

## CAPÍTULO 2.2.4.

# HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE

---

## 1. **Ámbito de aplicación**

La hepatopancreatitis necrotizante (HPN) está causada por una infección con una alfa-proteobacteria intracelular pleomórfica gramnegativa (Frelie *et al.*, 1992; Lightner y Redman, 1994; Lightner *et al.*, 1992; Loy *et al.*, 1996a; 1996b). Las principales especies hospedadoras en las que la hepatobacteria necrotizante (BHPN) puede causar brotes importantes de la enfermedad y mortalidades son *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris* (Del Río-Rodríguez *et al.*, 2006; Frelie *et al.*, 1993; Ibarra-Gámez *et al.*, 2007; Lightner y Redman, 1994; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011a).

La HPN tiene cuatro fases bien diferenciadas: la inicial, la aguda, la de transición y la crónica. En la enfermedad en fase aguda y de transición, es característico observar lesiones patognomónicas en cortes histológicos del hepatopáncreas, mientras que en las fases inicial y crónica de la enfermedad no hay lesiones patognomónicas y para diagnosticarla son necesarios métodos moleculares y basados en anticuerpos, con el fin de detectar la BHPN (Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; 2011b; Vincent y Lotz, 2005).

*Sinónimos*: hepatobacteria necrotizante (HBN) o bacteria de la HPN (BHPN); microorganismo tipo rickettsia (RLO).

## 2. **Información sobre la enfermedad**

### 2.1. **Factores del agente**

#### 2.1.1. **Agente patógeno, cepas del agente**

La BHPN es una bacteria intracitoplasmática gramnegativa pleomórfica que pertenece a la  $\alpha$ -subclase de las proteobacterias y que todavía no está clasificada (Frelie *et al.*, 1992; Lightner y Redman, 1994; Loy *et al.*, 1996a; 1996b). La forma predominante es un microorganismo tipo rickettsia baciliforme ( $0,25 \times 0,9 \mu\text{m}$ ), mientras que la forma helicoidal ( $0,25 \times 2-3,5 \mu\text{m}$ ) posee ocho flagelos en el vértice basal (Frelie *et al.*, 1992; Lightner y Redman, 1994; Loy *et al.*, 1996a; 1996b). El análisis genético de las BHPN asociadas a brotes de HPN en Norteamérica y Sudamérica sugiere que las cepas aisladas son idénticas o bien se trata de subespecies que están muy estrechamente relacionadas (Loy *et al.*, 1996a; 1996b).

#### 2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

No se dispone de datos.

#### 2.1.3. **Estabilidad del agente**

Los tejidos infectados por BHPN permanecen infecciosos tras repetidos ciclos de congelación-descongelación después de un almacenaje en glicerina al 50%. Se ha observado que la BHPN congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-70^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  conserva infectividad en pruebas de transmisión experimental con *Penaeus vannamei* (Crabtree *et al.*, 2006; Frelie *et al.*, 1992).

#### 2.1.4. **Ciclo de vida**

No aplicable.

### 2.2. **Factores del hospedador**

#### 2.2.1. **Especies hospedadoras susceptibles**

La mayoría de especies de peneidos pueden resultar infectadas con la BHPN, incluidas las principales especies de piscifactoría en Latinoamérica, *P. vannamei* (camarón juvenil) y *P. stylirostris* (camarón azul).

Las infecciones por BHPN son más graves en *P. vannamei*, en cuya especie la bacteria intracelular puede causar epizootias agudas y mortalidad masiva (>90%). En *P. vannamei*, los estadios de vida

juvenil, subadulto y reproductor son los más gravemente afectados (Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010).

BHPN causa enfermedad crónica en *P. vannamei*, y los principales efectos son un crecimiento lento, una cutícula blanda y un cuerpo flácido (Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b).

Se han notificado brotes de HPN en *P. aztecus* (Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010). También se ha observado HPN en *P. californiensis* y en *P. setiferus* (Frelieir *et al.*, 1995; Lightner, 1996). Por otra parte, se sabe que *Penaeus setiferus* es menos susceptible a la enfermedad que *P. vannamei* (Frelieir *et al.*, 1995).

En un estudio sobre la HPN realizado en el Golfo de México, no se observaron indicios histológicos de HPN en *P. setiferus* ni *P. duorarum* de las proximidades de piscifactorías costeras de camarones situadas a lo largo de la costa del Yucatán y Campeche (Del Río-Rodríguez *et al.*, 2006).

### **2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador**

La BHPN se ha observado en juveniles, adultos y reproductores de *P. vannamei*.

### **2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas**

Véanse los apartados 2.2.1 y 2.2.2.

### **2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados**

El tejido diana es el hepatopáncreas, y se ha notificado infección por la BHPN en todos los tipos de células de este órgano.

### **2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida**

Algunos miembros de poblaciones de *P. vannamei* que sobreviven a infecciones y/o epizootias por la BHPN pueden portar las bacterias intracelulares de por vida y transmitir las a otras poblaciones por transmisión horizontal (Aranguren *et al.*, 2006; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2008; 2010; Vincent y Lotz, 2005).

