

## Distribución de la bacteria causante de la necrosis hepatopancreática (NHPB) en cultivos de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, en México

### Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico

JC Ibarra-Gómez<sup>1</sup>, L Galavíz-Silva<sup>2</sup>, ZJ Molina-Garza<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Sanidad Acuícola, Dirección de Recursos Naturales, Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora, México, CP 85000. \* E-mail: jibarra@itson.mx

<sup>2</sup> Centro Nacional de Sanidad Acuícola, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, 66451, México.

#### Resumen

Se realizó el primer monitoreo sistemático en granjas camaronícolas de Sinaloa y Sonora (México) para el diagnóstico presuntivo y confirmativo de la necrosis hepatopancreática (NHP), el primero por microscopía de luz (análisis en fresco y cortes histológicos con hematoxilina y eosina) y el segundo mediante el aislamiento de la bacteria en gradientes de Percoll, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y tinciones negativas al microscopio electrónico de transmisión (MET). Al microscopio óptico, los hepatopáncreas presentaron atrofia, estrangulamientos y necrosis en túbulos, con infecciones agudas por colonias bacterianas en el citoplasma del epitelio tubular, infiltración hemocítica y melanización. Mediante la PCR, los cebadores f 27 y r 235, dirigidos a una región específica del 16S rDNA, amplificaron un segmento de 209 pb en las extracciones de DNA de las muestras analizadas. Al MET se observó la presencia de bacterias pleomórficas, la mayoría ovoides o cilíndricas, de 0.2 µm de ancho y 0.6–0.9 µm de longitud, y con menor frecuencia la de formas helicoidales, con siete a doce giros o torciones, de 0.23 µm de ancho por 2.43–5.27 µm de longitud. Las herramientas de diagnóstico tradicional y molecular permitieron identificar con certeza al agente causal de epizootias como la causada por la bacteria NHPB en la región. Se describe también su prevalencia y distribución geográfica, además de descartar, mediante la PCR y los análisis microbiológicos, otros agentes etiológicos como el virus del síndrome de mancha blanca, el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, el parvovirus hepatopancreático y la vibriosis.

*Palabras clave:* *Litopenaeus vannamei*, necrosis hepatopancreática, hibridación *in situ*, PCR, MET

#### Abstract

This paper describes the first systematic monitoring conducted in 2002 at shrimp farms in Sinaloa and Sonora (Mexico) for the presumptive and confirmative diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in *Litopenaeus vannamei*. Light microscopy (wet mounts and hematoxylin-eosin-stained sections of hepatopancreas) showed atrophy of the hepatopancreas, strangulation and necrosis of the hepatopancreatic tubules, with masses of NHPB within the tubular epithelium, hemocytic infiltrates and tubular melanization. The gene encoding the 16S rRNA (16S rDNA) of NHPB was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from clinical specimens and the bacteria isolated using Percoll density gradient centrifugation. Negative-stain transmission electron microscopy revealed pleomorphic bacteria, most of them ovoid or rod-shaped (0.2 µm wide and 0.6–0.9 µm long), and a helical form demonstrating seven to twelve spiral turns (0.23 µm wide and 2.43–5.27 µm long). Several severe epizootics of commercially grown *L. vannamei* occurred during the study period and the mortality was attributed to NHPB infection. Using PCR and microbiological analyses, other etiologic agents, such as white spot syndrome virus, infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, hepatopancreatic parvovirus and vibriosis, were ruled out as contributory factors.

*Key words:* *Litopenaeus vannamei*, necrotizing hepatopancreatitis, *in situ* hybridization, PCR, MET

#### Introducción

En México, el cultivo de camarón es una industria muy importante ya que genera empleos en zonas no productivas para la agricultura. Actualmente existen 482 granjas con un área estimada en 41,750 ha y una producción de 78,000 TM por año. La mayoría de las granjas se concentran en los estados de Sonora y Sinaloa (Gutiérrez-Venegas 2005).

#### Introduction

Shrimp farming is an important aquacultural industry in Mexico, generating employment in areas not suitable for agriculture. Current data indicate that there are 482 farms in an estimated area of 41,750 ha and an annual production of 78,000 MT. Most farms are found in the northwestern states of Sonora and Sinaloa (Gutiérrez-Venegas 2005).

La bacteria causante de la necrosis hepatopancreática (NHPB) tiene una distribución geográfica documentada en los Estados Unidos de América, Perú, Ecuador, Venezuela, Brasil, Panamá, Costa Rica y Colombia (Lightner 1996, Briñez *et al.* 2003); afecta al camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, la especie de mayor importancia económica en América. La NHPB fue descrita por primera vez en Texas (EUA) en 1985 (Johnson 1990), donde provocó un impacto severo en la producción de camarón cultivado, con mortalidades que oscilaron del 20% al 90% (Loy *et al.* 1996a, b).

Como los signos clínicos no son específicos, el diagnóstico presuntivo de la necrosis hepatopancreática (NHP) se basa en el examen en fresco del tejido del hepatopáncreas, donde se observa una reducción o ausencia de vacuolas lipídicas en el epitelio, túbulos melanizados y tejido atrofiado (Lightner 1996). Para el diagnóstico confirmativo se requiere del uso de sondas moleculares y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo cual es posible en laboratorios convencionales. En este estudio ambas técnicas fueron complementadas con la microscopía electrónica de transmisión y ultracentrifugación para verificar la presencia de las formas helicoidales y bacilares de la rickettsia y comprobar que se trata del mismo patógeno.

La etiología de la NHP, según estudios histopatológicos y ultraestructurales, corresponde a bacterias intracelulares, Gram negativas, pleomórficas, similares a rickettsias, que residen y se multiplican en células epiteliales del hepatopáncreas (Krol *et al.* 1991, Lightner *et al.* 1992, Loy *et al.* 1996a, b). Asimismo, los estudios moleculares basados en el análisis de la secuencia del 16S rDNA, identificaron al agente etiológico como un miembro de la subclase  $\alpha$  de las proteobacterias. Además, con base en la secuencia del mismo gen, particularmente de las regiones variables V5, V8 y V9, se diseñó un par de cebadores con fines de diagnóstico basados en la PCR, y se confirmó la identificación del mismo agente causal en lesiones hepatopancreáticas de *L. vannamei* cultivado en Texas y Perú (Loy y Frelier 1996, Loy *et al.* 1996a, b).

