

Hepatopancreatitis necrotizante (NHP)

Hepatopancreatitis necrotizante de Texas (TNHP),
Síndrome de mortalidad de los estanques de Texas (TPMS),
Hepatopancreatitis necrotizante de Perú (PNHP) o
Hepatopancreatitis necrotizante de Ecuador (ENHP)

Autor: Jorge Cuéllar-Anjel

Última actualización:
Agosto de 2013



IOWA STATE UNIVERSITY*
College of Veterinary Medicine
Iowa State University
Ames, Iowa 50011
Phone: 515.294.7189
Fax: 515.294.8259
cfsph@iastate.edu
www.cfsph.iastate.edu



INSTITUTE FOR
INTERNATIONAL
COOPERATION IN
ANIMAL BIOLOGICS
Iowa State University
College of Veterinary Medicine
www.cfsph.iastate.edu/IICAB/

Importancia

La hepatopancreatitis necrotizante (NHP) es una importante enfermedad bacteriana, que afecta el hepatopáncreas de los camarones infectados; fue reportada por primera vez en 1992, en Texas, aunque se piensa que pudo ser la causante de las afecciones presentadas en cultivos de camarón desde 1985. Debido a la importancia del hepatopáncreas para la nutrición del camarón, la enfermedad NHP pueden producir lesiones con consecuencias que van desde disminución del crecimiento de los camarones afectados, hasta mortalidades acumuladas que pueden llegar al 90%. La NHP guarda relación con ciertas temperaturas y salinidades presentes en el ambiente acuático de cultivo y es muy importante la detección temprana con el fin de poder tomar medidas terapéuticas a tiempo.

Etiología

La bacteria intracelular obligada conocida como *Hepatobacter penaei*, es el agente patógeno causante de la NHP. El *H. penaei* es una bacteria dimorfa, cilíndrica (es la más importante en la patogénesis de la enfermedad) o helicoidal; posee flagelos en el ápice y se considera como una Alfa-ptoteobacteria, Gram- negativa y tipo rickettsia. Infecta todo tipo de células del hepatopáncreas y se encuentra libre en el citoplasma de las células infectadas, lugar en donde se multiplica. La aparición de la enfermedad puede verse favorecida por altas temperaturas (29 a 31°C) y, en algunos casos, por la salinidad del agua del estanque (>16 ppt).

Especies afectadas

La NHP es una enfermedad que se presenta en la mayoría de las especies de camarones penaeidos, de agua dulce y de agua salada, entre ellos el *L. vannamei* en etapas juveniles y adultos; también *L. stylirostris*. Las etapas del ciclo de vida de *L. vannamei* afectadas por NHP son juvenil, subadulto y adulto (reproductores). Se han encontrado alteraciones parecidas a la NHP se en otras especies como *P. setiferus*, *P. aztecus* y *P. californiensis*.

Distribución geográfica

Inicialmente la enfermedad fue diagnosticada en Texas hacia 1992 pero posteriormente se fueron presentando bacterias similares en fincas camaroneras de Brasil, Venezuela, Ecuador, Perú, Colombia, Panamá, Belice, Nicaragua, Guatemala, México, El Salvador, Costa Rica y Vietnam. Se encuentra presente tanto en camarones salvajes como de cultivo.

Transmisión

Es posible que algunos sobrevivientes de las epizootias permanezcan como portadores de por vida, favoreciendo la transmisión horizontal de la enfermedad. De igual forma, el canibalismo y el agua contaminada con heces, contribuyen a la transmisión horizontal. Es posible también que se presente la transmisión vertical.

La prevalencia de la NHP en camarones silvestres oscila entre 5.6 y 15% en *P. duorarum* y entre 5 y 17% en *P. aztecus* en México. Para el caso del Perú, las prevalencias son en *L. vannamei* 0.77% y en *L. stylirostris* 0.43%. En fincas camaroneras de Belice, Brasil, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Venezuela, la prevalencia en camarones *L. vannamei* de cultivo oscilan entre 0.6% y 1.3%.

