

Avances en patología de camarón

Carlos R. Pantoja, Donald V. Lightner, Rita M. Redman, Bonnie T. Poulos, Linda M. Nunan, Kathy F.J. Tang, Solangel Navarro, Leone M. Money, Brenda L. Noble y Paul J. Schofield



The University of Arizona
Aquaculture Pathology Laboratory
Tucson, Arizona



Introducción

- Problema más común en monocultivos industriales: enfermedades.
- La intensidad de la actividad y la cercanía de las unidades de producción favorecen la dispersión de agentes patógenos.
- El camarón no es excepción. Susceptible a enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos, protozoarios y metazoarios.
- Las enfermedades más severas son causadas por virus y bacterias.

Organización mundial de sanidad animal (OIE)

- Objetivo: Prevenir la dispersión de enfermedades de origen animal para proteger el comercio internacional
- Revisión más reciente de la lista de enfermedades de crustáceos: Julio del 2007

- ✓ WSSV ✓ BP ✓ Mourilyan virus
- ✓ IHNV ✓ MBV ✓ *Aphanomyces astaci*
- ✓ TSV ✓ NHP* ✓ MrNV
- ✓ YHV ✓ IMNV ✓ HPV*



www.oie.int

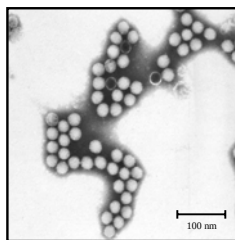


Aquaculture Pathology Laboratory
The University of Arizona
Tucson, Arizona

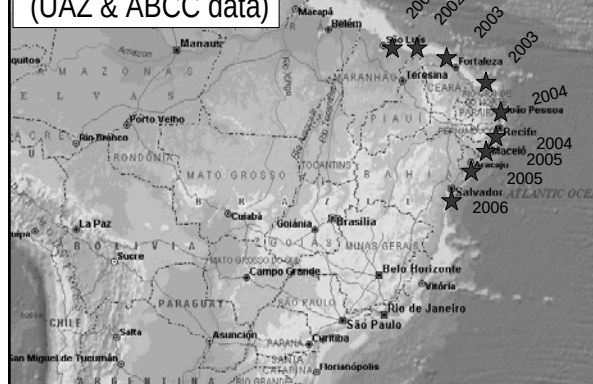
Necrosis muscular infecciosa (IMNV)