Un microorganismo rickettsial aún sin clasificar, pero diferente al agente etiológico de la NHP, se reportó en un solo caso de *L. vannamei* cultivado en México (Lightner 1996). Asimismo, otros casos recientes de bacterias similares a rickettsias, llamadas RLB (*rickettsia-like bacterium*) han sido identificados en cultivos de *Penaeus monodon* cultivado en Madagascar, donde han causado severas mortalidades desde 1999. El análisis por PCR e hibridación *in situ* de la región 16S RNA, permitió diferenciar las RLB de NHPB (Nunan *et al.* 2003).

Por lo anterior, se realizó un estudio sistemático para identificar y determinar la distribución y el impacto del agente causal de la NHP en *L. vannamei* de cultivos mexicanos de los estados de Sonora y Sinaloa.

The necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) has been documented for the United States, Costa Rica, Panama, Colombia, Venezuela, Ecuador, Peru and Brazil (Lightner 1996, Briñez *et al.* 2003). It affects the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, the most important commercial species of the American continent, and was first observed in Texas (USA) in 1985 (Johnson 1990), where it caused mortalities of 20–90% and severely damaged the shrimp culture industry (Loy *et al.* 1996a, b).

As the clinical signs are not specific, the presumptive diagnosis is based on the examination of wet mounts of hepatopancreatic tissue to determine atrophy, the reduction or absence of lipid vacuoles in the epithelium and tubule melanization (Lightner 1996). The confirmatory diagnosis requires the use of molecular probes and polymerase chain reaction (PCR), which is possible in conventional laboratories. In this study, both techniques were complemented by transmission electron microscopy and ultracentrifugation to verify the presence of the helical and bacillary forms of the bacterium and confirm that they corresponded to the same pathogen.

The etiology of necrotizing hepatopancreatitis (NHP), according to histopathological and ultrastructural studies, corresponds to intracellular, Gram-negative, pleomorphic bacteria, similar to the rickettsiae, which reside and multiply in the epithelial cells of the hepatopancreas (Krol *et al.* 1991, Lightner *et al.* 1992, Loy *et al.* 1996a, b). Molecular studies, based on 16S rDNA sequence analysis, identified the etiologic agent as a member of the  $\alpha$  subclass of the Proteobacteria. Moreover, based on the sequence of the same gene, particularly of the variable regions V5, V8 and V9, a pair of primers was designed for diagnostic purposes using PCR and this causative agent was identified in hepatopancreatic lesions of cultured *L. vannamei* from Texas and Peru (Loy and Frelier 1996, Loy *et al.* 1996a, b).

One unclassified rickettsial microorganism, but different from NHPB, was reported in a single case of *L. vannamei* cultured in Mexico (Lightner 1996). Rickettsia-like bacteria (RLB) have also been identified in cultured *Penaeus monodon* from Madagascar, where they have caused severe mortalities since 1999. *In situ* hybridization and PCR analyses of the 16S RNA region allowed the differentiation of RLB and NHPB (Nunan *et al.* 2003).

This study was conducted to identify and determine the distribution and impact of the causative agent of NHP in cultured *L. vannamei* from Sonora and Sinaloa (Mexico).

## Material and methods

### Shrimp

A total of 649 samples (10 shrimp per sample unit) from 9 farms in Sonora (table 1) and 144 samples from 42 farms in

## Materiales y métodos

### Camarones

Se analizaron un total de 649 muestras (la unidad de muestra fue de 10 camarones) de 9 granjas de Sonora (tabla 1) y 144 muestras de 42 granjas de Sinaloa (tabla 2), durante los ciclos de cultivo de 2002. Se registraron lecturas de salinidad ( $\text{g L}^{-1}$ ) y temperatura del agua, para determinar el grado de asociación con la NHPB. Los organismos moribundos o con signos macroscópicos indicativos de NHP fueron transportados al laboratorio donde se les realizó un análisis cuantitativo para *Vibrio* en TCBS (Gómez Gil *et al.* 1998) y análisis en fresco al microscopio de luz (ML). Una parte de las muestras de hepatopáncreas se preservaron etiquetadas en nitrógeno líquido.

### Análisis en fresco

La identificación preliminar de la NHPB se realizó en especímenes con hepatopáncreas atrofiado, túbulos hepatopaneáticos con disminución o ausencia de vacuolas lipídicas, estrangulamiento o necrosis de los túbulos hepatopaneáticos y tiempo de coagulación para diferenciar las infecciones por *Vibrio* de las ocasionadas por NHPB (Lightner 1996).

### Histopatología

Las muestras seleccionadas se fijaron inmediatamente en fijador AFA de Davidson para el examen histopatológico de acuerdo a los procedimientos de Bell y Lightner (1988).

### Diagnóstico confirmativo por PCR

En los hepatopáncreas con atrofia, el diagnóstico molecular se realizó con la extracción del DNA total de estos órganos con el kit de preparación de placas PCR de alta pureza (High Pure PCR Template Preparation Kit) de Roche Diagnostic, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El PCR fue verificado con el par de cebadores internos 143F y 145R, que amplifica un producto de 848 pb del gen 18S rDNA conservada en decápodos (Kim y Abele 1990). Las reacciones se realizaron con el kit PuReTaq Ready-To-Go PCR (Amersham Biosciences, Piscataway, Nueva Jersey, EUA), en mezclas de

Sinaloa (tabla 2) were analyzed during the culture cycles of 2002. Water temperature and salinity ( $\text{g L}^{-1}$ ) were recorded to determine the degree of association with NHPB. Moribund organisms or those showing macroscopic signs of NHP were transported to the laboratory, where they underwent a quantitative analysis of *Vibrio* species using TCBS (Gómez-Gil *et al.* 1998) and wet-mount analysis by light microscopy (LM). Some of the hepatopancreas samples were labeled and preserved in liquid nitrogen.

