PL-AHPND:
Mortalidad elevada y repentina de las postlarvas de *Penaeus vannamei* en laboratorios de larvicultura en Latinoamérica



Desde 2015, diferentes laboratorios de larvicultura de camarón en América Latina han informado de brotes de mortalidades elevadas y repentinas de *Penaeus vannamei* durante las fases postlarvarias iniciales. En tal sentido, el análisis de muestras históricas de *P. vannamei* infectadas y sanas de laboratorios de larvicultura comerciales de camarón que reportaron tal situación, que provisionalmente se denomina enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda postlarvaria (PL-AHPND), es un paso importante para el fortalecimiento de la industria acuícola.

Por: Pablo Intriago, Andres Medina, Jorge Espinoza, Xavier Enriquez, Kelly Arteaga, Luis Fernando Aranguren, Andrew P. Shinn, Xavier Romero

Introducción

La rápida expansión de la cría de camarones ha provocado una mayor vulnerabilidad a las infecciones causadas por especies de *Vibrio*, dando lugar a diversos síndromes y enfermedades que afectan la salud de los camarones, en particular, al hepatopáncreas. Entre ellos se encuentran el "síndrome de las bolitas", la necrosis hepatopancreática séptica (SHPN, por sus siglas en inglés), la enfermedad de las postlarvas translúcidas (TPD) y la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND). La AHPND, también conocida como síndrome de mortalidad temprana (EMS), causa importantes pérdidas económicas en la producción de camarones. Los plásmidos pVA-1, portadores de las toxinas PirA y PirB, se han identificado como los principales factores de virulencia de la AHPND.

Las muertes súbitas en laboratorios de larvicultura de camarones en América Latina, dieron origen al estudio de muestras de camarones sanos y enfermos. En un lapso de 2 horas, normalmente a partir de postlava 1 (PL1), las toxinas PirA y PirB transforman las larvas activas en moribundas. Tales mortalidades rápidas e intensas se han observado en muchos laboratorios de producción de larvas. Provisionalmente, esta enfermedad se denomina AHPND postlarvaria (PL-AHPND), para diferenciarla de otras patologías que afectan a las PL de camarón.

Para investigarlo, se tomaron muestras de camarones enfermos y moribundos durante seis años (2015-2021), así como de organismos sanos, procedentes de laboratorios de larvicultura comerciales de camarones que habían notificado tasas repentinas y elevadas de mortalidad. Todas las muestras se analizaron mediante una combinación de histopatología, PCR y microbiología, para determinar el origen de estas mortalidades.

Metodología

Entre agosto de 2015 y mayo de 2021, se tomaron muestras de *P. vannamei* en seis laboratorios de larvicultura de camarones de América Latina. Se recolectaron aproximadamente 4 gramos de PL de los estadios PL1

La detección por PCR de la toxina binaria PirAB no debe ser la única herramienta de diagnóstico para AHPND, ya que puede haber variaciones en la histopatología y la virulencia entre las cepas.

a PL5, de tanques afectados que presentaban organismos blancos, ausencia de contenido intestinal y mortalidad. Los tanques no afectados sirvieron de control. Con fines de comparación, se tomaron otras muestras provenientes de laboratorios de larvicultura de camarones cercanos.

La mitad de las muestras de PL (750+) se fijaron en solución AFA de Davidson y se procesaron para histología rutinaria. Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), y se calculó el porcentaje de larvas con cambios histopatológicos.

Se extrajo ADN de una muestra representativa de larvas y de cepas bacterianas seleccionadas de cada muestra viva de camarón y se analizó para detectar la presencia de genes de la toxina PirAB mediante el método de PCR anidado AP4 de Dantip et al. (2015). La detección de otros genes, incluyendo los genes resistentes a los antibióticos, se llevó a cabo por PCR convencional, con presuntas cepas de *Vibrio* que se analizaron para detectar la presencia de tox(R), y los genes tet (A-E, G) utilizando marcadores específicos de genes (Aguilera-Rivera et al., 2019).

Para la bacteriología, se determinó la concentración de bacterias en las larvas mediante el baño de las muestras en una solución de cloro y enjuagándolas con agua de mar estéril. Luego, se maceraron las larvas, diluyeron y depositaron en medios de agar selectivos. Se contaron las unidades formadoras de colonias (CFU, por sus siglas en inglés) y se identificaron las cepas bacterianas con un kit API 20E.

