



INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

INFORME

ISSN 0378-7702

Volumen 38, Número 4

- Protocolo para evaluación de concha de abanico
- Protocolo para estudios sobre el proceso reproductivo de peces pelágicos y demersales
 - Sanidad en estanques de cultivo y en poblaciones silvestres de langostinos en Tumbes
- Estudios sobre el calamar gigante en primavera 2010 y verano 2011. Crucero B/P Hakurei Maru N° 8
- Experiencias en el sistema controlado para obtención de semillas de concha de abanico en Ilo, Moguequa
 - Diagnóstico y estado de la macroalga *Lessonia nigrescens* en el litoral de Arequipa



Octubre - Diciembre 2011
Callao, Perú

LA BACTERIA DE LA HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE (NHPB) EN ESTANQUES DE CULTIVO INTENSIVO DE *Penaeus vannamei* EN TUMBES

THE NECROTIZING HEPATOPANCREATITIS BACTERIUM (NHPB) IN INTENSIVE CULTURE PONDS OF *Penaeus vannamei* IN TUMBES

Rubén Alfaro Aguilera Mervin Guevara Torres
Sede IMARPE Tumbes

RESUMEN

ALFARO R, GUEVARA M. 2011. La bacteria de la hepatopancreatitis necrotizante (NHPB) en estanques de cultivo intensivo de *Penaeus vannamei* en Tumbes. *Inf Inst Mar Perú*. 38(4): 385-389.- La investigación realizada en el 2007, comprende la patobiología y sanidad acuícola en langostinos de cultivo y de los canales de marea de la Región Tumbes, para detectar presencia y distribución espacio-temporal del agente etiológico NHPB (Bacteria de la hepatopancreatitis necrotizante). Se analizaron 3360 langostinos de nueve empresas con cultivo intensivo para detectar la NHPB. Los resultados fueron: (1) prevalencia global de 2% en el periodo de estudio; (2) NHPB estuvo presente en el 77% de las zonas con cultivo intensivo incluidas en este estudio, distribuidas a lo largo del litoral tumbesino.

PALABRAS CLAVE: NHPB, *Penaeus vannamei*, prevalencia.

ABSTRACT

ALFARO R, GUEVARA M. 2011. The necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in intensive culture ponds of *Penaeus vannamei* in Tumbes. *Inf Inst Mar Perú*. 38(4): 385-389.-The research conducted in 2007, includes the pathobiology and healing cultivated shrimp aquaculture and tidal channels of the Tumbes region, to detect the presence and spatial-temporal distribution of the etiological agent NHPB (Bacteria of the NHP). We analyzed 3360 shrimp of nine companies with intensive culture to detect NHPB. The results were: (1) overall prevalence of 2% in the study period; (2) NHPB was present in 77% of the intensive farming areas included in this study, which are distributed along the coastal Tumbes.

KEYWORDS: NHPB, *Penaeus vannamei*, prevalence.

1. INTRODUCCIÓN

La necrosis del hepatopáncreas (NHP), fue reconocida por primera vez en Texas, USA en 1985, luego se reportó en Brasil, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Ecuador y Perú (JOHNSON 1989, FRELIER et al. 1992). Inicialmente, se denominó enfermedad del hepatopáncreas granulomatoso por la característica formación de granulomas. Su agente causal es una bacteria intracelular tipo *Rickettsia* que se observa como un pequeño cocobacilo Gram negativo, que infecta y se multiplica en el citoplasma de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas.

La NHP se caracteriza por flacidez muscular, producir altas tasas de mortalidad y elevado porcentaje de ejemplares para el descarte post cosecha de langostinos en cultivo intensivo. Está asociada a temperatura y salinidad elevada por período prolongado de tiempo; la enfermedad se detecta en los sistemas de cultivo cuando la temperatura varía entre 29 y 35 °C y la salinidad entre 20 a 38 ups.

La NHP es una enfermedad severa, que causa mortalidades rápidas en los langostinos si no es detectada a tiempo, puesto que ataca al hepatopáncreas (HP), importante órgano encargado de la digestión del alimento, absorción y almacenamiento de nutrientes. La fase inicial de la enfermedad no es detectable por tener signos clínicos inespecíficos. El diagnóstico presuntivo mayormente se realiza con montajes en fresco de porciones de HP, en los que se observa ausencia o cantidad reducida de gotas de lípidos, paredes engrosadas y estrangulaciones de los túbulos. Para confirmar el diagnóstico se procede al análisis de histopatología (H y E) que presenta como características típicas atrofia y lesiones granulomatosas multifocales en el HP (LIGHTNER 1996). Así mismo, la NHP es confirmada histológicamente por hibridación in situ con una sonda complementaria de ADN probe o por microscopía electrónica (TEM).