### Wet-mount analysis

The preliminary identification of NHPB was made in specimens showing atrophy of the hepatopancreas, hepatopancreatic tubules with reduced or no lipid vacuoles, strangulation, necrosis of the hepatopancreatic tubules and time of coagulation, in order to differentiate between the infections caused by *Vibrio* species and by NHPB (Lightner 1996).

### Histopathology

For the histopathological test, the samples selected were immediately fixed in Davidson's AFA fixative following the procedures described by Bell and Lightner (1988).

### Confirmatory diagnosis by PCR

In the atrophied hepatopancreas, the molecular diagnosis was conducted by the extraction of total DNA from the organ using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostic) as per the manufacturer's instructions. The PCR was verified by the pair of internal primers 143F and 145R, which amplifies a 848-bp product of the 18S rDNA gene of decapods (Kim and Abele 1990). The reactions were carried

**Tabla 2.** Granjas visitadas en Sinaloa y muestras de camarón analizadas de mayo a octubre de 2002.

**Table 2.** Shrimp farms surveyed in Sinaloa and number of shrimp samples analyzed from May to October 2002.

Zona	Provincia costera	Granjas	Muestras
Norte	Los Mochis	4	25
	Guasave	6	17
	Guamúchil	3	5
	Angostura	5	12
Centro	Cospita	4	12
	Elota	4	12
	El Dorado	8	25
	Navolato	5	28
Sur	Mazatlán	3	8
Total		42	144

**Tabla 1.** Granjas visitadas en Sonora y muestras de camarón analizadas de mayo a octubre de 2002.

**Table 1.** Farms surveyed in Sonora and number of shrimp samples analyzed from May to October 2002.

Zona	Provincia costera	Granjas	Muestras
Norte	San Ignacio Río Muerto	4	426
Centro	Cajeme	3	39
Sur	Huatabampo	2	184
Total		9	649

reacción de 25 µL, según las instrucciones del fabricante. En cada reacción se depositaron 0.5–2 µL del DNA purificado (10–100 ng), 0.5 mM de los cebadores F27 (5'-ACATGCAAGTCGAACGCAATAGG-3') y R235 (5'-ACAGATCATAAGGCTTGGT AGGCTG-3'), que amplifican una región específica del 16S rDNA de 209 pb de NHPB (Loy y Frelier 1996, GenBank número de acceso U65509). Los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen (Carlsbad, California, EUA). El programa de amplificación consistió de 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 58°C y 1 min a 72°C, con un ciclo adicional de 5 min a 72°C (Loy *et al.* 1996a, b). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, conteniendo 0.5 µg mL<sup>-1</sup> de bromuro de etidio en amortiguador TBE al 0.5× (Sambrook y Russell 2001). Se ejecutó una prueba adicional de PCR para la detección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), parvovirus hepatopancreático (HPV) y virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) con el kit PCR multiplex (Diagxotics Inc., Wilton, Connecticut, EUA). A los hepatopáncreas positivos a NHPB se les procesó para el aislamiento de la bacteria.

#### *Aislamiento de la bacteria NHPB*

Se depositaron 10 hepatopáncreas conservados en nitrógeno líquido en 5 mL de NaCl al 1.6% para homogeneizarlos mecánicamente (Polytron PT 1200, Suiza). El homogeneizado fue centrifugado a 325 g por 10 min en un rotor IEC 878. El sobrenadante fue recuperado para el proceso de purificación en gradiente de densidades en Percoll (Amersham Biosciences, Piscataway, Nueva Jersey, EUA) a una concentración final de 38.8% (33.8 mL de Percoll, 10 mL de NaCl 1.5 M, 56.2 mL de agua estéril) para centrifugar a 790 g por 2 h a 4°C (Frelier *et al.* 1993). Las bandas fueron centrifugadas nuevamente a 790 g por 20 min a 4°C y 14000 g por 15 min a 4°C (rotor IEC 875) en NaCl al 1.6% y los precipitados se conservaron en alícuotas a -70°C. De cada alícuota, se realizaron frotis para teñirlos con el colorante de Gram para verificar la presencia de bacterias en las bandas de Percoll (Loy *et al.* 1996a, b) y posteriormente analizarlas por PCR y microscopía electrónica de transmisión.

#### *Microscopía electrónica de transmisión (MET)*

Se fijaron alícuotas de los purificados bacterianos en glutaraldehído al 6% y posteriormente se depositaron en rejillas de cobre cubiertas con colodión y teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico (PTA) al 2% a pH 7 para examinarlo al MET (Lightner 1996).

#### **Resultados**

Al iniciar este estudio se esperaba que los agentes causales de los brotes epizooticos fueran bacterias del género *Vibrio*, sin

out using the PuReTaq Ready-To-Go PCR kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), in 25-µL mixtures, following the manufacturer's instructions. In each reaction we deposited 0.5–2 µL of purified DNA (10–100 ng), and 0.5 mM of the primers F27 (5'-ACATGCAAGTCGAACGCAATAGG-3') and R235 (5'-ACAGATCATAAGGCTTGGTAGGCTG-3'), which amplify a specific region of 16S rDNA (209 bp) of NHPB (Loy and Frelier 1996, GenBank accession number U65509). The primers were synthesized by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The amplification program consisted of 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 58°C and 1 min at 72°C, with an additional cycle of 5 min at 72°C (Loy *et al.* 1996a, b). The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis (1%), containing 0.5 µg mL<sup>-1</sup> of ethidium bromide in 0.5× TBE buffer (Sambrook and Russell 2001). An additional PCR test was run to detect white spot syndrome virus (WSSV), hepatopancreatic parvovirus (HPV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) using the Multiplex PCR Kit (Diagxotics Inc., Wilton, CT, USA). The hepatopancreases that tested NHPB-positive were processed to isolate the bacterium.