Signos clínicos

Durante la aparición de la enfermedad, se presenta disminución de la ingesta de alimento que progresa hasta anorexia, aumenta la tasa de conversión de alimento, letargia, intestino vacío, cromatóforos expandidos, flacidez, caparazón blando, palidez generalizada, branquias amarillas o café, hepatopáncreas atrófico y blanquecino con melanización, colas delgadas, superficies con mal olor por presencia de epicomensales, lesiones bacterianas en la superficie, o apéndices melanizados, bordes oscuros en urópodos y pleópodos.

Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP)

Mortalidad y morbilidad

En *L. vannamei*, la enfermedad NHP tiene un curso agudo y puede llegar a producir mortalidades del 90% al 100%. Cuando el proceso se presenta como una patología de curso crónico, se observan camarones con flacidez, bajo crecimiento y exoesqueleto blando.

Diagnóstico

La anatomopatología microscópica de la NHP incluye el fácil diagnóstico de la enfermedad en fase aguda o crónica tanto en *L. vannamei* como en *L. stylirostris* mediante histopatología de rutina. Como apoyo diagnóstico para el estudio de la enfermedad, se ha estructurado en las siguientes 4 fases:

Fase inicial. Es difícil de diagnosticar mediante histología usando tinción con Hematoxilina y Eosina. Para infecciones iniciales, se recomiendan métodos moleculares como PCR o sondas de ADN específicas para NHP (Dot blot o hibridación in-situ).

Fase aguda. Se caracteriza por atrofia del hepatopáncreas, presencia de bacterias y hemocitos infiltrados en los túbulos del órgano con encapsulaciones multifocales, células hipertróficas y epiteliales individuales que asemejan estar separadas de las vecinas, necrosis y descamación celular en la luz de los túbulos y contenido variable de vacuolas lipídicas.

Fase de transición. En esta fase hay inflamación caracterizada por infiltración de los hemocitos en los espacios intertubulares, como respuesta a la bacteriosis secundaria que sigue a la necrosis, citolisis y desprendimiento de las células epiteliales de los túbulos afectados. El hepatopáncreas contiene muy pocas vacuolas lipídicas y en algunos casos se hacen evidentes las masas de bacterias. También es frecuente observar nódulos hemocíticos y nódulos melanizados con masas de bacterias en su interior.

Fase crónica. Se caracteriza por una disminución marcada del número y severidad de las lesiones en los túbulos del hepatopáncreas, de la encapsulación multifocal y de las zonas edematosas, procesos patológicos que son reemplazados por zonas de infiltración y acumulación de hemocitos. Suele presentarse fibrosis, túbulos melanizados y necróticos, pocas células con masas bacterianas y pocos nódulos hemocíticos.

Diagnóstico presuntivo

Se considera un caso como sospechoso, cuando se presentan mortalidades altas de forma súbita en poslarvas (pls) avanzadas, juveniles o subadultos de *L. vannamei* o *L. stylirostris*, dentro de camarónicas ubicadas en zonas donde la NHP se considere como enzoótica. Se podrán ver también aves marinas (gaviotas, cormoranes, garzas, golondrinas de mar, etc.) capturando camarones enfermos en los estanques. Estos, al ser sacados del agua para examen clínico, pueden presentar signos macroscópicos sugestivos de la NHP en fase aguda o crónica tales como atrofia del hepatopáncreas, color rojizo u oscuro azulado, letargia,

caparazón blando, tracto intestinal vacío y algunas veces puntos negros o marrón oscuro de forma irregulares sobre varias partes de la cutícula.

En instalaciones de maduración y larvicultura que utilizan reproductores silvestres o infectados por NHP, se puede observar una baja tasa de eclosión de los huevos, baja supervivencia y bajo rendimiento en los estadios de larva y de postlarva.