La transmisión natural de la BHPN se considera que tiene lugar *per os* por canibalismo (Frelieir *et al.*, 1993; 1995; Johnson, 1990; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2010), aunque también puede intervenir la coexistencia y la diseminación de la BHPN mediante la columna de agua (Frelieir *et al.*, 1993; 1995). También se ha sugerido la posibilidad de transmisión de la BHPN con las heces expulsadas al agua del estanque (Aranguren *et al.*, 2006; Briñez *et al.*, 2003; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Los brotes de la enfermedad a menudo van precedidos de periodos largos de temperaturas (de unos 30°C) y salinidades (de hasta 40 partes por mil [ppmil]) del agua altas (Frelieir *et al.*, 1995; Lightner y Redman, 1994; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; 2011a; Vincent y Lotz, 2005).

### **2.2.6. Vectores**

No se conocen vectores en las infecciones naturales.

### **2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo**

La BHPN es frecuente en el camarón peneido salvaje en Perú (*P. vannamei*) y en Laguna Madre de Tamaulipas, México (*P. aztecus*, *P. duorarum* y *P. setiferus*) (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010; Lightner y Redman, 1994).

## **2.3. Patrón de la enfermedad**

### **2.3.1. Mecanismos de transmisión**

La transmisión de la BHPN puede ser horizontal por canibalismo; también se ha demostrado la transmisión por agua contaminada (Aranguren *et al.*, 2006; 2010; Frelieir *et al.*, 1993; Gracia-Valenzuela *et al.*, 2011; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b; Vincent *et al.*, 2004).

### 2.3.2. Prevalencia

Algunos de los valores medios de prevalencia de la BHPN observados en poblaciones salvajes se sitúan entre el 5,6 y el 15% en *P. duorarum*, y entre el 5 y el 17% en *P. aztecus* obtenidos de Carrizal y Carbonera, Laguna Madre de Tamaulipas, México (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010); y son del 0,77% en *P. vannamei*, y del 0,43% en *P. stylirostris* obtenidos de la Región de Tumbes, Perú (Lightner y Redman, 1994).

Algunos de los valores medios de prevalencia de la BHPN observados en piscifactorías de camarón se sitúan entre el 0,6% y el 1,3% en *P. vannamei* obtenidos de piscifactorías de camarón de Belice, Brasil, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Venezuela (Morales-Covarrubias *et al.*, 2011a).

### 2.3.3. Distribución geográfica

La BHPN parece encontrarse en el hemisferio occidental, tanto en el camarón peneido salvaje como en el de piscifactoría (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010; Del Río-Rodríguez *et al.*, 2006). En el hemisferio occidental, la BHPN suele hallarse en camarones peneidos de piscifactorías de Belice, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Estados Unidos y Venezuela (Freliey *et al.*, 1992; Ibarra-Gámez *et al.*, 2007; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011a).

### 2.3.4. Mortalidad y morbilidad

En *P. vannamei*, la infección por BHPN da lugar a una enfermedad aguda y normalmente catastrófica, con mortalidades que se acercan al 100%.

### 2.3.5. Factores ambientales

La tasa de replicación de la BHPN aumenta en casos de periodos muy largos de temperaturas altas (>29°C) y de cambios en la salinidad (20–38%). En México, la BHPN se ha detectado a prevalencias bajas (<7%) en piscifactorías de camarón en los meses de abril, mayo, julio y agosto. Sin embargo, durante los meses de septiembre y octubre, cuando las temperaturas son altas durante el día y bajas durante la noche, se observan prevalencias y mortalidades (>20%) altas (Morales-Covarrubias, 2010).

## 2.4. Control y prevención

### Control

La utilización de los antibióticos oxitetraciclina y florfenicol 50% en piensos medicados cada 8 horas durante 10 días es probablemente el mejor tratamiento frente a la HPN del que se dispone hoy en día, en concreto si la enfermedad se detecta en la fase inicial (Freliey *et al.*, 1995; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b).

### Prevención

- La detección temprana (en la fase inicial) de la HPN clínica es importante para que el tratamiento funcione, debido a la posibilidad de que el canibalismo amplifique y transmita la enfermedad.
- El ayuno de los camarones y el canibalismo en el que se ingieren otros camarones infectados con la BHPN, así como condiciones favorables al cultivo de la BHPN, son factores importantes para la propagación de la BHPN en *P. vannamei*.
- La utilización de cal hidratada ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) para tratar los fondos de los estanques durante la preparación de los mismos antes de introducir los animales puede ayudar a reducir la incidencia de la HPN.
- Algunas de las medidas preventivas son el rastrillado, el alicatado y la eliminación de sedimentos del fondo de los estanques, la aplicación de periodos de varias semanas de secado de los estanques y los conductos de distribución de agua al sol, la desinfección de los aparejos de pesca y demás equipo de la piscifactoría mediante hipoclorito de sodio, y el secado y extensa aplicación de cal en los estanques.
- La utilización de reproductoras libres de patógenos específicos (SPF) es una medida de prevención eficaz.