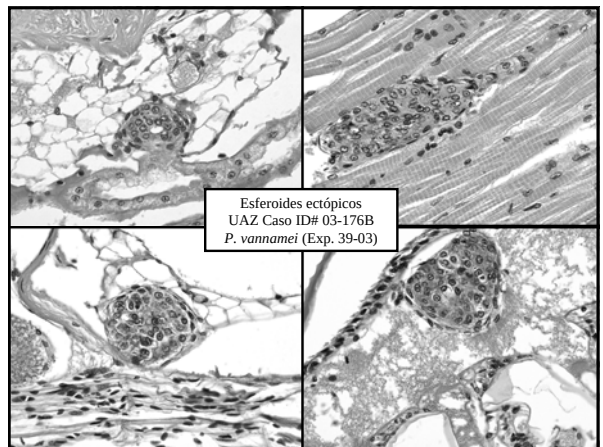
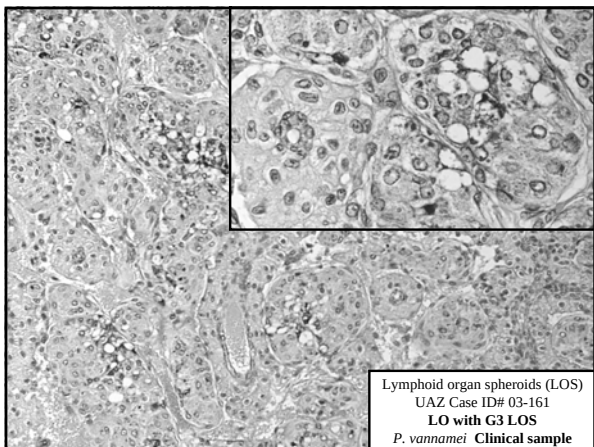
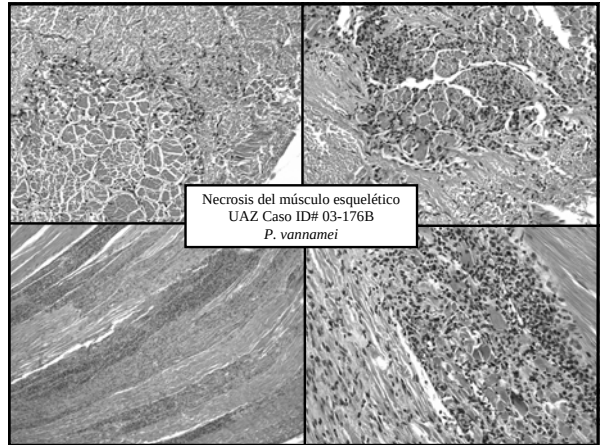
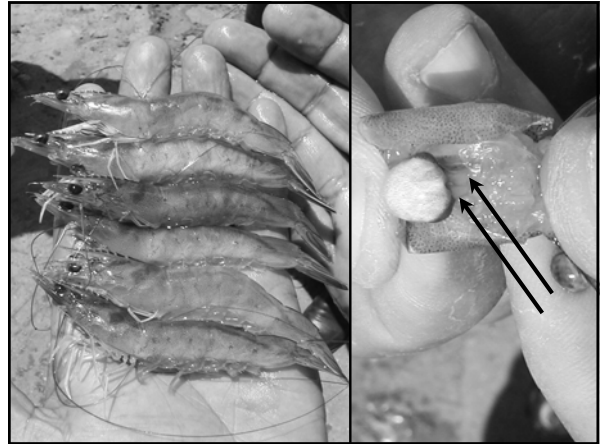
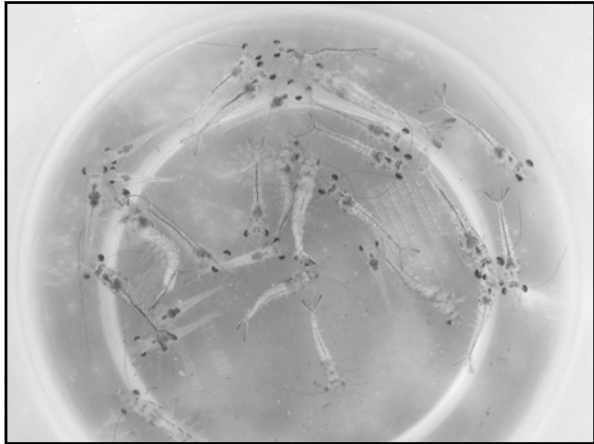
Necrosis muscular infecciosa – IMNV Familia Totiviridae

- Tamaño: ~40 nm, partícula desnuda, icosaédrica.
- Densidad (CsCl): 1.369 g/ml
- Polipéptidos: 1 mayor (approx. 106 kDa)
- Genoma: dsRNA, ~7.7 Kb
- Hospedero: *P. vannamei*; enfermedad crónica con altas mortandades
- Otras especies susceptibles (Exp.): *P. stylirostris* & *P. monodon*

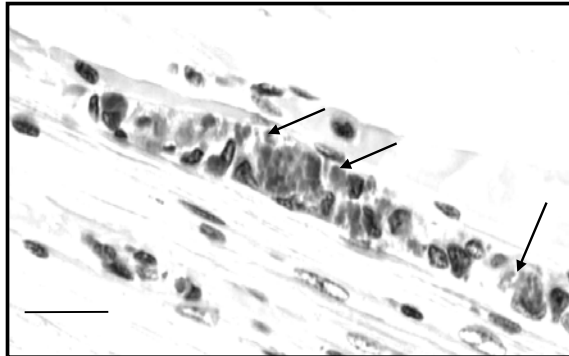


Distribución de IMN (UAZ & ABCC data)