Loy et al. (1996b), detectaron el agente etiológico en cultivos de *Penaeus vannamei* mediante el método de reacción en cadena de la polime-

rasa (PCR). Amplificaron por PCR un segmento definido del gen 16S rRNA ribosomal usando primers específicos para las regiones variables (V5, V8 y V9), pf-1 5' ACG TTG GAG GTT CGT CCT TCA G 3', pr-1 5' TCA CCC CCT TGC TTC TCA TTG T 3', pr-2 5' CCA GTC ATC ACC TTT TCT GTG GTC 3', usando como molde ADN extraído de tejido de camarones conseguidos de dos regiones diferentes (Norte y Sur América), obteniendo segmentos de 660 y 441 bp específicos de bacteria NHP de 16S rDNA. BRIÑEZ et al. (2003) reportaron la presencia de NHP en *P. vannamei* por PCR utilizando DNA purificado de muestras fecales infectadas como molde. Los primeros usados fueron específicos para la región 16S del gen rRNA (pf-1 1:5' ACG TTG GAG GTT CGT CCT TCA-G 3'/ pr- 2:5' TCA CCC CCT TGC TTC TCA TTG T 3'), obteniendo como resultados segmentos positivos de 440 bp.

IMARPE Tumbes, programó para el 2007 efectuar la evaluación sanitaria para establecer la prevalencia y distribución de la NHPB, que impacta

al cultivo del langostino. A partir de febrero del mismo año, el Laboratorio de Sanidad Acuícola realizó muestreos quincenales en las empresas langostineras con cultivo intensivo; las muestras fueron procesadas mediante la técnica de la PCR y el método utilizado por Loy et al. (1996c), a fin de realizar el descarte de la presencia de la NHPB.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Langostinos.- Se analizó un total de 3360 muestras en cultivos intensivos de nueve empresas langostineras (densidades de 80 a 150 individuos/m²) y con invernaderos: Camarones S.A.C., La Bocana S.A., Pacífico Azul S.A.C., La Fragata S.A., Criador El Guamito S.A., Campo Lan Karina de INYSA, Marinazul S.A., Isla Bella S.A.C y Domingo Rodas S.A. Se seleccionó un estanque por empresa y las muestras fueron tomadas al azar realizando cinco lances de atarraya por estanque para obtener una submuestra de 25 langostinos, que se colocaron en bolsas de plástico rotuladas (empresa, número de estanque, temperatura del agua) y se transportaron en hielo al laboratorio.

En el laboratorio, se tomaron datos individuales de los langostinos como peso, talla y alguna característica adicional externa de interés (flacidez, deformación o necrosis cuticular). Los HP fueron pesados, inmersos en etanol al 90% y conservados a -20 °C.

2.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

2.2.1. Extracción del ADN

Se siguió la metodología según GUSTINCICH et al. (1991). De los hepatopáncreas conservados se tomó 20 mg, se maceró en presencia de 100 µL de EDTA, 500 mM (pH 8) y 600 µL de solución DTAB [12% dodeciltrimetilamonio bromuro, 2,25 M NaCl, 150 mM Tris-HCl (pH 8.6), 75 mM EDTA], luego se incubó por 5 min a 75 °C. Después de la incubación se agregó 0,7 mL de cloroformo, se mezcló con vortex y centrifugó a 12000 rpm por 5 min. El sobrenadante (250 µL) fue transferido a otro tubo y adicionando 100 µL de solución CTAB (5% cetiltrimetilamonio bromuro, 0,4 M NaCl) y 900 µL de agua destilada autoclavada, se mezcló y centrifugó a 12000 rpm por 10 min; el sobrenadante fue descartado

y el pellet resuspendido en 150 µL de solución disolvente (NaCl 1,2 M), se incubó a 75 °C por 5 min y centrifugó a 12000 rpm por 5 min. La solución fue transferida a un nuevo microtubo con 300 µL de etanol al 95%, se mezcló y fue centrifugado nuevamente a 12000 rpm por 5 min, el pellet fue lavado con etanol al 75% y resuspendido con buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8).

