



[ANIMAL HEALTH & WELFARE \(/ADVOCATE/CATEGORY/ANIMAL-HEALTH-WELFARE\)](#)

Herramienta diagnóstica no-invasiva desarrollada para la enfermedad EMS del camarón

Monday, 17 April 2017

By Jee Eun Han, D.V.M. Ph.D. , Patharapol Piamsomboon, D.V.M. Ph.D. and Kathy F.J. Tang, Ph.D.

Un novedoso procedimiento puede detectar la Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda en camarones peneidos



La AHPND es una enfermedad global importante del camar3n cultivado que ha afectado seriamente la industria en muchos pa3ses de Asia y Am3rica Latina. Foto de Darryl Jory.

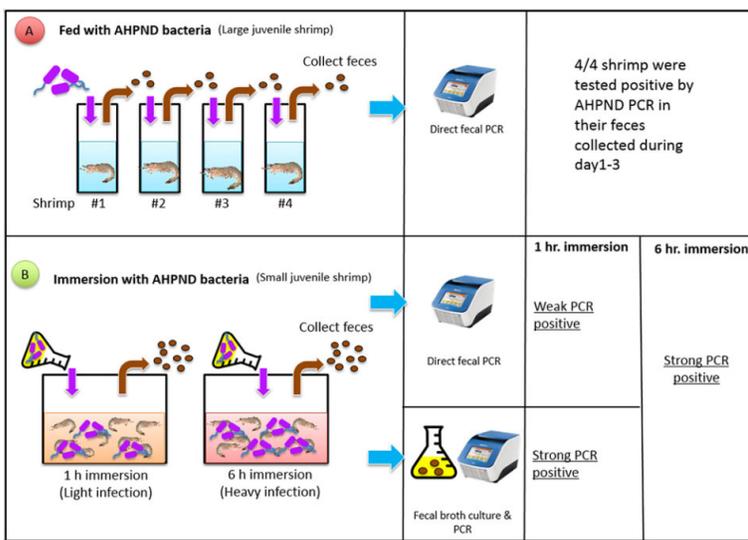
La enfermedad de necrosis hepatopancre3tica aguda (AHPND) ha causado una mortalidad sustancial en camarones peneidos cultivados en varios pa3ses del sudeste asi3tico y de Am3rica Latina. La enfermedad causa desprendimiento y necrosis del tejido hepatopancre3tico que resulta de toxinas ($pirA$ & B_{vp}) producidas por cepas espec3ficas de *Vibrio parahaemolyticus*.

El diagn3stico de AHPND habitualmente implica sacrificar el camar3n para recolectar tejido de hepatopancreas para an3lisis de PCR y/o histopatolog3a. Sin embargo, este m3todo invasivo no es obviamente deseable para monitorear valiosos reproductores, y m3todos no sacrificiales ser3an preferidos. M3todos no-invasivos que implican la prueba fecal han sido utilizados con 3xito para monitorear otros pat3genos ent3ricos del camar3n.

Como las bacterias AHPND est3n presentes en los sistemas digestivos de camarones infectados, basamos nuestra investigaci3n en la posibilidad de que se puedan recolectar muestras fecales para monitorear las poblaciones de camarones sin causar mortalidad. Aqu3 presentamos nuestro estudio (resumido de la publicaci3n original en *Aquaculture Reports* 5 (2017 58-61), donde evaluamos los procedimientos con muestras de heces fecales de camar3n directamente o con el enriquecimiento de las bacterias presentes en las heces a trav3s del cultivo en medios. Nuestro agradecimiento al Dr. Donald Lightner (Escuela de Ciencias Biom3dicas Animales y Comparadas, Universidad de Arizona, Tucson, AZ, EE.UU.) por su asistencia durante este estudio.

El uso de heces como muestras diagn3sticas de camar3n asintom3tico

Este ensayo fue dise1ado para determinar si las muestras fecales de camar3n juvenil grande afectado por AHPND se pueden utilizar como muestra de diagn3stico. La Fig. 1 (abajo) describe los procedimientos que desarrollamos durante nuestro estudio. Camarones blancos del Pac3fico, *Penaeus vannamei*, (cuatro camarones SPF, peso promedio de 8,5 gramos) se alimentaron una vez con pellets para camar3n empapados en el cultivo de AHPND-*V. parahaemolyticus* (108 UFC/mL, una dosis sub-letal). Despu3s de la alimentaci3n, los camarones se enjuagaron con formalina-yodo para desinfectar las bacterias AHPND residuales durante la exposici3n *per os*, y luego se transfirieron a cuatro tanques individuales.



Las hebras fecales se recolectaron durante el per3odo experimental de tres d3as; despu3s se extrajo ADN y esto fue seguido por una PCR de AHPND dirigida a ambos genes de toxina, $pirA_{vp}$ y $pirB_{vp}$. Los resultados mostraron fuertes bandas positivas despu3s de la electroforesis en gel de agarosa. No hubo mortalidad en estos camarones durante la

prueba. Al terminar, los camarones fueron procesados para exámenes histopatológicos y no se detectaron lesiones de AHPND. Esto indica que las heces pueden ser utilizadas como muestras diagnósticas para el monitoreo de camarones grandes que tienen niveles asintomáticos bajos de infección.

