en el diagnóstico de NHP-B en el camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* del empleo de las técnicas histopatológica y de PCR como métodos confirmativos, con la propuesta de realizar ambas pruebas para identificar con certeza al agente causal de la epizootia.

## REFERENCIAS

- Bell, T. A. & Lightner, D. V. (1988). Técnicas. En World Aquaculture Society Baton Rouge (Ed.), *Manual de Histología del camarón Penaeoideo normal* (pp. 2-6). Louisiana.
- 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.
- Frelier, P. F., Loy, J. K., Lawrence, A. L., Bray, W. A. & Brumbaugh, G. W. (1994). Status of necrotizing hepatopancreatitis in Texas farmed shrimp, *Penaeus vannamei*. *USMSFP 10th. Anniversary review, GCRL Special Publication*, 1, 55-58.
- Frelier, P. F., Sis, R. F., Bell, T. & Lewis, A. (1992). Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Veterinary Pathology*, 29, 269-277.
- Gámez, I. J. C., Galaviz, L. S. & Molina, Z. J. G. (2007). Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium NHP in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. *Ciencias Marinas*, 33 (1), 242-250.

- Humason, G. L. (1979). *Animal Tissue Techniques* (4<sup>a</sup> ed., pp. 23-45). San Francisco: Freeman and Company.
- Ibarra, J. C., Galavíz, L. S. & Molina, Z. J. (2007). Distribución de la bacteria causante de la necrosis hepatopancreática (NHPB) en cultivos de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en México. *Ciencias Marinas*, 33 (1), 1-9.
- IQ200™ NHPB. Instruction Manual Necrotizing Hepatopancreatitis Bacteria (NHPB). GeneReach Biotechnology Corp. Farming IntelliGene Tech. Corp. Taiwan. (pp. 2-16). <http://iq2000kit.com>
- Krol, R. M., Hawkins, W. E. & Overstreet, R. M. (1991). Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Invertebr. Pathol.*, 57, 362-370.
- Lightner, D. V. (1996). Methods. In D. V. Lightner, *A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp*. Department of Veterinary Science (pp. 34-75). University of Arizona, USA.
- Lightner, D. V. & Pantoja C. R. (2005). Manual para el diagnóstico de enfermedades del camarón. Programa de reconstrucción huracán Mitch. United States Department of Agriculture.
- Lightner, D. V., Redman, R. M. & Bonami, J. R. (1992). Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacean:Decapoda). *Disease Aquatic Organisms*, 13, 235-239.
- Loy, J. K., Frelter, P. F., Varner, F. & Templeton, J. W. (1996). Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Disease Aquatic Organisms*, 25, 117-122.
- Morales, M. S. C. (2008). Enfermedades bacterianas. En V. Morales & A. J. Cuellar (Eds.), *Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos* (pp. 126-130). Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá.
- Morales, M. S. C. (2010). Necrosis del hepatopáncreas (HHP) en camarones de cultivo causado por bacterias extracelulares e intracelulares. *Tilapia & Camarones*, pp. 33-39.
- OIE (2009). Section 2.3. Diseases of crustaceans. In Eleventh Edition, *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* (pp. 1-9). World Organization of animal Health, París.
- Pantoja, C. (2003). Hepatopancreatitis necrotizante (NHP) en camarón: Revisión de la distribución geográfica y métodos de diagnósticos. *Panorama Acuicola Magazine*, 10-17.
- Vincent, A. G. & Lotz, J. M. (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.