### 2.4.1. Vacunación

No se dispone de informes confirmados científicamente.

#### **2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas**

No se dispone de informes confirmados científicamente.

#### **2.4.3. Inmunoestimulación**

No se dispone de informes confirmados científicamente.

#### **2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia**

No se dispone de informes confirmados científicamente.

#### **2.4.5. Repoblación con especies resistentes**

No se dispone de informes confirmados científicamente.

#### **2.4.6. Agentes bloqueantes**

No se dispone de informes confirmados científicamente.

#### **2.4.7. Desinfección de huevos y larvas**

Se ha observado que la BHPN se transmite horizontalmente por canibalismo (Frelier *et al.*, 1993; Gracia-Valenzuela *et al.*, 2011; Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Lightner y Redman, 1994; Loy *et al.*, 1996b; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b; Vincent y Lotz, 2005; 2007). La desinfección de huevos y larvas es, por tanto, una buena práctica de manejo (Lee y O'Bryen, 2003) y se recomienda por su potencial de reducir la contaminación por BHPN en huevos eclosionados y larvas (así como la contaminación por otros agentes patógenos).

#### **2.4.8. Prácticas generales de agricultura**

Se han aplicado con éxito algunas prácticas de manejo destinadas a la prevención de las infecciones con la BHPN y la consecuente enfermedad. Entre ellas, la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como prueba de cribado previo de reproductores salvajes o de piscifactoría.

### **3. Obtención de muestras**

#### **3.1. Elección de ejemplares**

Los ejemplares adecuados para las pruebas de diagnóstico de la infección por BHPN son los estadios de postlarva (PL), juvenil y adulto.

#### **3.2. Conservación de las muestras para su envío**

Para información sobre la histología o pruebas moleculares sistemáticas, o las recomendaciones sobre la conservación de las muestras destinadas a las pruebas de diagnóstico, consúltese el Capítulo 2.2.0.

#### **3.3. Combinación de varias muestras**

Las muestras tomadas para las pruebas moleculares pueden estar combinadas en forma de muestras compuestas que representen no más de cinco ejemplares por muestra de juveniles, subadultos o adultos. Sin embargo, en el caso de los huevos, las larvas y las PL, para obtener una cantidad de muestra (ácido nucleico extraído) suficiente como para llevar a cabo una prueba diagnóstica puede ser necesario combinar cantidades mayores (como por ejemplo ~150 o más huevos o larvas o 50–150 PL, según el tamaño y la edad). Véase también el Capítulo 2.2.0.

#### **3.4. Órganos y tejidos de elección**

La BHPN infecta el tejido entérico. El principal tejido diana de la BHPN es el hepatopáncreas. Pueden obtenerse heces y utilizarse para las pruebas (normalmente la PCR, o la hibridación por transferencia puntual con sondas específicas) cuando sea necesario realizar pruebas no letales de reproductores de alto valor (Bondad-Reantasco *et al.*, 2001; Bradley-Dunlop *et al.*, 2004; Briñez *et al.*, 2003; Frelier *et al.*, 1993; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b).

### 3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Las BHPN son bacterias entéricas y no se replican en el intestino medio (tejidos entéricos), los ciegos (tejidos entéricos), las células del tejido conjuntivo, las branquias, los ganglios hematopoyéticos, los hemocitos, el cordón nervioso ventral y sus ganglios correspondientes, las células epiteliales del túbulo de la glándula antenal ni las células parenquimatosas del órgano linfoide.

## 4. Métodos de diagnóstico

### 4.1. Métodos de diagnóstico de campo

La prevalencia y la gravedad de las infecciones por BHPN podría “potenciarse” en una población contenida si tienen lugar condiciones de relativo hacinamiento o estrés en la cría de los camarones. Los factores de “estrés por hacinamiento” pueden consistir en altas densidades de población, ablaciones y poca calidad del agua (es decir, poco oxígeno disuelto, altas temperaturas del agua o altas concentraciones de amoníaco o nitritos) en el agua del depósito. Estas condiciones podrían potenciar la expresión de infecciones por BHPN de bajo grado y la transmisión del agente patógeno de portadores a hospedadores de la población previamente no infectados, lo cual daría lugar a un aumento de la prevalencia y a la gravedad de las infecciones, que pueden detectarse más fácilmente mediante los métodos disponibles de diagnóstico y detección de la BHPN.

#### 4.1.1. Signos clínicos

Existe una gran variedad de signos macroscópicos que indican la posible presencia de la HPN. Estos son: letargo, reducción de la ingesta de alimento, hepatopáncreas atrofiado, anorexia e intestinos vacíos, considerable reducción del crecimiento y malos cocientes de longitud/peso (“colas delgadas”); conchas blandas y cuerpos flácidos; branquias negras u oscurecidas; superficies de olor nauseabundo debido a organismos epicomensales; enfermedades bacterianas en la concha, que incluyen lesiones ulcerosas en la cutícula o erosiones melanizadas en los apéndices; y cromatóforos expandidos que dan lugar a la aparición de bordes oscurecidos en urópodos y pleópodos.

