

EXPLORANDO EL EFECTO DE COMPUESTOS FITOBIÓTICOS EN CAMARÓN PATIBLANCO: RESISTENCIA A LA PATOLOGÍA CAUSADA POR *Vibrio parahaemolyticus*



Hernández-Cabanyero, C.¹, Carrascosa, E.¹, Jiménez, S.², Jover, M.³ y Fouz, B.¹

¹Instituto Universitario en Biomedicina y Biotecnología. 46100, Burjassot, Valencia Universitat de València (UV).

²IGUSOL ADVANCE, S.A. Pol. Ind. Lentiscars. C/ La Losa, 7, 226370, Navarrete (La Rioja).

³Instituto Universitario Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València. Camino de Vera, s/n, 46022.

CONTEXTO

- La producción mundial del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) supone el **52,9%** de la producción mundial de crustáceos.
- Las **enfermedades infecciosas** son la principal amenaza del sector, siendo la **necrosis hepatopancreática aguda (AHPND)** una de las enfermedades emergentes más limitantes, causando pérdidas económicas millonarias desde 2010 (FAO, 2020).
- Agente etiológico:** cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que contienen el plásmido pVA1 (cepas Vp_{AHPND}), que codifica las toxinas PirAB_{Vp}. La bacteria coloniza el hepatopáncreas (HP) y libera las toxinas que provocan la lisis de las células hepatopancreáticas, la disfunción del HP y la muerte del animal (Tang et al., 2020).
- Diagnóstico:** signos clínicos (HP blanquecino), **histopatología** (necrosis de las células del HP, infiltración hemocítica, presencia de bacterias) y **técnicas moleculares** (detección de *pirAB*_{Vp}).
- Prevenir la enfermedad y minimizar sus efectos es una prioridad.** Las vacunas en invertebrados no son una opción (sistema inmunitario primitivo de los animales) y el **uso de antibióticos en acuicultura está muy restringido** (minimizar la aparición de bacterias resistentes).
- En el escenario sanitario "Una Sola Salud" (**One Health**) urge encontrar **estrategias alternativas** al uso de antibióticos, **seguras y sostenibles** desde el punto de vista ambiental y económico. Entre los candidatos prometedores están los **compuestos fitobióticos**, extractos de plantas que contienen compuestos bioactivos inocuos, con capacidad inmunoestimulante y biocida.

OBJETIVOS

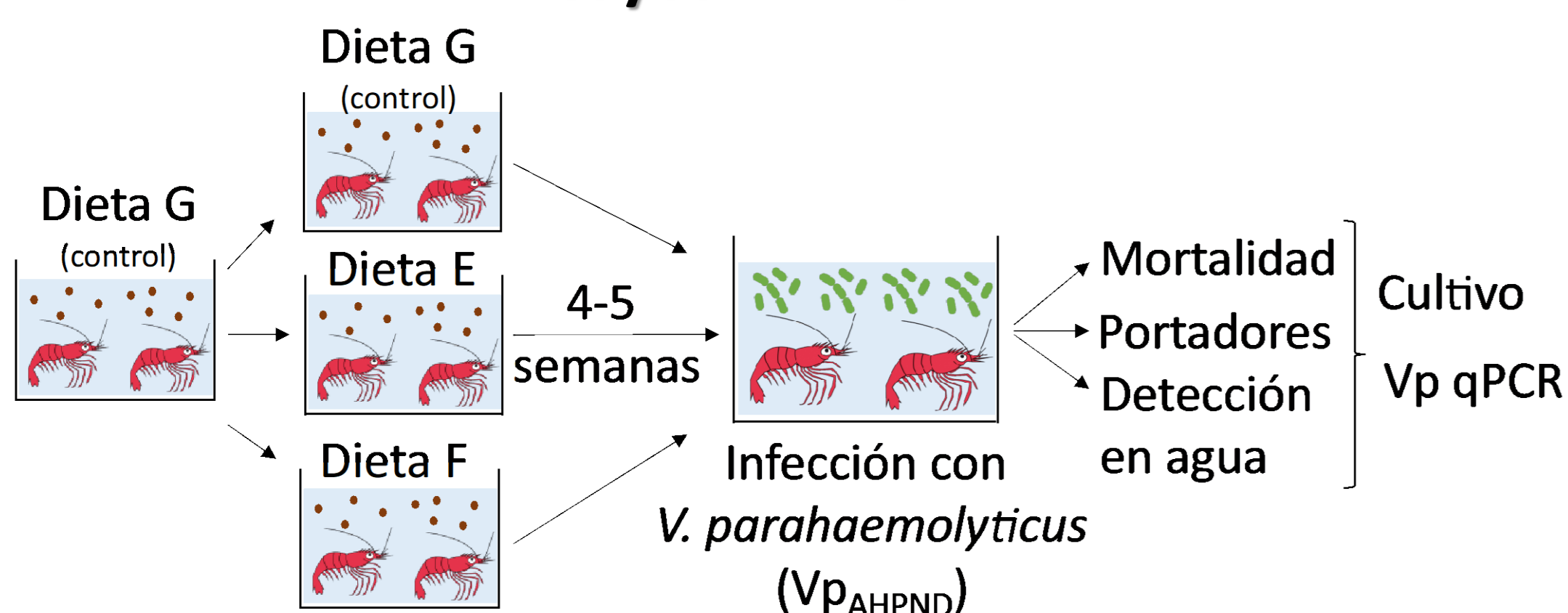
- Evaluar la eficacia de dietas funcionales, aditivadas con compuestos fitobióticos, en la protección del camarón patiblanco frente a la patología AHPND causada por cepas de *V. parahaemolyticus* que contienen el plásmido pVA1 (cepas Vp_{AHPND}).**
- Diseñar e implementar un protocolo de qPCR para la detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus* (Vp-qPCR) en camarones y en muestras de agua.**