Resultados

Las PL de los tanques de control mostraron una histología típica del hepatopáncreas, una estructura tisular intacta y una membrana peritrófica clara alrededor de la materia fecal (Figura 1a). Por el contrario, las PL de los tanques afectados presentaban lesiones de AHPND, con una prevalencia que oscilaba entre el 8 y el 97%. Se observaron dos fases histopatológicas, con infiltración hemocítica de leve a moderada en las células tubulares del hepatopáncreas, con la presencia de unas pocas células desprendidas en el lumen del hepatopáncreas con una tasa de infiltración que osciló entre el 5 y 20% (Figura 1b) en la primera fase, y desprendimiento severo de las células tubulares en la fase aguda (Figuras 1c-f). En algunos casos, la evolución de la necrosis y la descamación celular en los túbulos del hepatopáncreas fue tan rápida que las únicas observaciones histopatológicas fueron la presencia de células descamadas en el lumen tubular y muy poca evidencia de hemocitos infiltrantes en las zonas afectadas (Figuras 1d, f). En esta fase, se observó la ausencia de una membrana peritrófica y la presencia de células desprendidas en el intestino (Figura 1c). No se presentó melanosis en las PL, lo que confirma el rápido inicio de la infección por AHPND. Se observaron masas bacterianas en el lumen de algunos túbulos afectados del hepatopáncreas, pero no en todos (Figura 1f).

Las pruebas moleculares de PCR permitieron caracterizar cada cepa bacteriana en función de la presencia o ausencia de la toxina binaria PirAB, el gen tox(R) y los genes resistentes a la tetraciclina. Las pruebas bioquímicas API 20E revelaron

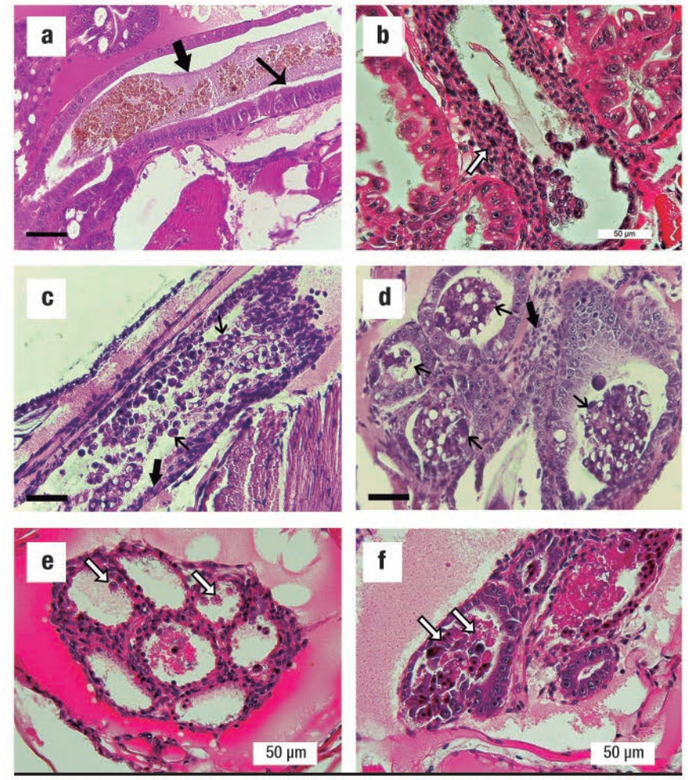


Figura 1. a. Histología de larvas normales de *Penaeus vannamei* de un tanque no afectado donde el hepatopáncreas está estructuralmente intacto y la membrana peritrófica está completa con alimento digerido en su interior. La imagen muestra un primer plano del intestino en el que se aprecia la membrana peritrófica intacta (flecha). Obsérvense las células columnares normales del intestino (flecha fina).
b. Infiltración de hemocitos (flecha) en la zona que rodea los túbulos hepatopancreáticos con inicio de desprendimiento de células epiteliales hepatopancreáticas hacia el lumen.
c. Intestino con un alto nivel de células desprendidas y restos de tejido (flechas finas), las células epiteliales intestinales también están afectadas (flecha).
d. Hepatopáncreas con desprendimiento celular severo en el epitelio de los túbulos hepatopancreáticos (flecha). Infiltración de hemocitos en la zona (flecha gruesa).
e. Desprendimiento celular moderado (flecha) con presencia de infiltración hemocítica alrededor de los túbulos hepatopancreáticos afectados.
f. Desprendimiento severo de células epiteliales hacia el lumen (flecha). Todas las secciones están teñidas con H&E. Barras de escala: a, c-d = 40 µm; b, e-f = 50 µm.