#### *Isolation of NHPB*

Ten of the hepatopancreases preserved in liquid nitrogen were deposited in 5 mL of NaCl 1.5% and homogenized mechanically (Polytron PT 1200, Switzerland). The homogenate was centrifuged at 325 g for 10 min in a rotor (IEC 878). The supernatant was removed for the purification process in Percoll density gradients (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) at a final concentration of 38.8% (33.8 mL of Percoll, 10 mL of 1.5 M NaCl, 56.2 mL of sterile water) to centrifuge at 790 g for 2 h at 4°C (Frelier *et al.* 1993). The bands were recentrifuged at 790 g for 20 min at 4°C and at 14,000 g for 15 min at 4°C (rotor IEC 875) in NaCl 1.6% and the precipitates were maintained in aliquots at -70°C. Smears were prepared from each aliquot for Gram-staining to verify the presence of bacteria in the Percoll bands (Loy *et al.* 1996a, b) and for subsequent PCR and transmission electron microscopy analysis.

#### *Transmission electron microscopy (TEM)*

One aliquot of the bacterial purificates was fixed in 6% glutaraldehyde and then placed in collodion-covered copper grids and negatively stained with phosphotungstic acid (PTA 2%) at pH 7 for examination in TEM (Lightner 1996).

#### **Results**

At the beginning of this study, the possible causative agents of the epizootics were presumed to be bacteria of the genus *Vibrio*, but they did not exceed the risk readings (5,200–

**Tabla 3.** Prevalencia de la bacteria causante de la hepatopancreatitis necrozante (NHPB) en granjas de camarón de Sonora y temperatura y salinidad medias.  
**Table 3.** Prevalence of the necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) at the Sonora shrimp farms and mean temperature and salinity ranges.

Zona	Provincia costera	Prevalencia (%)	Salinidad* (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura* (°C)
Norte	San Ignacio Río Muerto	59.5–86.2	43.9–45.5	30.7–31.5
Centro	Cajeme	28.5–48.7	42.0–45.5	28–31
Sur	Huatabampo	14.6	44.5	31.7

\* Rango de los promedios mínimos y máximos.

**Tabla 4.** Prevalencia de la bacteria causante de la hepatopancreatitis necrozante (NHPB) en granjas de camarón de Sinaloa y temperatura y salinidad medias.  
**Table 4.** Prevalence of the necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) at the Sinaloa shrimp farms and mean temperature and salinity ranges.

Zona	Provincia costera	Prevalencia (%)	Salinidad* (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura* (°C)
Norte	Los Mochis	12.5–14.5	36–40.5	28–31
	Guasave	8.5–12	35–39	29–30.7
	Guamúchil	8–12	38–41	28–30
	Angostura	8.5–12	38–41	29–31
Centro	Cospita	20–21.2	36–41	28–31
	Elota	8–10	36–41	29–31
	El Dorado	35–40	35–39+	29–31
	Navolato	30–42	37–40	29–31
Sur	Mazatlán	5–7	35–39	28–31

\* Rango de los promedios mínimos y máximos.

embargo éstas no sobrepasaron las lecturas de riesgo (5,200–95,000 UFC por gramo de hepatopáncreas). Además, los resultados por PCR fueron negativos para los virus hepatopancreáticos (HPV, MBV), IHHNV y WSSV.

En cambio, los resultados de este primer estudio sistemático realizado por ML (preparaciones en fresco e histopatológicas), MET y PCR, demostraron la amplificación del DNA de la rickettsia NHPB en las localidades de estudio.

La mayor prevalencia se ubicó en las granjas de San Ignacio Río Muerto (zona norte), con intervalos que oscilaron del 59.5% al 86.2%, coincidiendo los rangos de salinidad más elevada (43.9 a 45.5 g L<sup>-1</sup>), seguida por las granjas de la región de Cajeme con prevalencias de 28.5 a 48.7% y salinidad de 42 a 45.5 g L<sup>-1</sup>. En la zona sur de Huatabampo se observó la menor prevalencia (14.6%, tabla 3).

En Sinaloa, las prevalencias más altas se presentaron en la región central, en Navolato (30–42%) y Cospita (20–21.2%), con salinidades de 36 a 41 g L<sup>-1</sup>. Las menores prevalencias, el 5–7%, se presentaron en el la zona sur (tabla 4).

En los análisis al ML, los camarones cultivados en granjas de Sonora y Sinaloa presentaron atrofia del hepatopáncreas, estrangulamiento y necrosis en túbulos hepatopancreáticos (fig. 1a). Las colonias de bacterias en el citoplasma del epitelio tubular se observaron en infecciones agudas (fig. 1b, c), con focos de descamación de células epiteliales, infiltración hemocítica y melanización (fig. 1d).

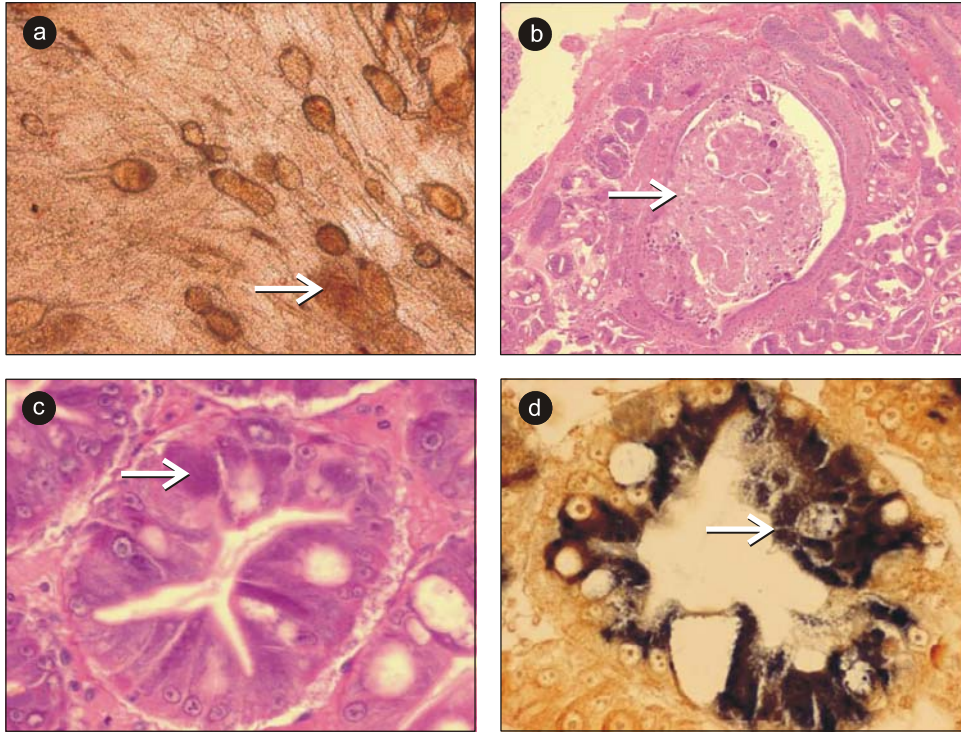
95,000 UFC per gram of hepatopancreas). Moreover, the PCR results were negative for hepatopancreatic viruses (HPV, MBV), IHHNV and WSSV.

