



(<https://debug.globalseafood.org>).



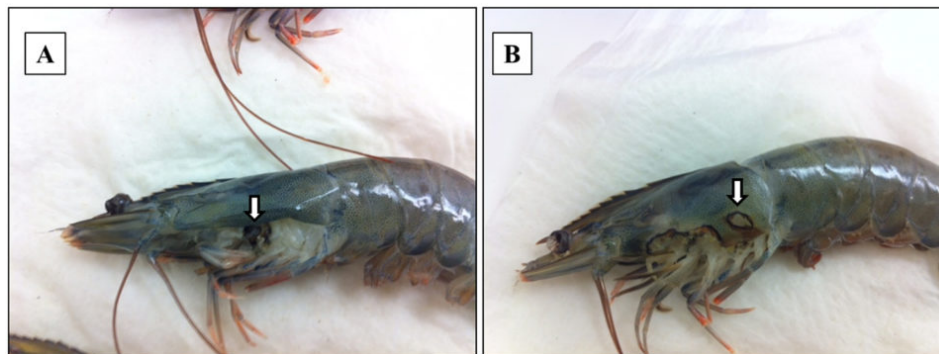
Health &
Welfare

Detección de un parásito amebiano en camarón blanco del Pacífico cultivado

8 July 2019

By Jee Eun Han, DVM, Ph.D. , Ji Hyung Kim, Ph.D. , Kyeong Yeon Kim and Young Seo Lee

Resultados del estudio útiles como método de selección inicial



Signos generales de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) cultivados en una granja cerrada de recirculación e infectados naturalmente con un protozoo amebioide. El camarón exhibió serios daños a las branquias y al caparazón; (A) branquias negras, (B) laminillas faltantes y caparazones erosionados.

El protozoario *Paramoeba* sp. (sinónimo de *Neoparamoeba* sp.) es omnipresente y normalmente vive libre en aguas marinas, y es el parásito protozoario ameboide más patógeno en peces cultivados. La especie *P. perurans* coloniza las branquias y da como resultado la enfermedad de las branquias amebianas (AGD) en salmónidos criados en granjas y, en particular, afecta a la industria del salmón del Atlántico en Tasmania, con pérdidas típicas del 10 al 20 por ciento de la producción. Hasta el momento, la AGD se ha registrado en 15 especies de peces de 11 géneros diferentes, y en la infección por *P. perurans* en el pescado se producen reacciones celulares proliferativas en las branquias, que incluyen hiperplasia epitelial, hipertrofia, edema y formación de vesículas interlamelares como manchas y placas blancas mucoides en la superficie de las branquias.

La evaluación patológica general de las branquias se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico de AGD, pero se recomienda un examen histológico posterior para mejorar la precisión diagnóstica. Además, los métodos de diagnóstico molecular basados en el ensayo de PCR convencional que se dirige a la secuencia del rRNA (SSU rRNA) de la subunidad pequeña están disponibles para el diagnóstico de la AGD.

También se han reportado varias especies de *Paramoeba* en algunas especies de crustáceos y equinodermos, como langostas, cangrejos y erizos de mar. En estos huéspedes, las infecciones graves se asociaron con la muerte del huésped, lo que resultó en pérdidas económicas significativas. Las infecciones también se notificaron en moluscos bivalvos, como los mejillones, pero se consideró que tenían más probabilidades de ser reservorios ambientales potenciales para este protozoo.

Este artículo – adaptado y resumido de la **publicación original** (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.036>) – es el primer informe de este parásito protozoario ameboide en el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Este trabajo fue apoyado por la subvención de la Fundación Nacional de Investigación de Corea (NRF) financiada por el gobierno de Corea (MSIT) (número de concesión NRF-2018R1C1B5086350).