DISEÑO EXPERIMENTAL

Optimización de Vp-qPCR

- Cebadores (5'-3'):**
 - P_{FW}: AACCGTGGCGTTCCAGAA ; P_{RV}: CCGTCAAACGAATCAGTGCTT
- Programa:**
 - Etapa inicial o sostenida: 95°C, 5 min
 - Etapa cíclica: 40 ciclos (95°C, 15 seg; 60°C, 1 min)
 - Etapa de curva de fusión: 95°C, 15 seg; 60°C, 1 min; 95°C, 15 seg
- Evaluación de especificidad (frente a especies patógenas de *Vibrio*)**
- Evaluación de sensibilidad (AND purificado y cultivos de *V. parahaemolyticus*)**

Ensayos *in vivo*



- 3 grupos de 12-16 animales (peso medio = 1 g) alimentados con:**
 - Dieta G (control)
 - Dieta E (suplementada con 0,9 g de fitobiótico E/Kg*)
 - Dieta F (suplementada con 0,8 g de fitobiótico F/Kg*)
- *Aditivos microencapsulados con un 30% de aceites esenciales (IguSol Advance SA.)
- 2 ensayos de infección con cepa Vp_{AHPND} (dosis: 5 x 10⁷ ufc/mL) (3 réplicas/dieta):**
 - Ensayo 1: tras alimentación durante 4 semanas
 - Ensayo 2: tras alimentación durante 5 semanas
- Control de mortalidad durante 5 días:** métodos culturales y Vp-qPCR
- Control de animales supervivientes:** sanos/portadores (Vp-qPCR a partir de Hepatopáncreas, HP)
- Valoración de carga del patógeno en agua de tanque (Vp-qPCR)**

CONCLUSIONES

- La alimentación de camarones con la **dieta suplementada con el fitobiótico E durante 4-5 semanas:**
 - reduce **significativamente** la mortalidad tras la infección con *Vibrio parahaemolyticus*.
 - previene la colonización por *V. parahaemolyticus* (reduce el porcentaje de animales portadores).
- El método **Vp-qPCR** es altamente **específico y sensible**. Podría ser utilizado para detectar *V. parahaemolyticus* en **sistemas acuícolas** sin necesidad de sacrificar animales, contribuyendo a prevenir la enfermedad AHPND.
- La administración de **dietas funcionales** que contienen **fitobióticos** podría ayudar a **prevenir enfermedades infecciosas emergentes, y potencialmente zoonóticas**, contribuyendo a reducir el uso de antibióticos en acuicultura y, en consecuencia, la aparición de resistencias a estos antimicrobianos.