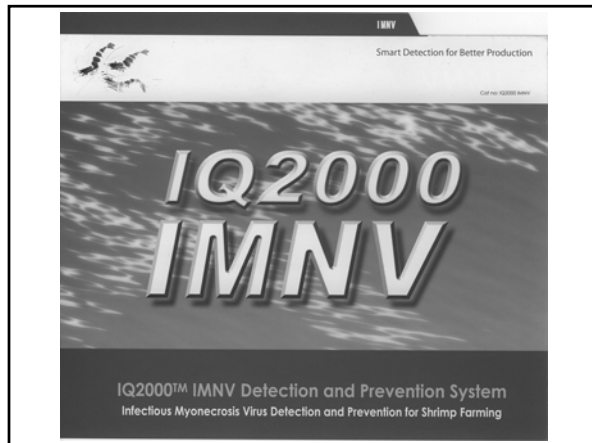
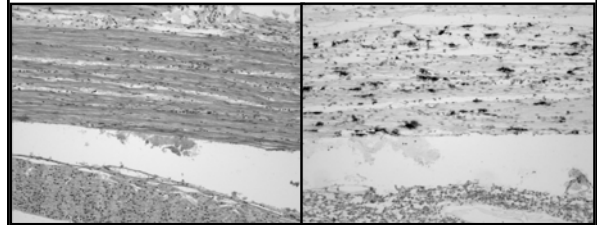
IMNV infección aguda en el músculo (H&E)



Scale bar: 50 µm

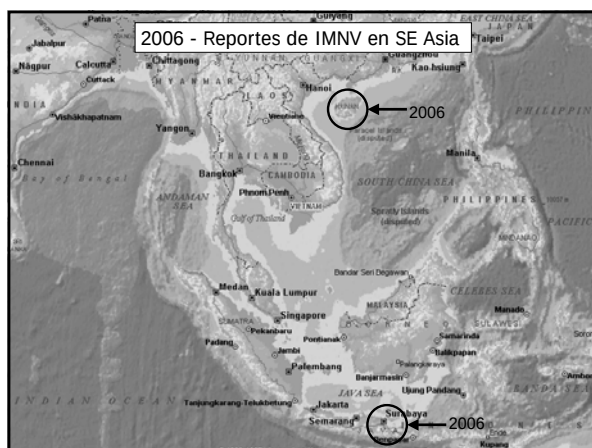
IMNV

Métodos moleculares: Hibridación *in situ*

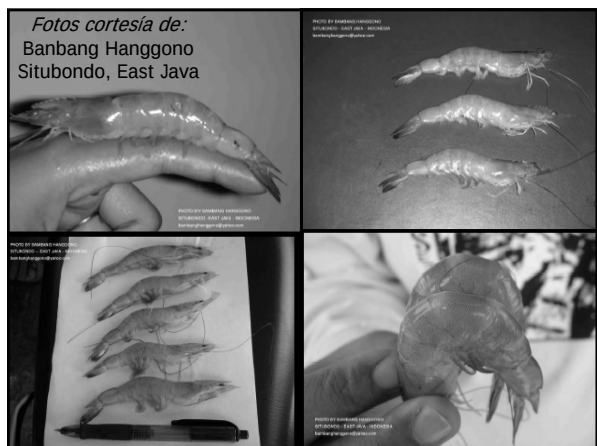


Reportes de IMNV en Indonesia y China

- May 2006 - Indonesian government lab reports IMNV in East Java in *P. vannamei*.
- IQ 2000 kit used for diagnosis.
- Gross signs, histopathology & mortality consistent with IMN disease.
- August 2006 – IMNV confirmed by RT-PCR, histopathology & ISH tests at UAZ.
- August 2006 – Reports of positive IQ2000 tests for IMNV in Hainan Island, China.
- Current situation – suspected in other SE Asian countries.