2.2.2. Análisis de PCR

Las muestras fueron analizadas mediante la técnica de PCR, el volumen final para cada reacción fue de 20 µL, conteniendo 2 µL de ADN, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 125 µM dNTPs y 5 pmol de cada primer, pf-1: 5'-ACG-TTG-GAG-GTT-CGT-CCT-TCA-G-3' y pr-2: 5'-TCA-CCC-CCT-TGC-TTC-TCA-TTG-T-3' (Loy y FRELIER 1996a). Las muestras fueron sometidas a 35 ciclos: desnaturalización a 95 °C por 30 seg, hibridación a 58 °C por 30 seg, extensión a 72 °C por 1 min, con un ciclo adicional de 72 °C por 5 min de reparación de la hebra del ADN; para evitar los falsos negativos, las muestras que resultaron negativas fueron procesadas por segunda vez incluyendo en el análisis la β-actina como control interno. Las muestras fueron sometidas a 35 ciclos que consistieron en desnaturalización a 95 °C por 20 seg, hibridación a 52 °C por 30 seg, extensión a 72 °C por 30 seg, con un ciclo adicional de 72 °C por 4 min.

Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% conteniendo 0,5 µg/mL de bromuro de etidio y en amortiguador TAE al 1X. Obteniéndose una banda positiva de 400 pb y una banda de 424 pb para el control interno.

2.2.3. Análisis de los datos

Prevalencia.- La prevalencia (P) cuantifica la proporción de individuos de una población que padecen de una enfermedad, en un momento o periodo determinado; su cálculo se realiza mediante la expresión:

$$p = \frac{\text{Nº de casos con la enfermedad en un momento dado}}{\text{Total de la población en ese momento}}$$

Tamaño de muestra.- Para fijar el tamaño de muestra necesario, y estimar la cantidad de enfermos en los estanques de cultivo, se usó la fórmula correspondiente a la estima-

ción de una proporción (prevalencia) para un nivel de confianza del 95%

$$n = 3,8416 \cdot \frac{P \cdot (1 - P)}{E^2}$$

Dónde:

n: tamaño de muestra necesario

P: prevalencia esperada

E: error absoluto aceptado

Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS; la prevalencia se determinó usando el programa Win Episcopo 2.0, donde se determinó que para una prevalencia esperada del 2% es necesario 150 ejemplares como valor mínimo, teniendo en cuenta que la población es mayor a 100.000 individuos.

Para propósito de este monitoreo se asumió que si la NHPB está presente en los estanques con cultivo intensivo, al menos se encontrará que el 2% de los animales susceptibles son positivos a la bacteria, con un 95% de confianza.

3. RESULTADOS

3.1. Prevalencia

Se realizaron 132 visitas a nueve empresas langostineras, de las cuales se obtuvo un total de 3360 ejemplares de langostino *Penaeus vannamei* tomados al azar (postlarvas, juveniles y preadultos). La prevalencia global a la NHPB para el periodo en estudio fue de 2,05%. Las langostineras con mayor prevalencia fueron: Domingo Rodas S.A., que proporcionó 238 ejemplares para analizar, de los cuales 29 resultaron positivos por PCR para la NHPB con una prevalencia de 12,18%; y Langostinera Camarones SAC con el 5,88% (Tabla 1).

En la Tabla 2, se presenta el número de muestras colectadas por langostinera y la prevalencia a la NHPB encontrada en cada ciclo de cultivo. Las empresas Fragata y Marinazul se mostraron libres de la NHPB a lo largo del estudio; pero no participaron en todos los monitoreos por problemas técnicos. Además, la empresa Isla Bella se incluyó al final. Por estas razones, no es posible afirmar que los estanques de dichas empresas se encontraran libres o con bajas prevalencia a la NHPB.

La empresa Pacífico Azul, no pudo controlar la mortalidad en la primera campaña, atribuidas en parte a la flacidez y a los elevados valores de

Tabla 1.- Prevalencia global a la NHPB encontrada en diferentes langostineras. Febrero-diciembre 2007.