#### 4.1.2. Alteraciones del comportamiento

En la HPN aguda, *P. vannamei* puede presentar cambios de comportamiento (véase el apartado 4.1.1).

### 4.2. Métodos clínicos

#### 4.2.1. Anatomopatología macroscópica

La BHPN a menudo causa una enfermedad aguda con mortalidades muy altas en los juveniles de corta edad, los adultos y los reproductores. En los juveniles de corta edad, los adultos y los reproductores infectados horizontalmente, el periodo de incubación y la gravedad de la enfermedad dependen en cierto modo del tamaño y/o la edad. Los adultos infectados casi nunca presentan signos de la enfermedad ni mortalidad (Aranguren *et al.*, 2006; 2010; Bastos Gomes *et al.*, 2010, Brock y Main, 1994; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b). Los signos macroscópicos no son específicos de la HPN, pero la HPN aguda cursa con una marcada reducción del consumo de alimento, seguida de cambios de comportamiento y de aspecto (véase el apartado 4.1.1).

#### 4.2.2. Bioquímica clínica

No aplicable.

#### 4.2.3. Anatomopatología microscópica

En *P. vannamei*, tanto la HPN aguda como la crónica se diagnostican fácilmente mediante métodos histológicos sistemáticos de tinción con hematoxilina y eosina (H/E) (véase el apartado 4.2.6).

##### 4.2.3.1. Fase inicial de la hepatopancreatitis necrotizante

La infección inicial por BHPN es más difícil de diagnosticar mediante métodos histológicos sistemáticos basados en la tinción H/E. Para el diagnóstico de infecciones iniciales, se recomienda utilizar métodos moleculares para detectar la BHPN (por ejemplo, PCR o la aplicación de sondas de ADN específico de BHPN a pruebas de hibridación por transferencia puntual o hibridación *in-situ* (ISH) de cortes histológicos).

#### 4.2.3.2. Fase aguda de la hepatopancreatitis necrotizante

La HPN aguda se caracteriza por una atrofia del hepatopáncreas con atrofia moderada del epitelio del túbulo, presencia de formas bacterianas y hematocitos infiltrados que afectan a uno o más túbulos (encapsulaciones multifocales). Se observan células hipertróficas y epiteliales individuales que parecen estar separadas de las células adyacentes, y sufrir una necrosis y descamación hacia el interior de la luz tubular; el contenido lipídico de las células epiteliales es variable.

#### 4.2.3.3. Fase de transición de la hepatopancreatitis necrotizante

La fase de transición de la HPN se caracteriza por una inflamación hemocítica de los espacios intertubulares como respuesta a la necrosis, la citolisis y el desprendimiento de células epiteliales del túbulo del hepatopáncreas. El epitelio del túbulo del hepatopáncreas está considerablemente atrofiado, lo cual da lugar a la formación de grandes zonas edematosas (llenas de líquido o “acuosas”) en el hepatopáncreas. Las células epiteliales tubulares del interior de la encapsulación multifocal están típicamente atrofiadas y se reducen, de modo que su morfología pasa de ser columnar simple a cuboide. Contienen pocas vacuolas lipídicas almacenadas, o bien ninguna, vacuolas secretoras muy escasas o ninguna, y masas de bacterias. En esta fase se observan nódulos hemocíticos en presencia de masas de bacterias en el centro del nódulo.

#### 4.2.3.4. Fase crónica de la hepatopancreatitis necrotizante

En la fase crónica de la HPN, disminuye la abundancia de las lesiones tubulares, la encapsulación multifocal y las zonas edematosas, y son sustituidas por infiltrado y acumulación de hemocitos en los puntos de necrosis. Hay zonas con fibrosis, túbulos melanizados y necróticos y muy poca presencia de células hipertrofiadas con masas de bacterias en el citoplasma y pocos nódulos hemocíticos.

#### 4.2.4. Preparaciones húmedas

El examen de tejido de hepatopáncreas (HP) mediante aplastamiento en preparación húmeda en general se lleva a cabo para detectar HPN de forma provisional. El hepatopáncreas puede estar atrofiado y tener alguna de las siguientes características: estar blando y acuoso; estar lleno de líquido en el centro; estar pálido con líneas negras (túbulos melanizados); o tener el centro pálido en lugar de la coloración naranja normal. Pueden producirse altas mortalidades, que alcancen más del 90% en 30 días desde el inicio de los signos clínicos si no se ha aplicado tratamiento. Para el análisis de la preparación húmeda, el camarón debe estar en el estadio entre mudas, y no haber sido tratado, puesto que ello podría alterar los túbulos. Esta técnica se basa en la deformación o atrofia tubular principalmente de la zona apical del túbulo.

La HPN tiene cuatro fases:

*Fase inicial:* poca presencia de deformación tubular (1–5 /campo/organismo) y desprendimiento celular.

*Fase aguda:* Infiltración de hemocitos, aumento del número de túbulos deformados (6–10/campo/organismo), presencia de encapsulación en distintas zonas de la muestra, que consiste en túbulos atrofiados envueltos de varias capas de hemocitos.