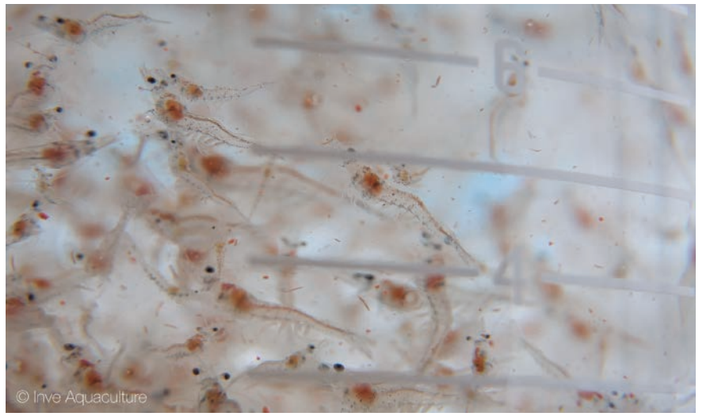
que las cepas aisladas variaban, con diferencias en la actividad de la beta-galactosidasa, el uso del citrato, la fermentación de la melibiosa y la luminiscencia. Las cepas procedentes de laboratorios de larvicultura y granjas mostraron ligeras diferencias.

Las concentraciones bacterianas por gramo de PL no difirieron significativamente entre las larvas sanas y las afectadas por AHPND. La única diferencia significativa entre las larvas sanas y las enfermas fue el mayor porcentaje de la población de *Vibrio* que se encontró en las larvas enfermas cuando se cultivaron en agar tiosulfato-citrato-bilo-sacarosa (TCBS) o en CHROMagar. No se encontró ninguna relación en el color de las colonias entre las cepas aisladas y los medios de cultivo.

Discusión

Las bacterias *Vibrio* están muy extendidas en los medios acuáticos y pueden encontrarse en altas concentraciones en los organismos marinos. Las larvas de camarón se alimentan por filtración, lo que las expone a una amplia gama de microorganismos, incluidas las especies de *Vibrio*.

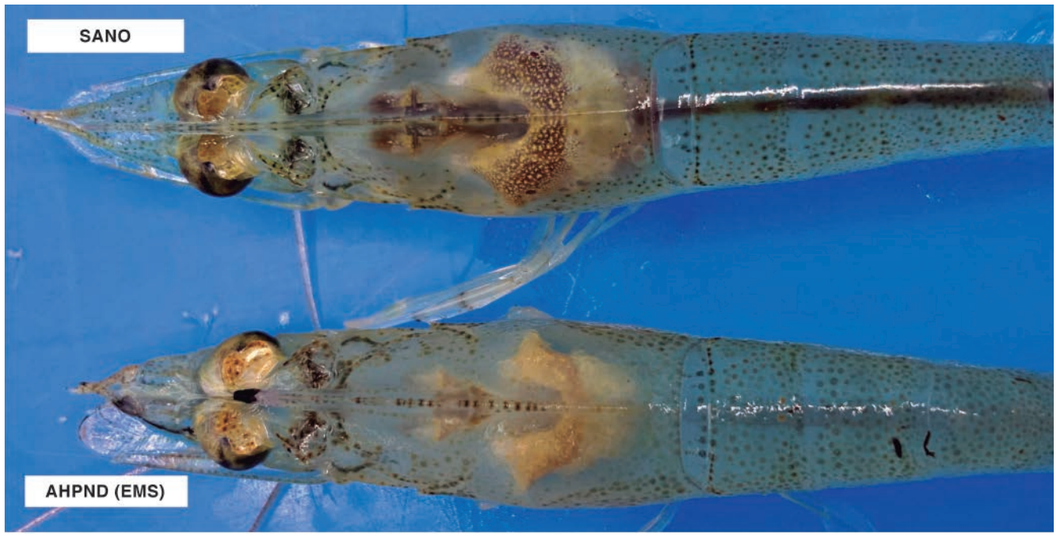
La histopatología de la PL-AHPND difiere de la observada en camarones de mayor tamaño afectados por AHPND. En PL-AHPND, hay dos etapas: una fase temprana con infiltración de hemocitos y descamación celular, y una fase aguda-terminal caracterizada por descamación multifocal y la presencia de hemocitos alrededor de los túbulos del hepatopáncreas. La ausencia de una membrana peritrófica intacta y la presencia de células descamadas en el intestino son características histopatológicas comunes. La progresión y clasificación de la histopatología de la PL-AHPND difiere de la de otros episodios similares, ya que depende de factores como la dinámica de la toxina, las interacciones bacterianas y la variedad de toxinas producidas.