Fotos cortesía de:
Banbang Hanggono
Situbondo, East Java





Aquaculture Pathology Laboratory
The University of Arizona
Tucson, Arizona

Penaeus vannamei nodavirus (PvNV)

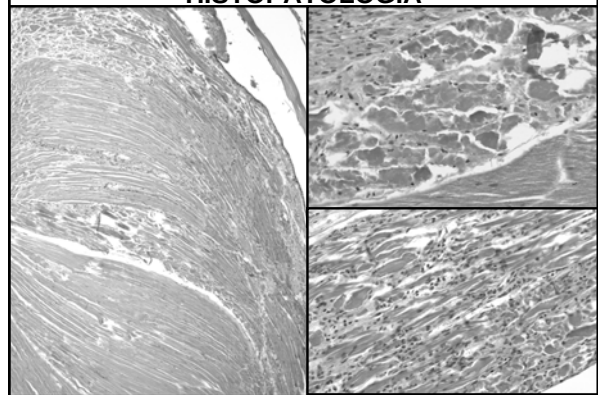
INTRODUCCIÓN

- Durante 2004, se recibieron muestras de camarón *Penaeus vannamei* provenientes de una granja en Belice, las cuales presentaban necrosis del músculo esquelético.
- Análisis histopatológico: Presencia de necrosis multifocal del músculo esquelético acompañado de inflamación fibrocítica y esferoides en el órgano linfoide. Inclusiones citoplásmicas –de tipo basofílico– dentro de células del músculo esquelético, el órgano linfoide y el tejido conectivo.
- Estos resultados sugerían que los camarones estaban infectados por el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV), cuya presencia se había confirmado únicamente en NE Brazil.
- No fue posible confirmar la presencia de IMNV a través de pruebas de RT-PCR e hibridación *in situ*.

SIGNOS DE LA ENFERMEDAD

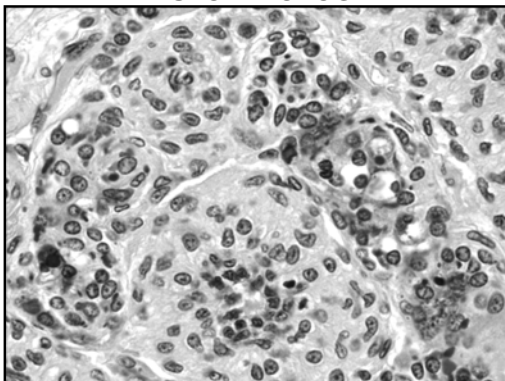


HISTOPATOLOGÍA



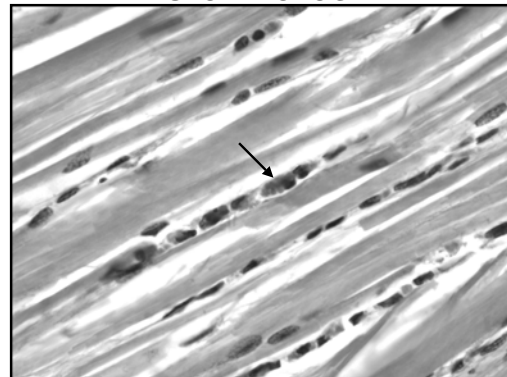
Necrosis multifocal del músculo esquelético

HISTOPATOLOGÍA



Esferoides del órgano Linfoide e inclusiones citoplásmicas basófilas

HISTOPATOLOGÍA



Inclusiones citoplásmicas basófilas en el músculo esquelético

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS (BLAST)

(Fragmento de 928 bp traducido del clon PvNV-4)

LvNV : APLQALTSYSRPILVVKISRLGPDSDFLTSVAIASTSTVTPADRLVKQPLSASSFPSTRIT
MrNV : APLQALTSYSRPILVVKISRLGPDSDFLTSVAIASTSTVTPADRLVKQPLSASSFPSTRIT

LvNV : GLSSYWEYRWLSVAVRYVPAVPNTVACQFVYIDTDPDPSNLSIDNQIVRQAVSQAGSN
MrNV : GLSSYWEYRWLSVAVRYVPAVPNTVACQFVYIDTDPDPSNLSIDNQIVRQAVSQAGSN