Langostinera	Positivos a NHPB	Ejemplares analizados	Prevalencia (%)
Domingo Rodas	29	238	12,18
Camarones	28	476	5,88
Pacífico Azul	4	349	1,15
Lan Karina	3	376	0,80
La Bocana	3	539	0,56
Isla Bella	1	177	0,56
Criador el Guamito	1	538	0,19
La Fragata	0	454	0,00
Marinazul	0	213	0,00
Total	69	3360	2,05

Tabla 2.- Prevalencia a la NHPB en diferentes langostineras con cultivo intensivo por campaña de cultivo. (SD= sin dato)

Empresa	Campaña	Densidad de siembra (indiv/m ²)	Positivos	Nº de Muestra	Prevalencia (%)
Criador El Guamito	Primera	100	0	191	0,00
	Segunda	100	1	163	0,61
	Tercera	120	0	184	0,00
La Fragata	Primera	SD	SD	SD	SD
	Segunda	120	0	221	0,00
	Tercera	120	0	233	0,00
Pacífico Azul	Primera	80	4	225	1,78
	Segunda	SD	SD	SD	SD
	Tercera	150	0	124	0,00
Domingo Rodas	Primera	SD	5	121	4,13
	Segunda	SD	5	54	9,26
	Tercera	SD	19	63	30,16
La Bocana	Primera	80	0	199	0,00
	Segunda	80	0	156	0,00
	Tercera	80	3	184	1,63
Camarones	Primera	100	28	150	18,67
	Segunda	100	0	188	0,00
	Tercera	100	0	138	0,00
Lan Karina	Primera	90	1	148	0,68
	Segunda	90	2	153	1,31
	Tercera	150	0	75	0,00
Marinazul	Primera	SD	SD	SD	SD
	Segunda	SD	SD	SD	SD
	Tercera	80	0	213	0,00
Isla Bella	Primera	SD	SD	SD	SD
	Segunda	SD	SD	SD	SD
	Tercera	200	1	177	0,56
Año 2007			69	3360	2,05

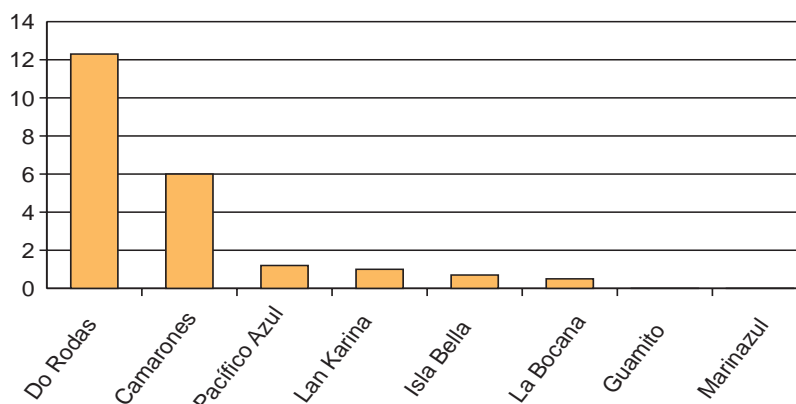


Figura 1.- Prevalencia a la NHPB de las diferentes langostineras monitoreadas durante el periodo febrero a diciembre 2007.

nitritos en el agua de los estanques y debió cosechar de emergencia. En el periodo de estudio se encontró 1,78% de prevalencia de la NHPB que tuvo un aparente incremento en los siguientes días. La gerencia decidió postergar las siembras por una temporada, por lo que no se contó con datos de la segunda campaña.

Independiente de la fecha o estación del año, la bacteria causante de la NHP estuvo presente en los cultivos. Esto fue más notorio en la langostinera Domingo Rodas en la que estuvo presente en todas las campañas de cultivo (Tabla 2).

3.2. Distribución

La bacteria causante de la NHP está distribuida a lo largo del litoral Tumbesino (Tabla 1, Fig. 1). La mayor prevalencia se encontró en la empresa langostinera Domingo Rodas (12,18%) situada en el distrito Corrales a la margen izquierda del río Tumbes, seguida de la empresa Camarones (5,88%) del sector Alcalde, distrito de Tumbes; estas zonas pueden considerarse de mayor riesgo debido a la mayor presencia de langostineras informales que no llevan controles sanitarios (larva no certificada, manejo inadecuado del agua). La menor prevalencia se registró en el distrito de Zarumilla, carretera a Puerto Pizarro, en las langostineras El Guamito (0,19%) e Isla Bella (0,56); en el sector El Bendito, carretera Al Salto en la empresa Pacífico Azul (1,15%), y en el sector Chacra Gonzáles en la empresa Lan Karina (0,8%) (Fig. 2). Las menores prevalencias pueden atribuirse al mejor control sanitario en el ciclo de cultivo que aplican estas empresas (desinfección de materiales, pediluvios, administración de personal, larva certificada libre de NHPB).

4. DISCUSIÓN

Una prevalencia global del 2,05% indica que la enfermedad no está afectando de forma relevante a la población estudiada; sin embargo, es importante resaltar que esta prevalencia no corresponde a todas las langostineras, ni a todas las campañas de cultivo.