Las larvas de camarón, como filtros activos de alimentos, son capaces de ingerir bacterias que pueden liberar toxinas en su estómago. El microfiltro del estómago, que filtra partículas de hasta 1 micra, es ineficaz en las fases larvarias, permitiendo que partículas de entre 10 y 15 micras lo eviten. Esto expone a las larvas a diversos microorganismos, incluidas las bacterias *Vibrio* spp que pueden entrar en contacto directo con el epitelio hepatopancreático. A diferencia de muchos estudios, las toxinas presentes en los medios de cultivo se eliminaron lavando las células, con lo que se eliminó la posibilidad de que otros metabolitos y toxinas, distintos de los producidos por PirAB^{VP}, pudieran aumentar la mortalidad.

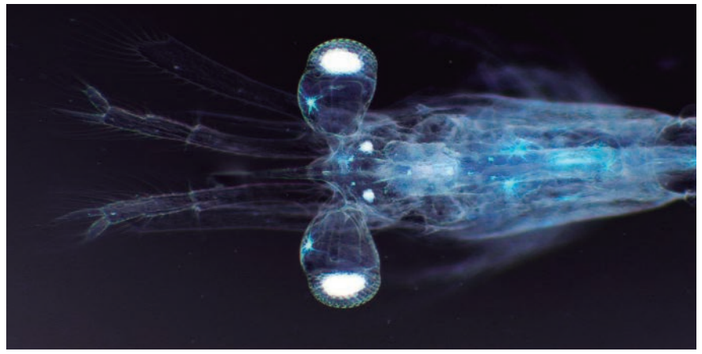
Los laboratorios de larvicultura que informaron la presencia de PL-AHPND, describieron mortalidades masivas y repentinas que, en varias ocasiones, se observaron en pocas horas. El pequeño tamaño del hepatopáncreas larvario es un factor clave relacionado con la rapidez de la mortalidad.

Una de las principales observaciones histopatológicas en las larvas afectadas por PL-AHPND, es la ausencia de una membrana peritrófica intacta y la presencia de células desprendidas en el intestino (Figura 1c). Esta histopatología es compartida con el síndrome zoea-2 descrito en laboratorios de larvicultura de la India (Kumar et al., 2017). En contraste, con el "síndrome de las bolitas", se informa que la membrana peritrófica del estadio zoea III parece intacta, mientras que en el hepatopáncreas se forman nódulos de tejido necrótico (Robertson et al., 1998).



Otra característica histopatológica interesante de PL-AHPND es que, ocasionalmente, se observa una infiltración de hemocitos cuando comienza la descamación celular (Figura 1b), mientras que en los túbulos donde la descamación ha dado lugar a una pérdida completa de células, ocasionalmente se observa una capa de hemocitos que rodea los túbulos (Figura 1e). Dado el pequeño tamaño del hepatopáncreas larvario, todo el tejido comienza a desprenderse de los túbulos (Figuras 1b, d, e) y no es posible establecer la progresión de la patología desde la región proximal hacia la zona distal de los túbulos, esta es una diferencia clave en la histopatología de PL-AHPND de la descrita en organismos de mayor tamaño con AHPND (Tran et al., 2013).

Por lo tanto, la detección por PCR de la toxina binaria PirAB no debe ser la única herramienta de diagnóstico para AHPND, porque puede haber variaciones en la histopatología y la virulencia entre las cepas.



En conclusión, el estudio confirma que se aislaron cepas de *Vibrio* de las muestras que causaron mortalidad en las larvas de camarón, y se detectó AHPND mediante PCR. La histopatología de las larvas afectadas por PL-AHPND mostró necrosis aguda del hepatopancreas. Con base en estos hallazgos, existe suficiente evidencia para apoyar una fuerte asociación o causalidad entre las cepas aisladas de *Vibrio* y la PL-AHPND. PAM

Este artículo es patrocinado por INVE AQUACULTURE

Las referencias y fuentes consultadas por el autor en la elaboración de este artículo están disponibles bajo petición previa a nuestra redacción.

Pablo Intriago
South Florida Farming Corp., Florida, EE.UU.;
pintriago@southfloridafarming.com

Andrew Shinn
INVE Aquaculture, Thailand,
a.shinn@inveaquaculture.com



SOLUCIONES PARA LA SALUD
Y MEDIO AMBIENTE DE SU
LABORATORIO O GRANJA

Sanocare® FIT
Acondicionador herbal para laboratorios de camarón

Sanolife® MIC
Mezcla microbiana para control de enfermedades y mejorar la calidad del agua en los laboratorios de larvas de camarón

Sanolife® PRO-W
Mezcla probiótica de alto desempeño para estanques saludables

Sanolife® PRO-2
Probiótico mejorado para el cultivo de un camarón saludable

INVE AQUACULTURE
A Benchmark Company
CARE FOR GROWTH

Visite nuestro website
www.inveaquaculture.com
o contáctenos aquí
customer.support@inveaquaculture.com