*Fase de transición:* Infiltración de hemocitos, aumento del número de túbulos deformados (11–15/campo/organismo), túbulos melanizados, túbulos necróticos y un alto nivel de encapsulación en distintas zonas de la muestra. En esta fase se han observado nódulos hemocíticos en presencia de masas de bacterias en el centro del nódulo.

*Fase crónica:* Zonas con fibrosis, pocos túbulos melanizados y necróticos y muy poca presencia de células hipertrofiadas con masas de bacterias en el citoplasma.

#### 4.2.5. Frotis

No aplicable.

#### 4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

Actualmente no es aplicable a efectos de diagnóstico.

### 4.3. Métodos de detección e identificación del agente

#### 4.3.1. Métodos directos de detección

##### 4.3.1.1. Métodos de microscopía

###### 4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Véase el apartado 4.2.4

###### 4.3.1.1.2. Frotis

No aplicable

###### 4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3.

###### 4.3.1.1.4. Método del bioanálisis

La confirmación de la infección con la BHPN puede llevarse a cabo mediante bioanálisis de animales sospechosos de BHPN con juveniles SPF de *P. vannamei* que sirvan de indicadores de las bacterias intracelulares (Cock *et al.*, 2009; Johnson, 1990; Lee y O'Bryen, 2003; Lightner, 2005). Pueden utilizarse protocolos orales. El método oral es relativamente sencillo de realizar y se lleva a cabo alimentando a juveniles SPF de *P. vannamei* con hepatopáncreas troceado de camarones sospechosos de presentar la enfermedad, en pequeños depósitos. Es necesario utilizar un depósito control negativo de camarones indicadores, que reciban solo alimento normal. Cuando se aplique el protocolo de alimentación con hepatopáncreas (*per os*) para el bioanálisis de diagnóstico de la BHPN, los camarones indicadores positivos a HPN (detectables por signos macroscópicos y por histopatología) suelen detectarse en cuestión de 3 a 4 días tras la exposición inicial, y aparecen mortalidades considerables unos 3 a 8 días después de dicha exposición inicial. Los camarones control negativos deben permanecer sin signos macroscópicos ni histológicos de HPN ni mortalidades inusuales (durante al menos 10 a 15 días).

##### 4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

###### 4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

La BHPN no se ha cultivado nunca *in vitro*. No existen líneas celulares de crustáceos (Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; Vincent y Lotz, 2007).

###### 4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Pruebas de inmunohistoquímica (IHC) basadas en sondas de ADNc específicas de la HPN según los métodos descritos por Bradley-Dunlop *et al.* (2001) y Loy y Frelier (1996).

###### 4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Se han desarrollado ISH y (RT)-PCR con transcripción inversa para la BHPN, y se dispone de kits comerciales de RT-PCR para la BHPN. Se han desarrollado pruebas de PCR para la HPN, y se dispone de varios métodos y productos comerciales basados en estos métodos (Loy y Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996b). Para el diagnóstico de la HPN, las sondas génicas y la PCR aportan mayor sensibilidad diagnóstica que las técnicas histológicas clásicas de diagnóstico de la HPN. Además, estos métodos tienen la ventaja de ser aplicables en caso de que tengan que analizarse camarones reproductores de alto valor mediante pruebas no letales.

###### 4.3.1.2.3.1. Sondas de ADN para aplicaciones en ISH con sondas de ADNc no radiactivas

En el laboratorio pueden producirse sondas de ADNc no radiactivas marcadas con DIG para la detección de BHPN. El método de la ISH de Loy y Frelier (1996) y Lightner (1996) proporciona una mayor sensibilidad diagnóstica que los métodos más tradicionales de detección y diagnóstico de la BHPN, basados en métodos histológicos clásicos (Johnson, 1990; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b). En la ISH de cortes histológicos sistemáticos de lesiones del hepatopáncreas en fase aguda, de transición y crónica con sonda de ADNc marcado con DIG específica de la BHPN, proporciona un diagnóstico definitivo de infección con la BHPN (Lightner, 1996; Loy y Frelier, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Las lesiones positivas a BHPN patognomónicas presentan zonas de un color azul intenso o negro azulado en el citoplasma de las células afectadas cuando reaccionan con las sondas de ADNc. (Para conocer los detalles sobre el



método de la ISH, véase el Capítulo 2.2.2 NHHI, y para información detallada sobre la utilización del fijador AFA de Davidson, véase el Capítulo 2.2.0, apartado B.5.3.ii).

#### 4.3.1.2.3.2. Método de la PCR con transcripción inversa (RT-PCR)

Para llevar a cabo la RT-PCR para el diagnóstico de la BHPN puede utilizarse hepatopáncreas o heces. Los cebadores designados como NHPF2: 5'-CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAGT-3' y NHPR2: 5'-GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C-3', amplifican una secuencia de 379 pares de bases (pb) en función del número de acceso de GenBank correspondiente al ARNr ribosómico 16S de la BHPN, que amplifica un fragmento de 379 pb (Nunan *et al.*, 2008). La concentración de cebador (F2/R2) utilizada para cada caso es de 0,31  $\mu\text{M}$ . Los parámetros de ciclado son: Paso 1: 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; Paso 2: 25 ciclos de 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y 95°C durante 30 segundos; Paso 3: 1 ciclo de 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos; después se mantiene a 4°C indefinidamente.