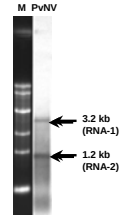
LvNV : QFMFTSKIVPLIVRADNQVYTYGDKQNLRFSLGGILYTIQVTDLTFNGELTIQDITCS
MrNV : QFMFTSKIVPLIVRADNQVYTYGDKQNLRFSLGGILYTIQVTDLTFNGELTIQDITCS

LvNV : LFLDWLVNFSIPQINPT---SLTDVVRVQKAVNFKREVSGVLEIOTVTGLSPSTSYLLIT
MrNV : LFLDWLVNFSIPQINPT---SLTDVVRVQKAVNFKREVSGVLEIOTVTGLSPSTSYLLIT

69% de similitud: gene de la proteína de la cápside del *nodavirus* de *Macrobrachium rosenbergii* (MrNV)

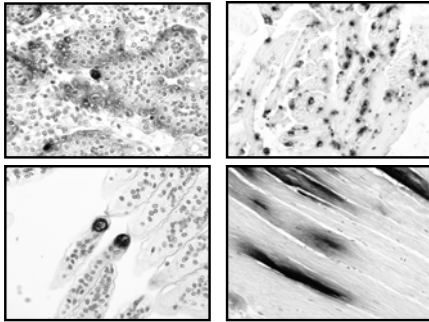
Confirmación de los 2 segmentos del genoma ssARN (característico de la familia *Nodaviridae*)

ARN total corrido en gel de agarosa e hibridizado con las sondas genéticas preparadas a partir de la colección de clones cADN ("Northern blot hybridization")



PRUEBA DE HIBRIDACIÓN *in situ*

Sonda genética preparada a partir del fragmento de 928 bp (clon PvNV-4)



INFECCIÓN EXPERIMENTAL (23 ppt & 26-28°C)

Especie	Método de infección	Resultados		
		Histología (H&E)	PvNV ISH	PvNV RT-PCR
<i>P. vannamei</i>	Inyección	Positivo	Positivo	Positivo (1 ^{er} -step, 9/9)
	<i>Per os</i>	No se hizo	No se hizo	Positivo (1 ^{er} & 2 nd step, 3/5)
<i>P. monodon</i>	Inyección	No detectado	Positivo débil	Positivo (1 ^{er} step, 5/5)
	<i>Per os</i>	No se hizo	No se hizo	Positivo (1 ^{er} & 2 nd step, 3/5)

• No se observó mortandad después de 4 semanas.

Resumiendo...

- Un virus previamente desconocido puede causar necrosis del músculo esquelético ("colas blancas") en *P. vannamei* la cual, a nivel histológico, es prácticamente idéntica a aquella causada por el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV).
- Las características moleculares y ultraestructurales de este nuevo virus lo colocan tentativamente dentro de la familia *Nodaviridae*. Se propone llamarlo: *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV).
- El efecto real en granja no ha sido completamente evaluado. Hasta la fecha, no se le ha podido asociar con episodios de mortandades súbitas o pérdidas importantes en la producción.
- Se cuenta ya con métodos de RT-PCR y de hibridación *in situ*, los cuales serán de utilidad para detectar niveles bajos de infección (subclínicos) y para diferenciar entre PvNV y IMNV.



Aquaculture Pathology Laboratory
The University of Arizona
Tucson, Arizona

HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE (NHP)

NHP: Alfa-proteobacteria

Morfología: Pleomórfica, "rickettsia-like", gram negativa.