Como una herramienta para llegar a una impresión diagnóstica inicial (diagnóstico presuntivo), el montaje en fresco del hepatopáncreas suministra información valiosa cuando se examinan camarones enfermos de una población endémica o sospechosa. Esta técnica de aplastamiento del tejido, se lleva a cabo para detectar la NHP de manera presuntiva y se puede observar durante el montaje que el hepatopáncreas esté atrofiado, blando y acuoso, lleno de líquido en el centro, pálido con líneas negras (túbulos melanizados) o centro pálido en vez del color naranja natural.

En base a la estructuración de la NHP en 4 fases, se puede considerar que la **fase inicial** presenta escasa deformación (estrangulamiento) de los túbulos (de 1 a 5 por campo y por camarón) y muy poca descamación de las células de los túbulos. **La fase aguda** incluye infiltración de hemocitos, mayor cantidad de túbulos deformados (de 6 a 10 por campo y por camarón) y encapsulación en varias partes del órgano (túbulos atrofiados cubiertos por hemocitos). En la **fase de transición** hay presencia de infiltración hemocítica, aún más túbulos deformados (de 11 a 15 por campo y por camarón), túbulos necróticos, melanización en los túbulos y encapsulación marcada. Algunas veces se observan nódulos hemocíticos con masas de bacterias en el interior. Durante la **fase crónica** se pueden observar zonas del hepatopáncreas con fibrosis, túbulos melanizados o necróticos muy escasos y baja cantidad de células hipertrofiadas con masas bacterianas en el citoplasma.

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de la hepatopancreatitis necrotizante incluye bacteriosis sistémicas en fase aguda, así como otras posibles condiciones patológicas en las que se produzca anorexia y coloración oscura por causas químicas o biológicas.

Diagnóstico confirmatorio

Se considera que un caso sospechoso o un diagnóstico presuntivo son confirmados, cuando se consiguen resultados positivos al utilizar una prueba molecular (PCR o sonda genética) y una prueba morfológica (histología), realizando mínimo dos de los siguientes métodos:

a) Confirmación histológica de lesiones diagnósticas de la NHP en fase aguda con atrofia moderada de la mucosa tubular, bacterias visibles y procesos inflamatorios (infiltración hemocítica) en los túbulos con encapsulaciones multifocales

Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP)

b) Reacción positiva mediante hibridación *in situ* utilizando sondas genéticas específicas para detección genómica de NHP

c) Reacción positiva a la prueba de PCR utilizando primers específicos para la detección genómica de NHP

Toma de muestras para laboratorio

Histopatología. Para este tipo de técnica se requiere que los camarones capturados se encuentren visiblemente enfermos (con presencia de los signos clínicos mencionados anteriormente) y que se estén aún vivos. Los animales enfermos seleccionados para histopatología, deben ser entre 5 y 10 por población (estanque o cuerpo de agua) y deben ser fijados mediante inyección con solución fijadora de Davidson-AFA. La inyección de debe realizar en el cefalotórax (cabeza) y especialmente el hepatopáncreas. El proceso de fijación se debe hacer siempre utilizando guantes, lentes protectores y estando en un lugar abierto y bien ventilado para evitar inhalar estos gases. Este fijador puede ser carcinogénico por su contenido de formaldehído.

Pruebas moleculares. Tanto la hibridación Dot Blot como la PCR, requieren el uso de hepatopáncreas para la detección genómica de NHP. La técnica de Dot Blot usualmente requiere someter el tejido a maceración con un buffer de lisis, que rompe las células y expone el DNA bacteriano quedando libre en la solución de extracción.

La hibridación *in situ* equivale a una Dot Blot, pero realizada directamente sobre un corte histológico que no ha sido teñido y que se ha desparafinado previamente. Dicho corte debe corresponder a un camarón enfermo previamente fijado en Davidson-AFA según el protocolo normal para histología. Los resultados se dan en función de la reacción colorimétrica que se observa en las células en las que el virus está contenido y, como evidencia de ello, se pueden ver zonas pardas u oscuras (casi negras) indicando la existencia de genoma de las bacterias causantes de la NHP.