In turn, the results of this first systematic monitoring by LM (wet-mount and histological preparations), TEM and PCR, showed amplification of the DNA of NHPB, a rickettsia-like pathogen, at the study sites.

In Sonora, the greatest prevalence of NHPB, 59.5–86.2%, and highest salinity, 43.9–45.5 g L<sup>-1</sup>, occurred at the San Ignacio Río Muerto farms, in the northern part of the state, followed by the farms in the central region of Cajeme, with a prevalence of 28.5–48.7% and salinity of 42–45.5 g L<sup>-1</sup>. The lowest prevalence, 14.6%, was recorded in Huatabampo, in the southern part (table 3).

In Sinaloa, the largest prevalence ranges occurred in Navolato, 30–42%, and Cospita, 20–21.2%, both in the central part, with a salinity of 36–41 g L<sup>-1</sup>. The lowest prevalence, 5–7%, was found in the southern part (table 4).

The LM analysis revealed that the shrimp from the Sonora and Sinaloa farms showed atrophy of the hepatopancreas, strangulation and necrosis of the hepatopancreatic tubules (fig. 1a). The bacterial colonies in the cytoplasm of the tubular epithelium showed acute infection (fig. 1b, c), with spots of desquamation of epithelial cells, hemocytic infiltration and melanization (fig. 1d).



**Figura 1.** Bacteria causante de la hepatopancreatitis necrozante (NHPB) en *Litopenaeus vannamei*. (a) Montaje en fresco: túbulos hepatopancreáticos necrozados y con estrangulamiento, con escasas vacuolas lipídicas; 10×. (b) Hepatopáncreas con gran cantidad de túbulos necrosados, con granulomas debido a la infección de NHPB; H&E, 100×. (c) Nódulos hepatopancreáticos con infiltración hemocítica y melanización; H&E, 600×. (d) Túbulos hepatopancreáticos dispersos con signos de lesiones multifocales positivos a NHPB; IHS, 600×.

**Figure 1.** Necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in *Litopenaeus vannamei*. (a) Wet mount showing necrosis of the hepatopancreatic tubules, strangulation and few lipid vacuoles; 10×. (b) Hepatopancreas with a large number of necrotized tubules and granulomas due to NHPB infection; H&E, 100×. (c) Hepatopancreatic nodules showing hemocytic infiltration and melanization; H&E, 600×. (d) Scattered hepatopancreatic tubules with signs of NHPB-positive multifocal lesions; IHS, 600×.

Los análisis de PCR revelaron la presencia de productos que coincidieron con el tamaño esperado para la NHPB. La secuencia de los amplicones está constituida por 209 pb:

```
3'-ACAGATCATAGGCTTGGTAGGCTGTTACCCACCAACGACCTAATCTGGCACGGGCTCCTCTCTAGGCGATAAA
TCTTTGATGTTTGACATATTATAAGGTATTACCTACAGTTTCCCGTAGCTATTCTTACCTAGAGGTAGATTCCCGTGTAT
TACTACCCGTCTGCCACTCAATAGGCGAACCTATTGCGTTGCACTTGCATGT-5'
```

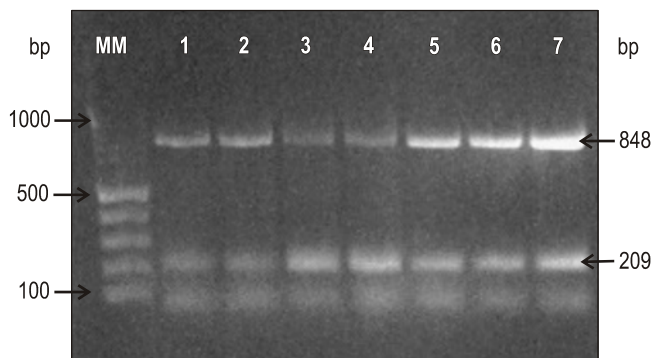
En la figura 2 se observa una muestra de los productos amplificados en las reacciones de PCR representativos de Sinaloa y Sonora, junto con los productos de 848 pb correspondientes a una región amplificada de la subunidad ribosomal 18R de camarón, anteriormente descritos.

Las bandas de Percoll de las 12 localidades muestreadas, mediante la tinción negativa al MET, demostraron la presencia de bacterias pleomórficas, la mayoría ovoides y cilíndricas de 0.2 µm de diámetro por 0.6 a 0.9 µm de longitud. Con menor frecuencia se presentaron formas helicoidales con siete a doce giros o torsiones (fig. 3) que midieron 0.23 µm de ancho y de 2.43 a 5.27 µm de largo. Los acercamientos al MET de las preparaciones con tinción negativa permitieron apreciar hasta

The PCR analysis showed the presence of products that coincided with the size expected for NHPB. The sequence of the amplicons is formed by 209 bp:

A sample of the amplified products in the PCR reactions, representative of Sinaloa and Sonora, is shown in figure 2, together with the 848-bp products corresponding to an amplified region of the shrimp 18R ribosomal subunit (previously described).

Negative-stain TEM showed the presence of pleomorphic bacteria, most of them ovoid or cylindrical, measuring 0.2 µm in diameter and 0.6–0.9 µm in length, in the Percoll bands of the 12 sites sampled in Sonora and Sinaloa. Helical forms with seven to twelve spiral turns, measuring 0.23 µm in width and 2.43–5.27 µm in length, occurred with less frequency (fig. 3). The TEM close-ups of the negative-stain preparations revealed up to eight flagella at the basal end of the bacterium and helical spirals (fig. 4a–c).