RESULTADOS

Experimentos *in vitro*: optimización de qPCR para la detección y cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus* (Vp-qPCR)

1. Especificidad

La metodología Vp-qPCR optimizada presenta **alta especificidad** para detectar *V. parahaemolyticus*, frente a otras especies patógenas del género *Vibrio* (tabla 1).

Tabla 1. Ensayo qPCR específico para *Vibrio parahaemolyticus* (Vp-qPCR) realizado con ADN de especies del género *Vibrio*.

Especie bacteriana (ADN)	Valor de CT (Vp-qPCR)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12,32
<i>V. harveyi</i>	35,56
<i>V. vulnificus</i>	34,48
Control negativo (H ₂ O)	33,12

2. Sensibilidad

La metodología Vp-qPCR optimizada presenta **alta sensibilidad** para detectar *V. parahaemolyticus* en muestras de ADN purificado (Fig. 1) y cultivos (Fig. 2) de *V. parahaemolyticus* (cepa Vp_{AHPND}).

Límites de detección

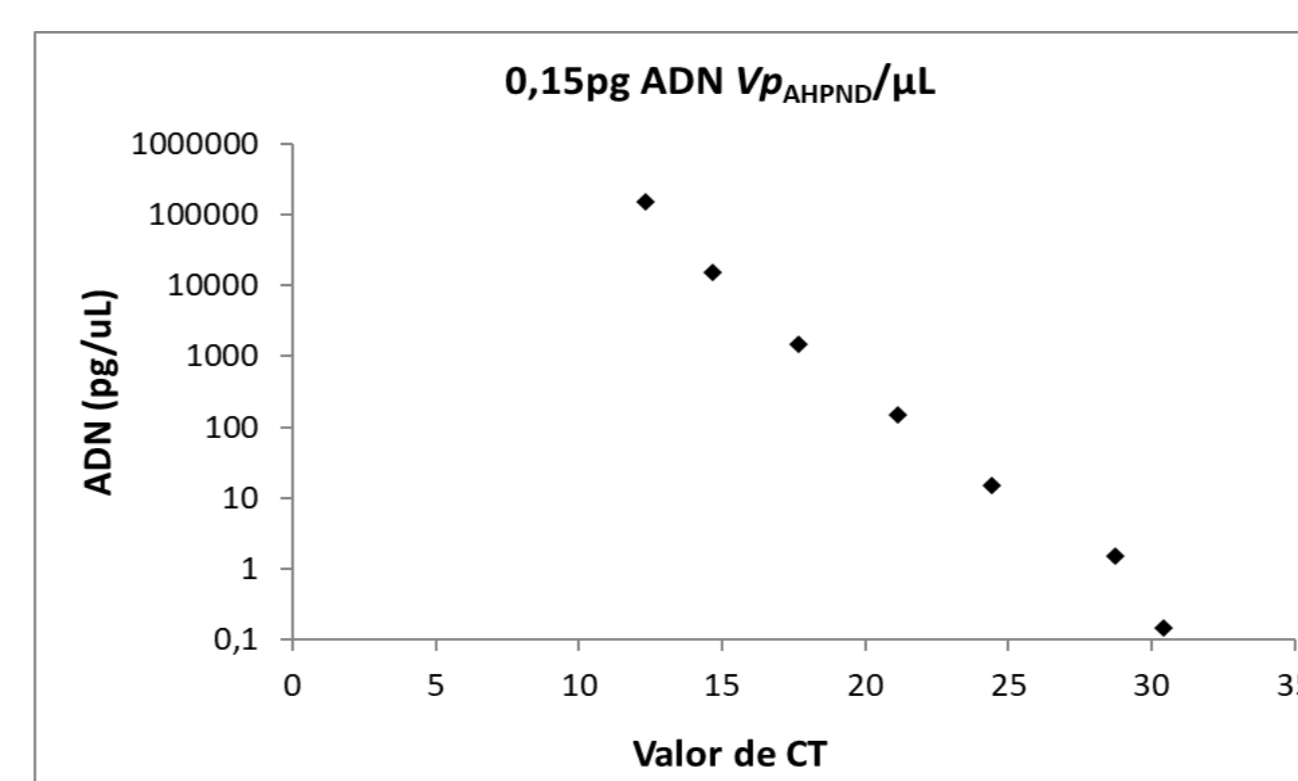


Figura 1. Curva patrón construida a partir de los valores de CT obtenidos en Vp-qPCR de muestras de ADN de Vp_{AHPND}.