Configuración del estudio

Camarones del Pacífico adultos (peso promedio 30 gramos) de un criadero anónimo de camarones en América del Norte mostraron una disminución del apetito, letargo y dificultad respiratoria. La mortalidad acumulada fue de 62.75 por ciento a los 120 días después de la siembra, y los camarones enfermos tenían branquias negras, laminillas faltantes y caparazón erosionado (ver la imagen de arriba). De estos datos, sospechamos una infección por hongos causada por especies de *Fusarium*, que se ha reportado previamente como el agente causante de la enfermedad de las branquias negras en crustáceos, como langostinos, camarones y langostas. Sin embargo, se observaron parásitos protozoarios amebianos mediante la observación directa de un montaje húmedo (Fig. 1). Las muestras de camarones moribundos se recolectaron a intervalos irregulares, se fijaron en el fijador AFA de Davidson o en un 95 por ciento de etanol, y se examinaron posteriormente por histopatología, PCR e ISH.

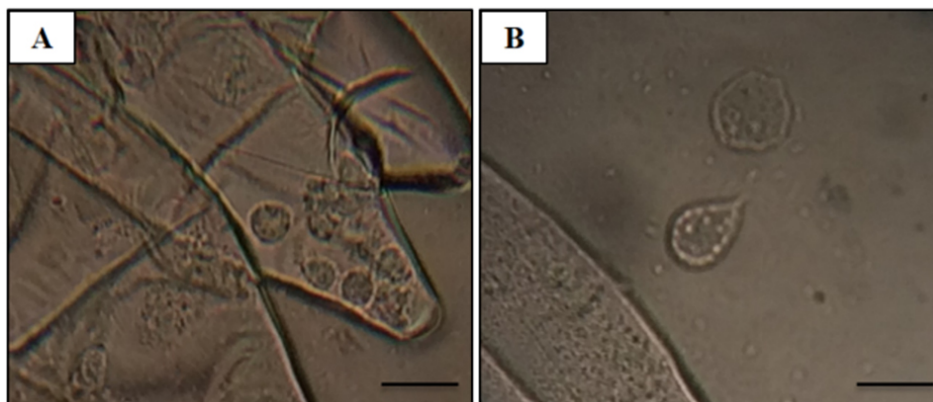


Fig. 1: Muestras obtenidas de squashes de branquias montadas en húmedo. (A) Variaciones en la morfología de la ameba y (B) Ameba individual de vida libre. Barras de escala = 20 µm.

Para información adicional y detallada sobre el muestreo de camarones, el examen histopatológico y el análisis de secuencia, el ensayo de PCR y la hibridación in situ (ISH), consulte la publicación original.

Resultados y discusión: examen histopatológico (H&E)

El hallazgo más significativo en el examen microscópico de las muestras estudiadas fue la presencia de un parásito amebiano. La infestación por este parásito se encontró principalmente en las branquias, con grado de gravedad G4 (Figs. 2A – C), y se observó hiperplasia extensa, puente de laminillas y formación de espacios interlamelares. Según el productor, letargo, anoxia y, eventualmente, la muerte se ha visto en camarones infectados, y esto puede estar asociado con el daño a las branquias (órganos respiratorios). La figura 2A muestra el núcleo de la ameba con un núcleo anfifílico rodeado por un anillo basófilo irregular y el parasoma con el citoplasma eosinofílico y vacuolas, lo que indica que la ameba está estrechamente relacionada con los miembros del orden Dactylopodida, y tal vez el género *Paramoeba*, según Sühnel. et al. (2014).