La técnica de PCR en cualquiera de sus formas (un paso, anidada (*nested PCR*), tiempo real, LAMP, etc.), debe realizarse a partir de una muestra del hepatopáncreas de un camarón enfermo y sospechoso. En el caso de postlarvas, se utilizan 5 a 20 organismos enteros habiéndoles retirado cuidadosamente los ojos, ya que éstos interfieren con la PCR.

Medidas recomendadas ante la sospecha de hepatopancreatitis necrotizante

Notificación a las autoridades

La hepatopancreatitis necrotizante es una enfermedad de camarones penaeoides que debe ser notificada ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés). Los requisitos para la notificación de la enfermedad a las naciones miembro de la OIE y las pautas de importación/exportación pueden consultarse en el Código Sanitario para los Animales Acuáticos de la OIE <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-acuatico/acceso-en-linea/>. Los veterinarios que detecten un

caso de la NHP deben seguir las pautas nacionales y/o locales para la notificación y las pruebas de diagnóstico correspondientes. Sin embargo, se debe recalcar que esta es una enfermedad catalogada como *endémica* en las Américas, donde está ampliamente distribuida en los países productores de camarón de cultivo.

Medidas de Control

Se han utilizado con éxito variable los antibióticos Oxitetraciclina (5,000 ppm) y Florfenicol (250 ppm) en alimentos medicados (peletizados) cada 8 horas durante 10 días, mostrando en algunos casos mejoría de la población frente a la NHP. Esto es en la medida en que la enfermedad sea detectada en una fase inicial.

Como estrategias de prevención para evitar la infección de los camarones de la camaronera con NHP, se pueden incluir las siguientes:

- Detección temprana (fase inicial) para que la terapia medicada sea efectiva y se evite el canibalismo que conllevaría a diseminación de la enfermedad
- Subalimentación o ayunos prolongados pueden conducir al canibalismo y la subsecuente diseminación de la enfermedad en poblaciones infectadas con la bacteria causante de la NHP en *L. vannamei*
- Utilizar cal hidratada (Ca(OH)₂) para cubrir los fondos de los estanques durante la preparación y antes del llenado
- Rastrillado, arado, eliminación de sedimentos del fondo, encalado abundante y secado al sol por varias semanas, acompañado esto de la desinfección de los elementos de cosecha y otros equipos de la camaronera utilizados durante el ciclo de producción
- Reproductores libres de patógenos específicos (SPF)
- Certificación individual de reproductores y de nauplios o postlarvas mediante la técnica de PCR

Luego de que el *H. penaei* causante de NHP se ha introducido a un país, no se deben comprar nauplios o pls en laboratorios que podrían estar o que están infectados con esta bacteria. Es probable que el yodo y el agua de lavado puedan retirar y destruir la bacteria cuando se usa en huevos, nauplios y pls de camarón infectados. Es esencial que este proceso sea consistente. Las granjas deben mantener buenas medidas de bioseguridad y examinar cada lote de animales antes de su compra y siembra en los estanques.

Se deben utilizar pruebas de diagnóstico sensibles y confiables para la detección y seguimiento de la NHP. Éstas suelen ser tecnologías basadas en DNA, tales como la PCR y la hibridación *in situ* (ISH).

Es importante comprar pls que han sido analizadas por PCR para NHP luego de que han pasado la prueba de estrés.

Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP)

Aunque se sabe que el uso de formalina ayuda a eliminar las pls más débiles, las granjas nunca deben sembrar pls que se sabe son portadoras de la bacteria causante de NHP.

Si se detecta la infección en la etapa inicial, lo cual es muy importante, se debe iniciar tratamiento con Oxitetraciclina (5,000 ppm) por 14 días o Florfenicol (250 ppm) por 10 días.