Los valores de prevalencia de 30,16% en la tercera campaña de la langostinera Domingo Rodas y de 18,67% en la primera campaña de la empresa Camarones (Tabla 1), estuvieron directamente relacionados con las ele-

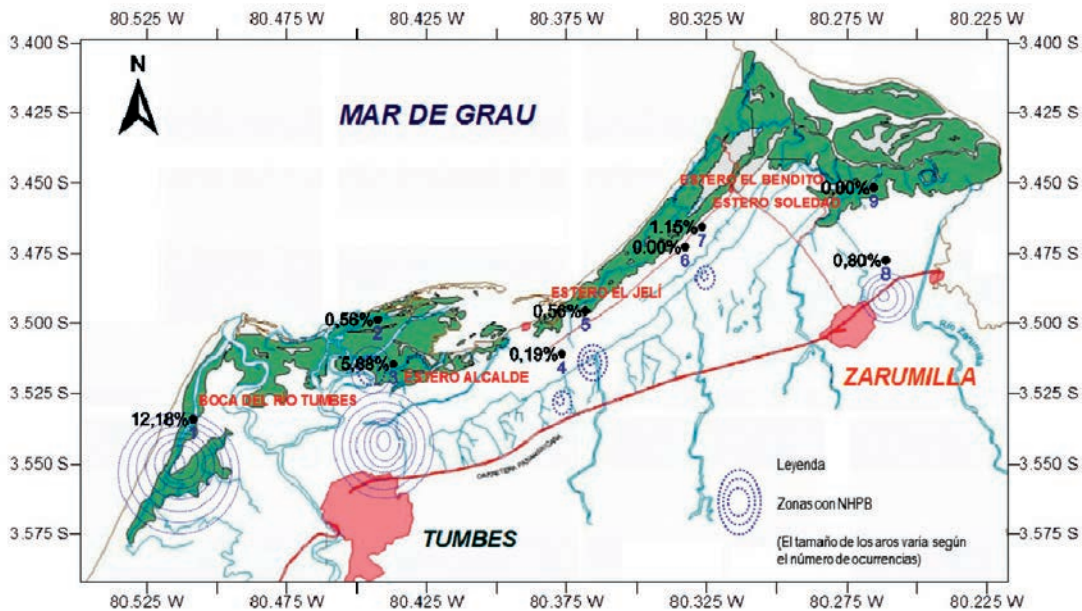


Figura 2.- Distribución de la presencia de la NHPB en las zonas de cultivo, de febrero a diciembre 2007. Langostineras con cultivo intensivo y prevalencia respectiva: 1. Domingo Rodas, 2. La Bocana, 3. Camarones, 4. Criador El Guamito, 5. Isla Bella, 6. La Fragata, 7. Pacífico Azul, 8. Lan Karina y 9. Marinazul.

vadas mortalidades diarias (de 3000 a 10000 langostinos) (com. per. Jefes de Producción), que los llevó a cosechar de emergencia los estanques afectados, registrando para el caso de camarones un 15% de flacidez en el producto final posiblemente debido a la NHPB. Las empresas Domingo Rodas, Lan Karina, Criador El Guamito e Isla Bella reportaron elevadas mortalidades de forma intermitente que finalmente se detuvieron, pero que su efecto negativo se reflejó en las supervivencia al final del cultivo o en la eficiencia del producto en planta, lo que llevó a sospechar que la sola presencia del patógeno en el sistema ya representa un riesgo para el cultivo.

En las muestras colectadas de la mayoría de los estanques monitoreados, se encontraron langostinos con flacidez que resultaron negativos a la NHPB; así mismo se encontraron langostinos aparentemente sanos que resultaron positivos, esto estaría relacionado al momento de la toma de muestra, es decir, si los animales fueron muestreados justo al inicio de un brote, será fácil detectar al patógeno aunque los langostinos escasamente muestren síntomas o lesiones. Sin embargo, si el muestreo se realiza al finalizar el brote, será difícil detectar al patógeno aun observando animales lesionados entre los supervivientes, ya que se supone que sobreviven porque eliminan el patógeno, pero los que mueren sin

eliminar al patógeno desaparecen de la población y no son muestreados, a lo que se conoce como sesgo de la supervivencia. Quizás esto explique los valores negativos en langostinos con lesiones características de NHP (flacidez, hepatopáncreas degenerado, pleópodos melanizados, etc.).