**Figura 2.** Bacteria causante de la hepatopancreatitis necrozante (NHPB) en *Litopenaeus vannamei*. Análisis de los productos de la reacción polimerasa en cadena (PCR) para NHPB con los cebadores F27 y R235 de 209 pb. MM: marcador 100 bp DNA Ladder. (1) control positivo, (2–4) muestras de camarón cultivado en San Ignacio Río Muerto, Cajeme y Huatabampo, Sonora; (5–7) muestras de camarón infectado con NHPB de Los Mochis, Cospita y Navolato, Sinaloa. Productos amplificados de la subunidad 18S RNA de camarón a 848 pb.

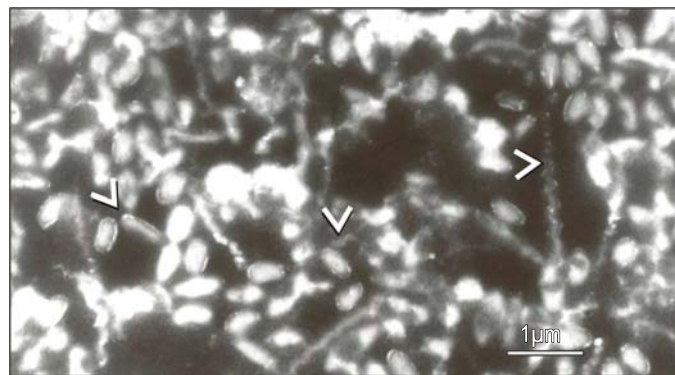
**Figure 2.** Necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in *Litopenaeus vannamei*. Analysis of the polymerase chain reaction (PCR) products for NHPB using the primers F27 and R235 of 209 bp. MM: marker 100 bp DNA Ladder. (1) positive control, (2–4) cultured shrimp samples from San Ignacio Río Muerto, Cajeme and Huatabampo (Sonora); (5–7) NHPB-infected shrimp samples from Los Mochis, Cospita and Navolato (Sinaloa). Amplified products of the shrimp 18S RNA subunit at 848 bp.

ocho flagelos en el extremo basal de la bacteria y torsiones en hélice (fig. 4a–c).

El análisis de las bandas de Percoll por PCR mostró la amplificación de los productos de 209 pb en las 12 localidades de estudio de Sonora y Sinaloa, confirmándose los resultados previamente observados, pero sin la presencia de los productos de PCR correspondientes al DNA de camarón (fig. 5), el cual fue eliminado en los procesos de ultracentrifugación con Percoll.

## Discusión

Las infecciones causadas por organismos rickettsiales o similares en camarón silvestre o cultivado *P. marginatus* y *P.*



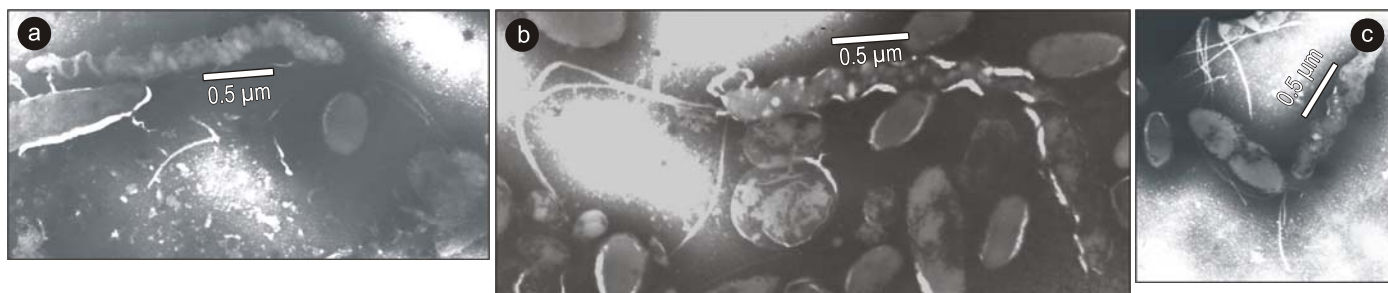
**Figura 3.** Bacteria causante de la hepatopancreatitis necrozante (NHPB) aislada en gradientes por ultracentrifugación diferencial en Percoll. El agente etiológico es pleomórfico, con estadios helicoidales (flecha mayor) y ovoides o cilíndricos (flechas menores). Tinción negativa con PTA al 2%. 20,000×.

**Figure 3.** Necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) isolated using Percoll density gradient centrifugation. The etiologic agent is pleomorphic, showing helical (larger arrow) and ovoid or cylindrical (smaller arrows) forms. Negative staining with 2% PTA. 20,000×.

The PCR analysis of the Percoll bands showed the amplification of the 209-bp products for the 12 sampling sites, confirming the results previously observed, but without the presence of the PCR products corresponding to shrimp DNA (fig. 5), which was eliminated in the Percoll ultracentrifugation processes.

## Discussion

Experimental infections in *Litopenaeus stylirostris* and infections caused by rickettsial or similar organisms in wild or cultured shrimp *Penaeus marginatus* and *P. merguensis* from Singapore and Malaysia have been described since 1985 (Lightner *et al.* 1985, Brock *et al.* 1986). Severe pathologies or epizootics associated specifically with NHPB have been documented for the United States and Central and South America since 1985 until recent years (Johnson 1990, Lightner 1996, Loy and Freliey 1996, Loy *et al.* 1996a, b, Briñez *et al.* 2003),



**Figura 4.** Bacteria causante de la hepatopancreatitis necrozante (NHPB) en *Litopenaeus vannamei* de Sonora y Sinaloa. La tinción negativa con PTA al 2% permite apreciar hasta ocho flagelos en el extremo basal en las formas helicoidales de la bacteria aislada por ultracentrifugación diferencial en Percoll.