La RT-PCR descrita a continuación para la detección de BHPN sigue el método utilizado por Nunan *et al.* (2008).

- i) *Preparación del ARN molde:* puede extraerse ARN de hepatopáncreas fresco, congelado o conservado en etanol. La extracción de ARN debe llevarse a cabo utilizando alguno de los kits comerciales de procesamiento de tejidos para la extracción de ARN, como el High Pure RNA Tissue Kit<sup>1</sup> (Roche, Alemania) y siguiendo los procedimientos que indique la casa comercial para producir ARN moldes de calidad.
  - ii) La RT-PCR se lleva a cabo en solución, utilizando de ARN final (la concentración tiene que ser de 1–1000 ng ml<sup>-1</sup>).
  - iii) En toda RT-PCR de detección de la BHPN deben incluirse los siguientes controles: a) una muestra de tejido que se sepa que es negativa para la BHPN; b) una muestra (de hepatopáncreas) que se sepa que es positiva para la BHPN; y c) un control “sin molde”.
  - iv) El kit de PCR GeneAmp® EZ rTth RNA PCR (Applied Bioscience, EE.UU.) se utiliza para todas las reacciones de amplificación aquí descritas.
  - v) Las condiciones óptimas de realización de la RT-PCR (concentraciones finales en un volumen total de 50  $\mu\text{l}$ ) para la detección de la BHPN en muestras de hepatopáncreas de camarón son las siguientes: cebadores (cada uno a una concentración 0,46  $\mu\text{M}$ ), dNTPs (cada una a una concentración 300  $\mu\text{M}$ ), rTth-ADN polimerasa (2,5 U/ 50  $\mu\text{l}$ ), acetato de manganeso (2,5 mM), en tampón EZ 5 $\times$  (Vicien 25 mmol, acetato de potasio 57,5 mM, glicerol al 40% [p/v], a pH 8,2).
  - vi) Si el termociclador no dispone de tapa calentada, se deposita aceite mineral (50  $\mu\text{l}$ ) sobre los 50  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción para evitar la condensación o evaporación durante el termociclado.
  - vii) Se combinan el ARN molde y todos los reactivos y se permite que tenga lugar la transcripción inversa a 60°C durante 30 minutos, seguida de 2 minutos.
  - viii) Los parámetros del ciclado son: Paso 1: 1 ciclo de 95°C durante 2 minutos; Paso 2: 25 ciclos de 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y 95°C durante 30 segundos; Paso 3: 1 ciclo de 60°C durante 1 minuto y 72 °C durante 2 minutos; después se mantiene indefinidamente a 4°C.
- Nota: Para cada termociclador deben optimizarse las condiciones utilizando controles positivos.
- ix) Los detalles de la composición de los reactivos y los tampones aquí utilizados pueden consultarse en el Capítulo 2.2.2 NHHI.

#### 4.3.1.2.3.3. Método de la PCR en tiempo real

Se han desarrollado métodos de PCR en tiempo real para la detección de la BHPN. Estos métodos aportan las ventajas de ser rápidos, específicos y sensibles. La sensibilidad de la PCR en tiempo real es de unas 100 copias de la secuencia de acceso del genoma de la BHPN (Aranguren *et al.*, 2010; Vincent y Lotz, 2005).

El método de la PCR en tiempo real basado en química TaqMan, descrito abajo, para la detección de la BHPN en general sigue el método utilizado por Aranguren *et al.* (2010).

---

1 Las referencias a productos comerciales concretos como ejemplos no implica su aprobación por parte de la OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales mencionados en este *Manual Acuático*.



- i) Los cebadores de la PCR y la sonda TaqMan se escogieron del gen del ARNr 16S de la BHPN (GenBank U65509) (Loy *et al.*, 1996). Los cebadores y la sonda TaqMan fueron diseñados por el programa Primer Express versión 2.0 (Applied Biosystems). Las secuencias de cebador en dirección 5' (NHP1300F) y en dirección 3' (NHP1366R) son: 5'-CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TACAC-3' y 5'-GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A-3', respectivamente. La sonda TaqMan HPN: 5'-CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA-3', que corresponde a la región de los nucleótidos 1321–1340, se sintetiza y marca con los colorantes fluorescentes 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5' y N,N,N,N-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA) en el extremo 3'.
- ii) *Preparación del ARN molde*: la extracción y purificación del ARN molde del hepatopáncreas se lleva cabo igual que se ha descrito en el apartado sobre la PCR en tiempo real tradicional.
- iii) *La mezcla para reacción de la PCR en tiempo real contiene*: SuperMix de PCR simple en tiempo real TaqMan (Quanta, Biosciences), cada cebador a una concentración 0,3 µM, sonda TaqMan 0,1 µM, 5-50 ng de ARN y agua en un volumen de reacción de 25 µl. Para optimizar los resultados, la mezcla de reacción debe pasarse por el vórtex y mezclarse bien.
- iv). La amplificación se lleva a cabo con el ciclador master Realplex 2.0 (Eppendorf). El ciclado consiste en una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y una hibridación/extensión a 60°C durante 1 minuto.
- v) Al final de la reacción, se mide la fluorescencia en tiempo real con una cámara que lleve integrado un dispositivo de carga acoplado. Se fija un umbral por encima del valor basal a partir del cual se empieza a detectar un aumento en la señal asociada a un aumento exponencial del producto de la PCR. Las muestras se considerarán negativas si el valor del Ct (ciclo umbral) es de 40 ciclos.
- vi) Es necesario incluir un “control sin molde” cada vez que se ejecute la reacción, con el fin de descartar la presencia de contaminantes de la fluorescencia en la mezcla de reacción en el bloque de calor del termociclador. También debe incluirse un control positivo, que puede consistir en ARN transcrito *in-vitro* que contenga la secuencia de acceso, bacterias purificadas o ARN extraído de hepatopáncreas infectados por la BHPN.