Cabe mencionar que la siembra en estanques con cultivo intensivo se realiza con postlarvas provenientes de laboratorios que certifican el estado sanitario de las mismas. Por este motivo se presume que las infecciones con NHPB se realizan en el transcurso del cultivo (presencia de vectores), asociado con factores ambientales y fisiológicos (temperatura, salinidad, estrés por elevada densidad de siembra, etc.), los que juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Esta patología al igual que muchas otras, puede pasar desapercibida los primeros días de cultivo (prevalencia no detectable) y aparecer repentinamente (por algún detonante). Por ello es importante que el monitoreo de los organismos bajo estudio sea llevado desde el inicio de la siembra, lo que ayudaría a un mejor conocimiento del desenvolvimiento de los patógenos, en este caso del NHP, en los langostinos durante el desarrollo del cultivo.

Los datos de temperatura y salinidad, por lo general, son difíciles de incluir en este tipo de estudios por

ser muy variables en el tiempo y sus efectos se manifiestan posteriormente, siendo necesario la toma de información diaria. Es posible sospechar que el brote de la enfermedad relacionada con estos factores, pueda deberse a una tercera variable en juego, como es el sistema de manejo de cada empresa (densidades de siembra de 90 a 120 indiv/m², calidad de agua, nutrición, etc.) como posible desencadenante de las mortalidades reportadas.

5. CONCLUSIONES

- Se registró 2,05% de prevalencia global de la NHPB en el periodo de estudio (febrero-diciembre 2007), lo que indicaría que la enfermedad no está afectando de forma relevante a los langostinos. Sin embargo, se registraron elevadas mortalidades, lo que llevaría a deducir que la sola presencia del patógeno en el sistema representaría un riesgo para el cultivo, si los parámetros ambientales (temperatura, salinidad, nitritos, etc.) no permanecen estables.
- La mayor prevalencia a la NHPB se encontró en la langostinera Domingo Rodas (1: 30,16%) en la tercera campaña de cultivo, y ha estado presente en el transcurso de todo el cultivo.
- En las langostineras Fragata (6) y Marinazul (9), no se detectó la presencia de la NHPB.

- La NHPB se encuentra distribuida en el 77% de las zonas con cultivo intensivo, a lo largo del litoral tumbesino, lo que estaría relacionado directamente con los niveles de bioseguridad que aplica cada empresa en su cultivo.
- No todos los langostinos con aparente flacidez, anorexia y degeneración de hepatopáncreas son positivos a la NHPB. Es necesario descartar otras patologías haciendo uso de procedimientos histológicos, que son los más confiables actualmente.

6. RECOMENDACIONES

Este estudio permitió obtener información de la dinámica espacial y temporal de la NHPB en las estanques de cultivo, por lo tanto es necesario complementarlo con el descarte de otras enfermedades de diferente índole (WSV, IHNV, vibriosis, toxinas, nutricionales).

Se debe incluir en el estudio un seguimiento diario de las variaciones de los parámetros ambientales para

poder relacionarlos con el brote y evolución de las enfermedades.

7. REFERENCIAS

- BRIÑEZ B, ARANGUREN L, SALAZAR M. 2003. Faecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Diseases of Aquatic Organism*. Vol. 55 (1): pp. 69-72.
- FRELIER P, SIS R F, BELL T, LEWIS D. 1992. Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Veterinary Pathology*. Vol. 29 (4): pp. 269-277.
- GUSTINCICH S, MANFIOLETTI G, DEL SAL G, SCHNEIDER C, CARNINCI P. 1991. A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*. Vol. 11 (3): pp. 298-302.
- JOHNSON S K. 1989. Digestive gland manifestation. p 16 in S K Johnson (ed), *Handbook of shrimp diseases*. Sea Grant College Program, Texas A&M University, Galveston, Tex.
- Disponible en web: <http://nsgl.gso.uri.edu/tamu/tamuh95001.pdf>
- LIGHTNER D. 1996. *A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, EE.UU. Ringbound Edition.
- LOY J, FRELIER P. 1996a. Specific, nonradioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by in situ hybridization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Vol 8 (3): pp. 324-331.
- LOY J, FRELIER P, VARNER P, TEMPLETON J. 1996b. Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*. Vol 25: pp. 117-122.
- LOY J, DEWHIRST F, WEBER W, FRELIER P, TEMPLETON J. 1996c. Molecular phylogeny and in situ detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62 (9): pp. 3439-3445.