**Figure 4.** Necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) of *Litopenaeus vannamei* from Sonora and Sinaloa. Negative staining with 2% PTA revealed up to eight flagella at the basal end of the helical forms of the bacterium isolated using Percoll density gradient centrifugation.

*merguiensis*, así como infecciones experimentales en *L. stylirostris*, han sido descritas desde 1985 en Singapur y Malasia (Lightner *et al.* 1985, Brock *et al.* 1986). Sin embargo, las patologías severas o epizootias asociadas específicamente a la RLB NHPB, se encuentran documentadas en Estados Unidos de América, Centro y Sudamérica desde 1985 hasta años recientes (Johnson 1990, Lightner 1996, Loy y Frelier 1996, Loy *et al.* 1996a, b, Briñez *et al.* 2003), con excepción de las granjas camaronícolas localizadas en México, donde sólo se menciona la presencia de organismos similares a las rickettsias (Lightner 1996).

Por medio de la ML, en los análisis en fresco y las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina se apreció la patología propia de la NHP y la presencia de colonias de bacterias Gram negativas, cuyas características han sido descritas por Frelier *et al.* (1992, 1993) y Loy y Frelier (1996). Al MET se demuestra su similitud con las que han sido reportadas para el agente causal de la NHP en Texas, con formas cilíndricas predominantes que coinciden con la morfometría reportada para microorganismos similares a rickettsias en *L. vannamei* cultivados en Texas, donde Krol *et al.* (1991) y Lightner *et al.* (1992) las describen como formas primarias. Las formas intermediarias no se observaron al MET, siendo difícil su identificación dado que se analizaron sólo tinciones negativas. La forma helicoidal (terminal) presentó un máximo de ocho flagelos en el extremo basal de la bacteria en los acercamientos realizados al MET y coincide en morfometría a la descrita por Lightner *et al.* (1992).

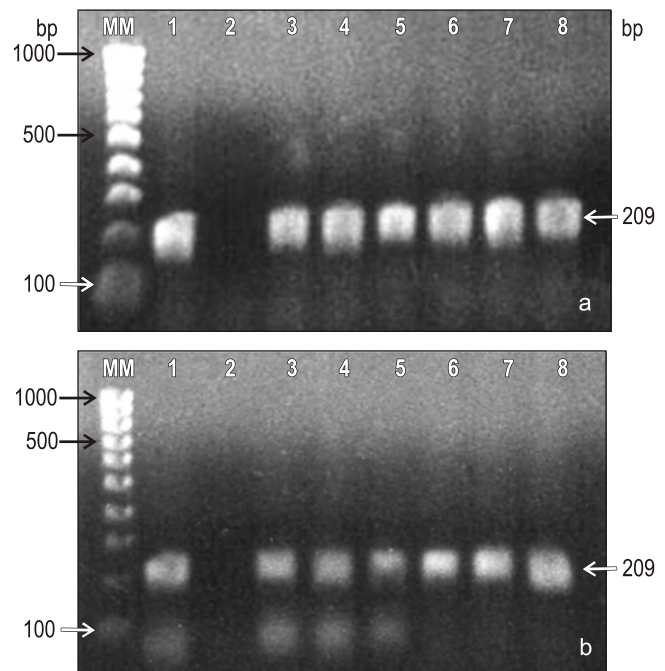
La secuencia de los productos de la PCR obtenidos en las ampliaciones de los aislados bacterianos de Sonora y Sinaloa, aunada a las observaciones ultraestructurales y al ML, indican como único agente etiológico a NHPB, la cual está distribuida extensamente en las granjas camaroneras del Pacífico mexicano y no se asoció a infecciones por WSSV, IHNV y HPV.

Las salinidades en las áreas de estudio fueron muy elevadas, con un mínimo de 42 g L<sup>-1</sup> en Sonora y de 35 g L<sup>-1</sup> en Sinaloa, y asociadas a temperaturas mayores a los 28°C. Al respecto se ha reportado en Texas (EUA), Perú, Venezuela, Ecuador, Costa Rica y Panamá, que la temperatura y salinidad son factores ambientales que juegan un papel muy importante en el desarrollo de la necrosis del hepatopáncreas provocado por NHPB, donde los periodos muy prolongados de temperaturas elevadas (>29–30°C), aunados a altas salinidades (20–40 g L<sup>-1</sup>), precedieron el desarrollo de epizootias por NHPB de 1993 a 1995 (Lightner 1996).

Lo anterior indica que es necesario implementar programas de monitoreos sanitarios desde el inicio de la siembra, aunados a diagnósticos confirmatorios por PCR (Loy *et al.* 1996a, b, Briñez *et al.* 2003), antes de iniciar con la aplicación de tratamientos con antibióticos u otras medidas de manejo recomendadas para enfermedades bacterianas, pues esta patología puede pasar desapercibida por días y repentinamente convertirse en un evento fuera de control. En resumen, la aplicación de ML, MET y PCR aunado a la técnica de ultracentrifugación en Percoll, permitió identificar al agente causal de la NHP en

but not in Mexico, where only the presence of rickettsial-like organisms has been reported (Lightner 1996).

The LM analysis of wet mounts and hematoxylin-eosin-stained preparations of hepatopancreas samples of cultured *L. vannamei* from Sonora and Sinaloa revealed the pathology associated with NHP and the presence of Gram-negative bacteria, whose characteristics have been described by Frelier *et al.* (1992, 1993) and Loy and Frelier (1996). The TEM analysis showed the similarity with the causative agent of NHP in Texas, the predominantly cylindrical forms coinciding with the morphometry reported for RLB in cultured *L. vannamei* from Texas, which were described as primary forms by Krol *et al.* (1991) and Lightner *et al.* (1992). The intermediate forms were not observed by TEM, their identification proving difficult because only negative stains were analyzed. The helical form (terminal) showed a maximum of eight flagella at the basal end of the bacterium in the TEM close-ups, the morphometry coinciding with that described by Lightner *et al.* (1992).