Bacilo: sin flagelos
Helicoide: 8 flagelos apicales

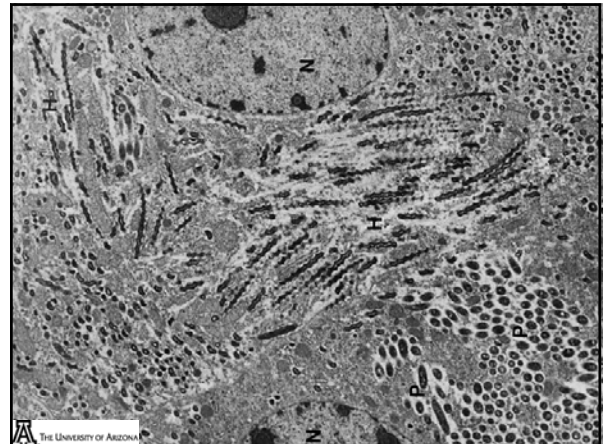
Dimensiones: Bacilo: 0.25 x 0.90 μm
Helicoide: 0.25 x 2-3.5 μm

Replicación: Citoplásmica.

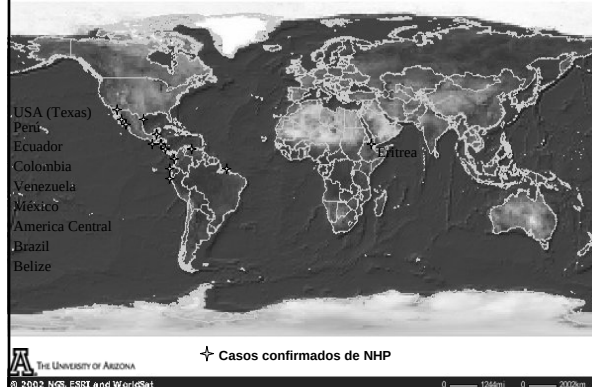
Tejido blanco: Hepatopáncreas.

Limitante en su estudio:

NHP es una bacteria no cultivable. Hasta el momento no ha sido posible propagarla en ningún medio de cultivo o línea celular. La única manera de estudiarla es manteniendo camarones infectados en el laboratorio.



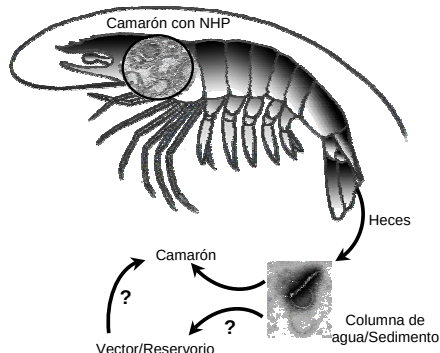
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA (AÑO 2007)



Epizootiología

- ✓ Se desconoce el mecanismo por medio del cual se dispersa la enfermedad.
- ✓ Aunque se tiene la sospecha, no se ha encontrado evidencia de un posible vector o reservorio de la enfermedad.
- ✓ Observaciones de campo sugieren la posibilidad de dispersión a través del agua.

Ciclo hipotético de infección



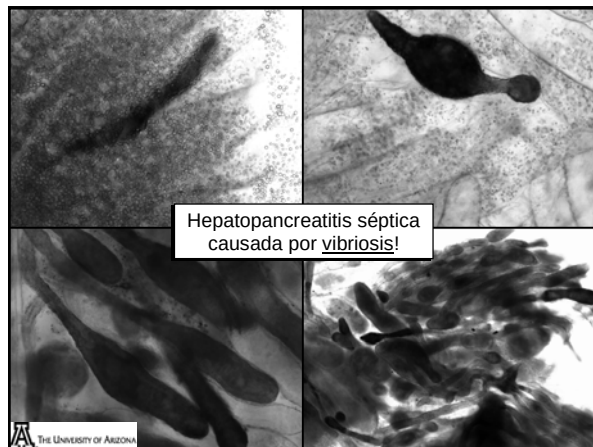
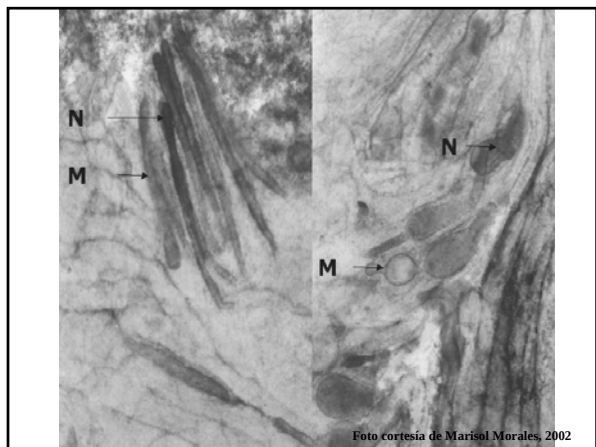
Diagnóstico