#### 4.3.1.2.3.4. Secuenciación

Los productos de la RT-PCR pueden clonarse y secuenciarse cuando sea necesario para confirmar la infección por la BHPN, o bien para identificar falsos positivos o una amplificación inespecífica (Aranguren *et al.*, 2010; Bustin *et al.*, 2009; Vincent y Lotz, 2005).

#### 4.3.1.2.4. Purificación del agente patógeno

Existen métodos de aislamiento y purificación de la BHPN (Aranguren *et al.*, 2010; Vincent y Lotz, 2005), pero no se recomiendan para el diagnóstico sistemático de la HPN.

### 4.3.2 Métodos serológicos

No son aplicables porque los camarones son organismos invertebrados que no producen anticuerpos específicos que pudieran utilizarse para poner de manifiesto una infección por BHPN o una exposición previa a esta bacteria.

## 5. Idoneidad de las pruebas par cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia específica y el diagnóstico de la BHPN se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a =el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b= el método es estándar, con una buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c= el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d= el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva, ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

**Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico**

Method	Targeted surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PLs	Juveniles	Adults		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	b	d
Bioanálisis	d	d	d	d	c	d
MO directa	d	d	c	d	c	d
Histopatología	d	b	b	c	a	a b
Sondas de ADN <i>in situ</i>	a	a	a	a	a	a
ME de transmisión	d	d	d	d	c	c
Antibody-based assays	d	d	c	c	b	b
PCR en tiempo real	a	a	a	a	a	a
qPCR	a	a	a	a	a	a
PCR	a	a	a	a	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	d	a

PL = postlarvas; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

## 6. Prueba/s recomendada/s para la vigilancia específica destinada a declarar la ausencia de hepatopancreatitis necrotizante

Como se ha indicado en la Tabla 5.1, la PCR en tiempo real (Apartado 4.3.1.2.3.2) es el método recomendado para la vigilancia dirigida por motivos de disponibilidad, utilidad y sensibilidad y especificidad diagnósticas. Al estudiar episodios de mortalidad aguda como parte de un programa de vigilancia específica, poner de manifiesto mediante histología lesiones patognomónicas en el hepatopáncreas inducidas por BHPN (con o sin confirmación por ISH con sondas de ADN específicas de BHPN) es un método adecuado (Tabla 5.1).

## 7. Criterios de diagnóstico confirmativo

### 7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso es aquel en el que se observa:

- Mortalidades altas repentinas en PL tardías, juveniles o subadultos de *P. vannamei* o *P. stylirostris* en zonas donde la BHPN es enzoótica;
- la presencia súbita de muchas aves marinas (gaviotas, cormoranes, garzas, golondrinas de mar, etc.) “pescando” en uno o más estanques de piscifactoría de camarones;
- muestras de *P. vannamei* o *P. stylirostris* de piscifactoría, tomadas de estanques en los que se hayan observado aves marinas alimentándose, que presenten signos macroscópicos indicativos de HPN en fase aguda o de transición, como un hepatopáncreas con atrofia general, color rojizo, letargo, conchas blandas, intestinos vacíos y la presencia de muchos puntos negros irregulares en la cutícula;

o bien

- una baja tasa de eclosión de los huevos, y una mala supervivencia y rendimiento en los estadios larvales y PL cuando se utilizan reproductores de poblaciones salvajes o de piscifactoría en las que la BHPN es enzoótica.

## 7.2. Definición de caso confirmado

Un caso está confirmado cuando se obtienen resultados positivos en cualquier combinación de una prueba molecular (PCR o ISH) y una prueba morfológica (histología) utilizando al menos dos de los siguientes tres métodos:

- Demostración histológica de lesiones diagnósticas de BHPN en fase aguda en (especialmente) el hepatopáncreas atrofiado, con atrofia moderada de la mucosa tubular, presencia de formas bacterianas e infiltrado de hemocitos que afecte a uno o más túbulos (encapsulaciones multifocales).
- Señal histológica positiva en la ISH para lesiones propias de la BHPN.
- Resultados positivos en la PCR para la BHPN.