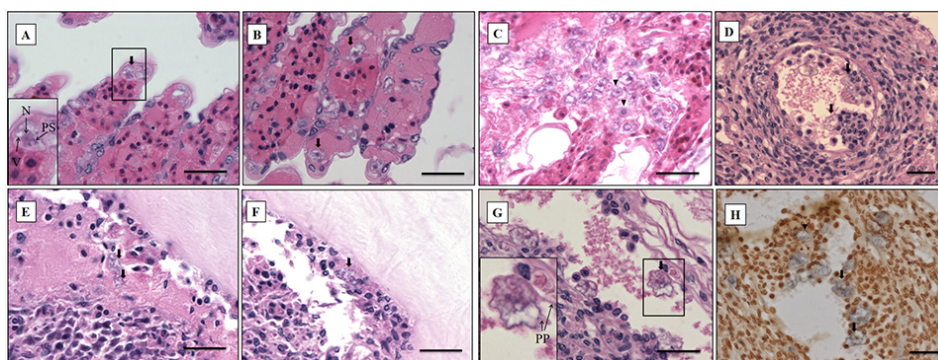


Fig. 2: la infección por ameba (*Paramoeba* sp.) se encontró en varios tejidos mediante examen histopatológico e hibridación in situ. Tinción de hematoxilina-eosina-floxina de Mayer-Bennett; (A), (B) y (C) las branquias, (D) las glándulas antenales, (E) las áreas subcuticulares, (F) el epitelio cuticular y (G) el perineuro. Por hibridación in situ con una sonda génica marcada con digoxigenina, el precipitado azul oscuro indica la presencia del parásito (H) dentro de la glándula de la

antena. Protozoo ameba aplanado y de forma irregular, formas de trofozoíto (diámetro aproximado de 25 a 30 μm ; flecha negra), formas similares a quistes (diámetro menor de 10 μm ; punta de flecha negra) y aumento de trofozoítos que muestran endoplasma granular con (V) vacuolas, (N) núcleo, (PS) parasoma, y ectoplasma con (PP) pseudopodia. Barras de escala = 30 μm .

Además, se observaron predominantemente formas de trofozoítos aplanadas e irregulares con radiación de pseudópodos (aproximadamente de 25 a 30 μm de diámetro). La presencia de pseudópodos digitados, la falta de quistes (menos de 10 μm de diámetro) y el hábitat marino también identifican a la ameba como del género *Paramoeba*, según Kent et al. (1988). Estos parásitos amebianos también se observaron en otros órganos, como la glándula de la antena, el órgano linfoide, el epitelio cuticular y el subcutis de los apéndices y el tejido conectivo que rodea el cordón nervioso ventral de las muestras analizadas, con grado de gravedad G1 a G4 (Figs. 2D– SOL).

Ensayo de PCR y análisis de secuencia

Los amplicones fuertes (un amplicón es un fragmento de ADN o ARN que es la fuente y / o el producto de los eventos de amplificación o replicación) se detectaron en el camarón analizado (cinco muestras representativas) mediante el ensayo de PCR dirigido a la secuencia del ARNr del SSU (Fig. 3). Los resultados mostraron que la secuencia de nucleótidos era 100 por ciento idéntica a las secuencias de *Paramoeba* sp. (*Neoparamoeba* sp.) de varias especies de crustáceos marinos y equinodermos. Y no hubo reacción cruzada con el ADN genómico de los camarones *L. vannamei* y otros camarones (*P. monodon*, *P. indicus*, *L. stylirostris* y *M. rosenbergii*), poliquetos, calamares y *Artemia* spp., o con otros parásitos de los camarones por la prueba de especificidad.

Fig. 3: Ensayo de PCR dirigido a las secuencias de subunidades pequeñas de ARNr. Fuertes amplificaciones (131 pb) con ADN de tejidos branquiales de camarones infectados con *Paramoeba* sp. (Carriles 1 a 5), camarones libres de patógenos específicos (Carril 6), un control sin plantilla (Carril 7) y una escalera de AND de 1-kb Plus (carril M).

También realizamos un estudio filogenético para investigar la relación entre las especies identificadas como tipo-*Paramoeba* sp. de camarones y otras especies de amebas. En el árbol filogenético resultante, la secuencia del ARNr del SSU de la especie tipo-*Paramoeba* se agrupó junto con secuencias del orden Dactylopodida, especialmente la familia Paramoebidae.