**Figura 5.** Amplificación de la bacteria causante de la hepatopancreatitis necrozante (NHPB) por PCR de epizootias de *Litopenaeus vannamei* en gel de agarosa al 1%. (a) MM: marcador 100 bp DNA Ladder; (1) control positivo; (2) control negativo; (3–5) bandas de Percoll de las muestras procedentes de San Ignacio Río Muerto, Cajeme y Huatabampo, Sonora; (6–8) bandas de Percoll de las muestras de camarón procedentes de Los Mochis, Cospita y Guasave, Sinaloa. (b) MM: marcador 100 bp DNA Ladder; (1) control positivo; (2) control negativo; (3–8) Elota, El Dorado, Guamúchil, Navolato, Mazatlán y Angostura, Sinaloa.

**Figure 5.** Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) epizootics of *Litopenaeus vannamei* in 1% agarose gel. (a) MM: marker 100 bp DNA Ladder; (1) positive control; (2) negative control; (3–5) Percoll bands of the samples from San Ignacio Río Muerto, Cajeme and Huatabampo (Sonora); (6–8) Percoll bands of the samples from Los Mochis, Cospita and Guasave (Sinaloa). (b) MM: marker 100 bp DNA Ladder; (1) positive control; (2) negative control; (3–8) Elota, El Dorado, Guamúchil, Navolato, Mazatlán and Angostura (Sinaloa).



México y conocer su distribución e impacto en los cultivos mexicanos.

### Agradecimientos

A CL Badillo e I Cárdenas-Vallarta del ITSON por el apoyo en los procesos de análisis de muestras. A JC Martínez-Alvarez por el apoyo técnico en Acuadiag, Culiacán. A J Piñero-López de la Unidad de Microscopía Electrónica de la FCB y a E Ramírez-Bon del Hospital Universitario, de la UANL, por su apoyo para la realización de la microscopía electrónica de transmisión.

### Referencias

- Bell TA, Lightner DV. 1988. A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Briñez B, Aranguren F, Salazar M. 2003. Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHPB) in *Penaeus vannamei* broodstocks. *Dis. Aquat. Org.* 55: 69–72.
- Brock JA, Nakagawa LK, Hayashi T, Teruya S, VanCampen H. 1986. Hepatopancreatic rickettsial infection of the penaeid shrimp *Penaeus marginatus* (Randall) from Hawaii. *J. Fish Dis.* 9: 73–77.
- Frelier FP, Sis RF, Bell TA, Lewis DH. 1992. Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Vet. Pathol.* 29: 269–277.
- Frelier FP, Loy KJ, Kruppenbach B. 1993. Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.* 61: 44–48.
- Gomez-Gil BL, Tron-Mayen JF, Turnbull V, Inglis AL, Guerra-Flores. 1998. Species of *Vibrio* spp. isolated from hepatopancreas, hemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163: 1–9.
- Gutiérrez-Venegas JL. 2005. La industria del cultivo de camarón en México, su historia, presente y proyección al futuro. *Industria Acuicola* 1: 6–22.
- Johnson SK. 1990. Digestive gland manifestation. In: Johnson SK (ed.), *Handbook of Shrimp Diseases*. Sea Grant Publication No. TAMU-SG-90-601, Texas A&M University, Galveston.
- Kim W, Abele LG. 1990. Molecular phylogeny of selected decapod crustaceans based on 18S rRNA nucleotide sequences. *J. Crust. Biol.* 10: 1–13.
- Krol RM, Hawkins WE, Overstreet RM. 1991. Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Invertebr. Pathol.* 57: 362–370.
- Lightner DV. 1996. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Lightner DV, Redman RM, Williams, Mohney RR, Clerx LL, Bell TA, Brock JA. 1985. Recent advances in penaeid virus disease investigations. *J. World Maricult.* 16: 267–274.
- Lightner DV, Redman RM, Bonami JR. 1992. Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Dis. Aquat. Org.* 13: 235–239.
- Loy JK, Frelier PF. 1996. Specific, nonradioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by *in situ* hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 324–331.
- The sequence of the PCR products, obtained by amplifications of bacterial isolates from Sonora and Sinaloa, as well as the ultrastructural and LM observations indicate that the only etiologic agent of the infections is NHPB, which is widely distributed in shrimp farms of the Mexican Pacific, ruling out WSSV, IHNV and HPV.
- Salinity in the study area was very high (minimum of 42 g L<sup>-1</sup> in Sonora and of 35 g L<sup>-1</sup> in Sinaloa), associated with temperatures higher than 28°C. These two environmental factors have been associated with the development of hepatopancreatic lesions caused by NHPB in Texas (USA), Peru, Venezuela, Ecuador, Costa Rica and Panama, where prolonged periods of high temperatures (>29–30°C) and salinities (20–40 g L<sup>-1</sup>) preceded the occurrence of epizootics by this pathogen from 1993 to 1995 (Lightner 1996).
- Monitoring programs for NHPB should therefore be implemented since the seeding process and confirmed by PCR analysis (Loy *et al.* 1996a, b, Briñez *et al.* 2003), before initiating treatments using antibiotics or other measures recommended for bacterial infections, since this disease can go unnoticed for days and suddenly become rampant. In summary, based on LM, TEM and PCR, together with Percoll density gradient centrifugation, it was possible to identify the causative agent of NHP in Mexico and determine its distribution and impact on cultured shrimp.

### Acknowledgements

We thank CL Badillo and I Cárdenas-Vallarta (ITSON) for their help in processing the samples; JC Martínez-Álvarez for technical support at Acuadiag, Culiacán; and J Piñero-López (Electronic Microscope Unit, FCB, UANL) and E Ramírez-Bon (University Hospital, UANL) for their help with TEM.

English translation by Christine Harris.

- Loy JK, Frelier P, Varner P, Templeton JW. 1996a. Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.* 25: 117–122.
- Loy JK, Dewhirst EF, Weber W, Frelier PF, Garbar LT, Tasca IS, Templeton JW. 1996b. Molecular phylogen and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3439–3445.
- Nunan ML, Poulos B, Redman R, Groumellec LM, Lightner DV. 2003. Molecular detection methods developed for a systemic rickettsia-like bacterium (RLB) in *Penaeus monodon* (Decapoda: Crustacea). *Dis. Aquatic Org.* 53: 15–23.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

*Recibido en mayo de 2006;  
aceptado en noviembre de 2006*