Comparaciones de sensibilidad de PCR de plantillas preparadas a partir de ADN fecal o de cultivo bacteriano enriquecido

Se utilizaron *P. vannamei* SPF (80 camarones, peso medio: 0,7 g) en dos bioensayos de inmersión, inmersión de 1 y 6 horas en caldo de AHPND-*V. parahaemolyticus*. Las muestras fecales se recogieron después de 24 horas de cada bioensayo. Se extrajo una parte de las muestras fecales para ADN y se usó directamente para análisis de PCR, y se cultivó una parte de las muestras de heces con medio TSB + (en una proporción de 1:1000) y se incubó a 28 a 29 grados C durante 6 horas; este caldo se utilizó entonces como una plantilla de PCR sin extracción de ADN.

Con la inmersión de 1 hora, el camarón se volvió moribundo al día 4, con una mortalidad acumulada de 45 por ciento al final (día 6). Se revisaron 12 muestras fecales y se analizaron por PCR: siete muestras de los ADN extraídos tuvieron fuertes resultados de PCR positivos, cuatro fueron débiles positivos y una muestra no fue detectada. Con la inmersión de 6 horas, el camarón se volvió moribundo el día 1 y todos los camarones murieron al día 2. Se observaron fuertes amplificaciones por PCR tanto en el extracto de ADN fecal como en el cultivo bacteriano enriquecido.

A partir de ambos bioensayos, encontramos que el método de enriquecimiento tenía mayor intensidad de banda de PCR que las muestras de ADN fecal (Fig. 2), ya que el enriquecimiento aumentó considerablemente las poblaciones bacterianas. El aumento de la sensibilidad del método de enriquecimiento puede eludir el uso de PCR anidada para la detección de AHPND.

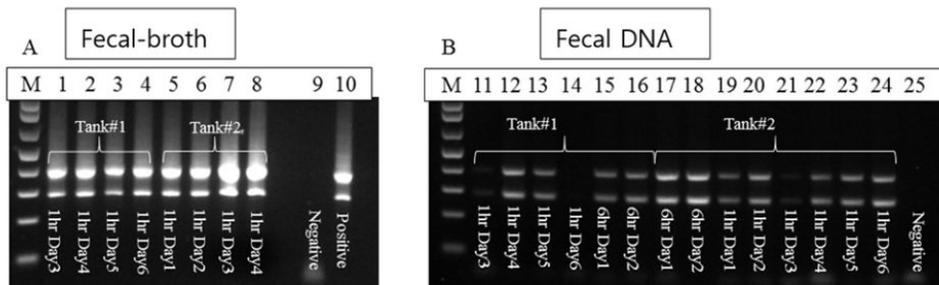


Fig. 2: Debido a que el procedimiento de enriquecimiento aumentó considerablemente las poblaciones bacterianas, encontramos que tenía una mayor intensidad de banda de PCR que las muestras de ADN fecal.

Perspectivas

Nuestro estudio mostró que no todos los camarones infectados sucumben a la enfermedad AHPND. Del mismo modo, en las granjas camaroneras, los animales infectados con dosis sub-letales podrían recuperarse de la enfermedad y convertirse en portadores asintomáticos. El diagnóstico, la detección y el monitoreo de AHPND implica típicamente el sacrificio de individuos para obtener muestras de tejido de hepatopancreas, un procedimiento que es indeseable para su uso con reproductores de alto valor.

La prueba de diagnóstico que desarrollamos y describimos aquí para AHPND no requiere sacrificar el camarón, especialmente los sobrevivientes asintomáticos de valiosas poblaciones de reproductores. La prueba implica el análisis por PCR de un cultivo de caldo enriquecido de bacterias de muestras fecales. Un caldo enriquecido se puede utilizar para detectar AHPND-*V. parahaemolyticus* en heces de animales moribundos y asintomáticos.

Estos hallazgos son de inter3s para los productores de camarones en relaci3n con el desarrollo de estrategias para el manejo de esta seria enfermedad AHPND, y resultar3 muy 3til en el diagn3stico y el monitoreo de AHPND en las poblaciones de camar3n cultivado.

Authors



JEE EUN HAN, D.V.M. PH.D.

*Autor para correspondencia

CJ CheilJedang Feed & Livestock Research Institute, Korea

School of Animal and Comparative Biomedical Sciences

University of Arizona

Hanje1223@gmail.com (<mailto:Hanje1223@gmail.com>).



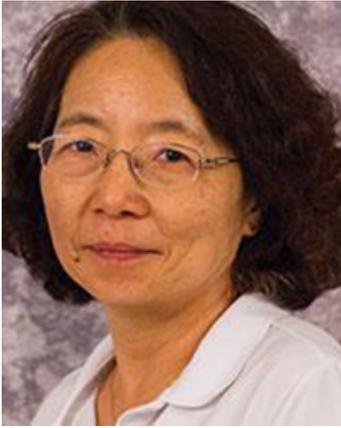
PATHARAPOL PIAMSOMBOON, D.V.M. PH.D.

Veterinary Science

Prince of Songkhla University

Songkhla, Thailand

patharapol.p@outlook.com (<mailto:patharapol.p@outlook.com>).



KATHY F.J. TANG, PH.D.

School of Animal and Comparative Biomedical Sciences

University of Arizona

Tucson, AZ 85721 USA

fengjyu@email.arizona.edu (<mailto:fengjyu@email.arizona.edu>).

Copyright © 2016–2019
Global Aquaculture Alliance