Hibridación in situ

El método ISH también se puede utilizar para determinar los agentes etiológicos de la infección por protozoos. Para ISH, la sonda del gen tipo *Paramoebase* generó a partir de la secuencia de ARNu del SSU de los camarones infectados por la ameba, y esta se hibridó con las células amebianas en la muestra representativa (Fig. 2H), correspondiente a los resultados histopatológicos. La sonda parece ser muy específica y no se observó reacción en ninguno de los tejidos preparados a partir de camarones SPF (datos no mostrados).

Hasta ahora, el parásito protozoario ameboide *Paramoeba* sp. se ha reportado en varios crustáceos marinos, incluyendo la langosta Americana y cangrejos, pero no en el camarón cultivado. Este estudio es el primer informe de infección por el parásito prebozoico amebiano tipo-*Paramoeba* e sp. en las branquias de *L. vannamei* cultivado en un criadero anónimo en América del Norte. Es muy probable que la infección por amebas se deba a factores de estrés, como el aumento de la temperatura del agua y / o altas salinidades, combinadas con altas densidades de animales en estanques, lo que proporciona una ventaja a este protozoo naturalmente presente en el ambiente marino. Según los productores, la salinidad había caído de 34 a 10 ppt debido a problemas con el equipo mecánico, por lo que es probable que el estrés resultante haya provocado la infestación del parásito en los camarones.

Perspectivas

Los camarones infectados con la ameba mostraron una disminución del apetito, letargo, dificultad respiratoria, caparazones erosionados y branquias ennegrecidas. Bajo el microscopio, las características histopatológicas incluyeron la morfología típica de los protozoos amebianos que presentan endoplasmas granulares con vacuolas, núcleos, parasomas y ectoplasmas con pseudópodos. Estas características sugieren que el parásito está relacionado con el orden Dactylopodida, probablemente una especie de *Paramoeba* y esto se confirmó mediante el análisis de secuencia de ARNr del SSU, el ensayo de PCR y la hibridación in situ (ISH).

En el camarón, la infección por amebas ha resultado en una mortalidad significativa y pérdidas económicas asociadas. Por lo tanto, los ensayos de diagnóstico de ISH y PCR desarrollados en este estudio pueden proporcionar datos informativos para los productores de camarón y pueden utilizarse como los métodos de selección inicial para el protozoo ameboide en el camarón.

Este estudio proporciona datos informativos a los productores de camarón y los ayuda a monitorear las infecciones por amebas en granjas camaroneras. En los camarones examinados, los parásitos tienen características histológicas de *Paramoeba* sp., pero no se detectaron bandas de PCR para los cebadores generados a partir de *P. perurans*, *P. pemaquidensis* o *P. branchiphila* spp. Por lo tanto, asumimos que podría ser una nueva especie de *Paramoeba* que infecta camarones. Se necesita trabajo adicional para diagnosticar la especie y desarrollar los métodos de diagnóstico específicos de la especie para amebas que infectan camarones de granja.

Referencias disponibles del primer autor o de la publicación original.

Authors



JEE EUN HAN, DVM, PH.D.

Laboratory of Aquatic Biomedicine
College of Veterinary Medicine
Kyungpook National University
Daegu 41566, Korea

hanje1223@gmail.com (<mailto:hanje1223@gmail.com>).



JI HYUNG KIM, PH.D.

Senior researcher
Infectious Disease Research Center
Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (KRIBB)
125 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34141, Republic of Korea



KYEONG YEON KIM

Laboratory of Aquatic Biomedicine
College of Veterinary Medicine
Kyungpook National University
Daegu 41566, Korea



YOUNG SEO LEE

Laboratory of Aquatic Biomedicine
College of Veterinary Medicine
Kyungpook National University
Daegu 41566, Korea

Copyright © 2023 Global Seafood Alliance

All rights reserved.