✓ Diagnóstico presuntivo:

- ✓ Historial de temperaturas (>29-35°C) y salinidades (> 20-40‰) elevadas.
- ✓ Cutícula blanda, manchas negras, orillas negras en los pleópodos y urópodos.
- ✓ Hepatopáncreas atrofiado, blanquecino, melanizado, o lleno de fluido.
- ✓ Preparaciones en fresco muestran disminución o ausencia de lípidos, atrofia de la mucosa epitelial y túbulos melanizados.

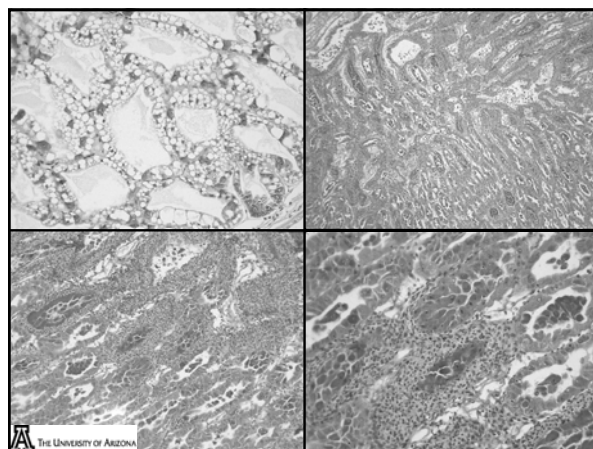
✓ Diagnóstico confirmatorio:

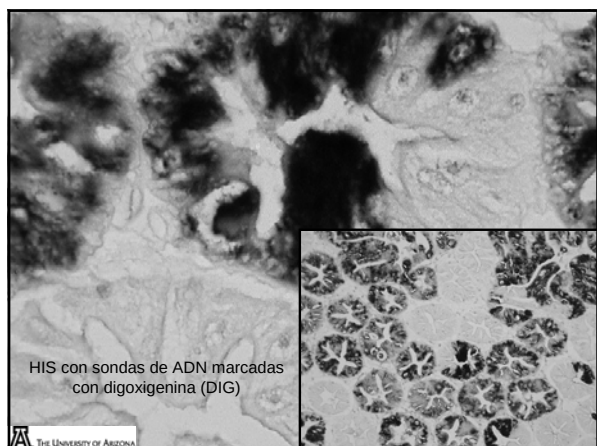
- ✓ Histología: Tinciones de H&E, Giemsa, etc.
- ✓ Hibridación *in situ* con sondas de ADN específicas.
- ✓ PCR.



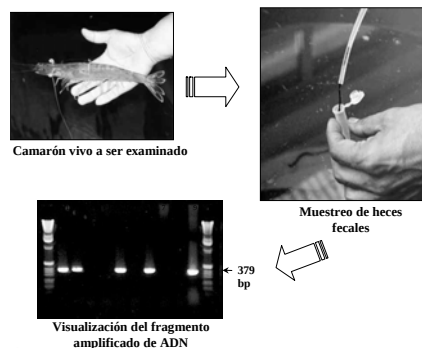
Diagnóstico confirmatorio

- ✓ *Análisis histológico con tinciones de H&E, Giemsa, etc.*
- ✓ *Hibridación in situ con sondas genéticas*
- ✓ *PCR*





Método no letal para la detección de NHP-B



Manejo de la enfermedad

- ✓ Diseño de estanques más profundos para mitigar el efecto de las altas temperaturas.
- ✓ Recambios de agua para reducir la salinidad.
- ✓ Uso metafílico de alimentos medicados (OTC de 1.5 a 4 kg/t por 10-14 días).
 - anticiparse en base a historial de la granja.
 - tener una fuente rápida de suministro de alimento.
 - revisar constantemente a los animales y aplicar el tratamiento cuando se observen los primeros signos de la enfermedad.
 - Obedecer los tiempos de retiro establecidos legalmente.
- ✓ Hasta el momento no se ha reportado desarrollo de resistencia de NHP-B a la OTC. Sin embargo, se ha documentado ya la aparición de cepas patógenas de *Vibrio* sp. resistentes a OTC.