Salud pública

Los humanos no son propensos a contraer la hepatopancreatitis necrotizante

Recursos en internet

http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/2.2.04_NECR_OTISING_HEPATO.pdf

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/2010/2.2.04_NECROTISING_HEPATO.pdf

<http://www.fao.org/docrep/003/x9199e/x9199e03.htm>

Referencias

- AGUIRRE-GUZMAN G., SANCHEZ-MARTINEZ J.G., PÉREZ-CASTAÑEDA R. & ORTA-RODRIGUEZ R. 2010. Detection of necrotizing hepatopancreatitis (nhp) in wild shrimp from Laguna Madre, Mexico by a multiplex polymerase chain reaction. *Thai J. Vet. Med.*, 40, 337–341.
- ARANGUREN L.F., TANG K.F. & LIGHTNER D.V. 2010. Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, 307, 187–192.
- BONDAD-REANTASCO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (eds). 2001. Chapter 10: Necrotizing hepatopancreatitis. In: *Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases*. FAO Fisheries Technical Paper No. 402. Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 207 p.
- BROCK J.A. & MAIN F. 1994. A Guide to the Common Problems and Disease of Cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute. Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 241 p.
- CRABTREE B.G., ERDMAN M.M., HARRIS D.L. & HARRIS I.T. 2006. Preservation of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) by freezing tissue collected from experimentally infected *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, 70, 175–179.
- CUÉLLAR-ANJEL, J., V. PACHECO, J. DIEZ, E. DE LEÓN, Z. VEGA AND H. SALAZAR. 2000. Main diseases of farmed penaeid shrimp in Panama. Book of abstracts of the 4th Latinamerican Aquaculture Congress and Exhibition. Panamá, República de Panamá.
- CUÉLLAR-ANJEL, J. 2008. Técnicas de diagnóstico para enfermedades en camarones. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). *Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones*. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. pp. 258.
- CUÉLLAR-ANJEL, J., M. CORTEEL, L. GALLI, V. ALDAY-SANZ AND K.W. HASSON. 2010. Principal Shrimp Infectious Diseases, Diagnosis and Management. In: *The Shrimp Book*, ed. Victoria Alday-Sanz, Nottingham University Press, U.K. ISBN 978-1-904761-59-4. pp. 930.
- FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. 1993. Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, 61, 44–48. Capítulo 2.2.4. —Hepatopancreatitis necrotizante 12 Manual Acuático de la OIE 2012
- FRELIER P.F., LOY J.K., VARNER P., THOMPSON J.A. LAWRENCE A.L. & BRAY W.A. 1995. Management procedures for the treatment of necrotizing hepatopancreatitis in farmed shrimp. In: *Swimming Through Troubled Waters. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society '95. San Diego, CA, USA, 240 p.
- FRELIER P.F., SIS R.F., BELL T.A. & LEWIS D.H. 1992. Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Vet. Pathol.*, 29, 269–277.
- LIGHTNER D.V. (ed.) 1996. A handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 304 p.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BONAMI J.R. 1992. Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas Necrotizing Hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Dis. Aquat. Org.*, 13, 235–239.
- LOY J.K., DEWHIRST F.E., WEBER W., FRELIER P.F., GARBAR T.L., SERBAN I.T. & TEMPLETON J.W. 1996a. Molecular phylogeny and in situ detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3439–3445.
- LOY J.K. & FRELIER P.F. 1996. Specific, nonradioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by in situ hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 8, 324–331.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S. 2008. Capítulo 3: Enfermedades bacterianas. En: *Patología e Inmunología de Camarones*, Editores Vielka Morales y Jorge Cuéllar-Anjel. Programa CYTED Red II-D vannamei, Panamá, Rep. De Panamá, 120–134.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., MOURA LEMUS-PEREIRA A., SOLÍS MONTIEL V.T., RUÍZ-LUNA A. & CONROY G. 2011a. Prevalence of diseases in cultured white shrimp (*Penaeus vannamei*) in eight regions of Latin America. *Rev. Científica FCV-LUZ*. Capítulo 2.2.4. Hepatopancreatitis necrotizante.
- NUNAN M.L., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. 2008. Improvement of a PCR method for the detection of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, 80, 69–73.
- VINCENT A.G. & LOTZ J.M. 2007. Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to KONA stock *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, 75, 265–268.