## 8. Bibliografía

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., BRIÑEZ B., ARAGON L., PLATZ C., CARABALLO X., SUAREZ A. & SALAZAR M. (2006). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeusvannamei* female broodstock: effect on reproductive parameters nauplii and larvae quality. *Aquaculture*, **258**, 337–343.

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.

BASTOS GOMES G., SANTOS DOMINGOS J.A., CAVALCANTI OLIVEIRA K.K., DE PAULA MENDES P., ARNS DA SILVA V. & SHINOZAKI MENDES E. (2010). Diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp, *Litopenaeusvannamei*, through wet mount, histopathology and PCR techniques. *J. World Aquaculture Soc.*, **41**, 816–822.

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.

BRADLEY-DUNLOP D.J., PANTOJA C. & D.V. LIGHTNER. (2004). Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 233–240.

BRIÑEZ B., ARANGUREN F. & SALAZAR M. (2003). Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeusvannamei* broodstock. *Dis. Aquat. Org.*, **69**, 55–72.

BROCK J.A. & MAIN F. (1994). A Guide to the Common Problems and Disease of Cultured *Penaeusvannamei*. Oceanic Institute. Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 241 p.

BUSTIN S., GARSON J., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M., SHIPLEY G., VANDESOMPELE J. & WITTEWIT C. (2009). The MIQE guidelines: minimal information for publication of quantitative realtime PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55** (4), 611–622.

COCK J., GITTERLE T., SALAZAR M. & RYE M. (2009). Breeding for disease resistance of penaeid shrimps. *Aquaculture*, **286**, 1–11.

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 *Litopenaeusvannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 175–179.

DEL RÍO-RODRÍGUEZ R.E., SOTO-RODRÍGUEZ S., LARA-FLORES M., CU-ESCAMILLA A.D. & GÓMEZ-SOLANO M.I. (2006). A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in Campeche, Mexico: A first case report. *Aquaculture*, **255**, 606–209.

FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeusvannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 44–48.

- 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.
- GRACIA-VALENZUELA M.H., LUZ ANGELICA ÁVILA-VILLA L.A., GLORIA YEPIZ-PLASCENCIA G., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., MENDOZA-CANO F., GARCÍA-SANCHEZ G. & GOLLAS-GALVÁN T. (2011). Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at –20°C for use in forced-feeding infection of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, **311**, 105–109.
- IBARRA-GÁMEZ J.C., GALAVÍZ-SILVA L. & MOLINA-GARZA Z.J. (2007). Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. *Ciencias Marinas*, **33**, 1–9.
- JOHNSON S.K. (1990). Handbook of Shrimp Diseases. Texas A&M Sea Grant College Program, Galveston, TX, USA.
- JORY D.E. (1997). Necrotizing hepatopancreatitis and its management in shrimp ponds. *Aquaculture Magazine*, **23**, 98–101.
- LEE C.S. & O'BRYEN P.J. (eds). (2003). Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 293 p.
- 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. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquacult. Soc.*, **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1994). An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. *Aquaculture*, **122**, 9–18.
- 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.
- LOY J.K., FRELIER P.F., VARNER P. & TEMPLETON J.W. (1996b). 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.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2008). Capítulo 3: Enfermedades bacterianas. *En: Patología e Inmunología de Camarones*, Editores Vielka Morales y Jorge Cuellar-Angel. Programa CYTED Red II-D vannamei, Panamá, Rep. De Panamá, 120–134.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2010). Enfermedades del camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas, SA de CV., Av. Río Churubusco 385, Col. Pedro María Anaya, México, D.F. Segunda edición. ISBN: ISBN 978-607-17-0436-8. 1-180.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., LOZANO-OLVERA R.Y. & HERNÁNDEZ-SILVA A.J. (2010). Necrotizing hepatopancreatitis in cultured shrimp caused by extracellular and intracellular bacteria. *Tilapia & Camarones*, **5**, 33–39.
- 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*, (In press).

MORALES-COVARRUBIAS M.S., OSUNA-DUARTE A.G., GARCIA-GASCA A., LIGHTNER D.V. & MOTA-URBINA J.C. (2006). Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of *Penaeusvannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 19–25.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., TLAHUEL-VARGAS L., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ I.E., LOZANO-OLVERA R. & PALACIOS-ARRIAGA J.M.(2011b). NHP infection in *Penaeusvannamei* with florfenicol and oxytetracycline: a comparative experimental study. *Rev. Científica*, FCV-LUZ, (In press).

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., BRELAND V.M. & LOTZ J.M. (2004). Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeusvannamei* with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) bacterium by *per os* exposure. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 227–233

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2005). Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeusvannamei* and quantification of NHP bacterium using real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 163–169.

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2007). Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to KONA stock *Litopenaeusvannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 265–268.

\*  
\* \*

**NB:** En el momento de esta publicación (2012) todavía no había ningún Laboratorio de Referencia de la OIE para la Hepatopancreatitis necrotizante