Surgimiento de cepas de *Vibrio* spp. resistentes a varios antibióticos

- Análisis bacteriológico e histológico para algunas granjas en el estado de Sonora.
- Octubre 2007 (4 granjas)
- Junio 2008 (5 granjas; 3 mismas del año anterior)
- Muestras de hemolinfa y hepatopáncreas
- Aislamiento en TCBS
- Identificación por el método API-NE; prueba Kirby-Bauer (sensidiscos) para sensibilidad a antibióticos

Resultados

Octubre 2007

- Crecimiento bacteriano en ambos tipos de muestra
- Mismos tipos de colonias en las 4 granjas
- 5 aislados seleccionados como representativos

Junio 2008

- Crecimiento bacteriano en ambos tipos de muestra
- Mismos tipos de colonias en las 5 granjas
- 6 aislados seleccionados como representativos

Resultados

	Aislado #	Identificación
Octubre 2007	07-330D/1	Bacilo Gram positivo
	07-331/E3	<i>Vibrio alginolyticus/parahaemolyticus</i>
	07-332/B3	<i>Vibrio</i> spp. (<i>V. harvey</i> ?)
	07-333/F1	<i>Vibrio/Aeromonas</i>
	07-333/F2	<i>V. alginolyticus</i> Ninguno es predominante
Junio 2008	Pendiente	Resultado preliminar: 4 de 6 <i>V. vulnificus</i> 1 de 6 <i>V. parahaemolyticus</i> 1 de 6 <i>Vibrio</i> spp. Ninguno es predominante

Resultados

	PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS
Octubre 2007	5 aislados sensibles a Florfenicol & Acido oxolinico 5 aislados RESISTENTES a Ampicilina & Estreptomicina 5 aislados sensibilidad intermedia a Eritromicina & SSS 2 aislados RESISTENTES a Oxytetraciclina 4 aislados RESISTENTES a Romet-30
Junio 2008	6 aislados sensibles a Enrofloxacin, Florfenicol, Romet-30 & SSS 6 aislados RESISTENTES a Ampicilina, Estreptomicina & Oxytetraciclina 3 aislados sensibles a Fosfomicina, 2 RESISTENTES, 1 intermedio 4 aislados RESISTENTES a Amoxi-blend, 2 intermedios

Resultados

	HISTOPATOLOGIA
Octubre 2007	•Patología predominante: ✓Vibriosis (HP y sistémica). •Otros hallazgos: ✓NHP (infección activa en algunos camarones y probablemente en remisión en otros) ✓Ensuciamiento de branquias y apéndices por epibiontes (<i>Zoothamnium</i> spp.)
Junio 2008	En proceso. Resultados preliminares de 2 granjas no muestran ninguna patología importante

Interpretación

- Probable causa de mortandades en 2007: Vibriosis de tipo secundario, y NHP.
- Factores ambientales extremos (baja calidad de agua, altas densidades, etc.) probablemente contribuyen a debilitar el sistema inmune.
- Necesidad de contar con otro antibiótico autorizado para el tratamiento de NHP. La rotación de estos tratamientos puede ayudar a prevenir el desarrollo de resistencia.

Reconocimiento

Soporte financiero para investigación y servicios:

- USDA: Consorcio Americano para el Cultivo de Camarón Marino (Marine Shrimp Farming Consortium- USMSFC) y la Cooperativa de Servicios Estatales para la Investigación y la Educación (Cooperative State Research Education & Extension Services-CSREES).
- Industria camaronícola internacional a través de cuotas por servicios de diagnóstico y contratos de asistencia técnica