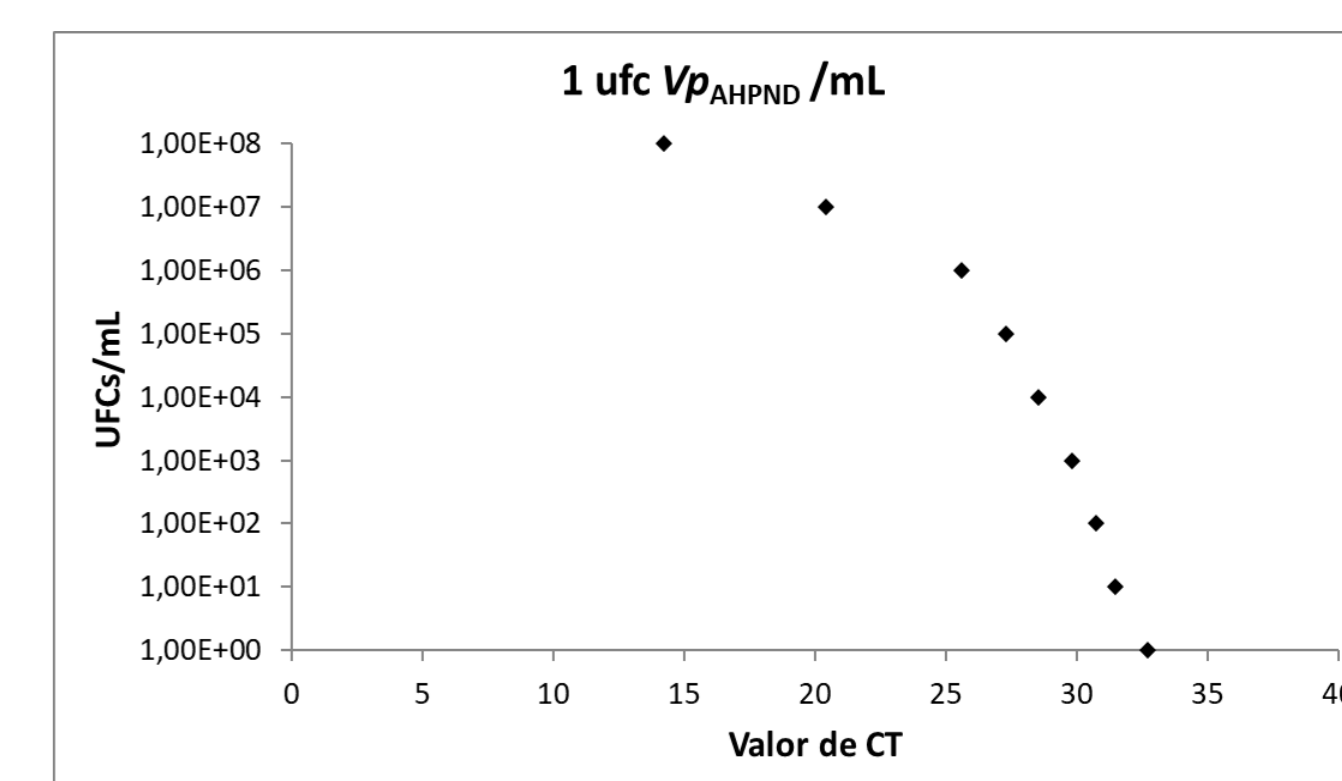


Figura 2. Curva patrón construida a partir de los valores de CT obtenidos en Vp-qPCR de cultivos (ufc/mL) de Vp_{AHPND}.

Ensayos de infección *in vivo*: eficacia de dietas funcionales en la prevención de AHPND

1. Mortalidad

En el grupo alimentado con la **dieta E** la mortalidad **disminuyó significativamente** (*) en comparación con el grupo control (dieta G) en los 2 ensayos de infección (Fig. 3).

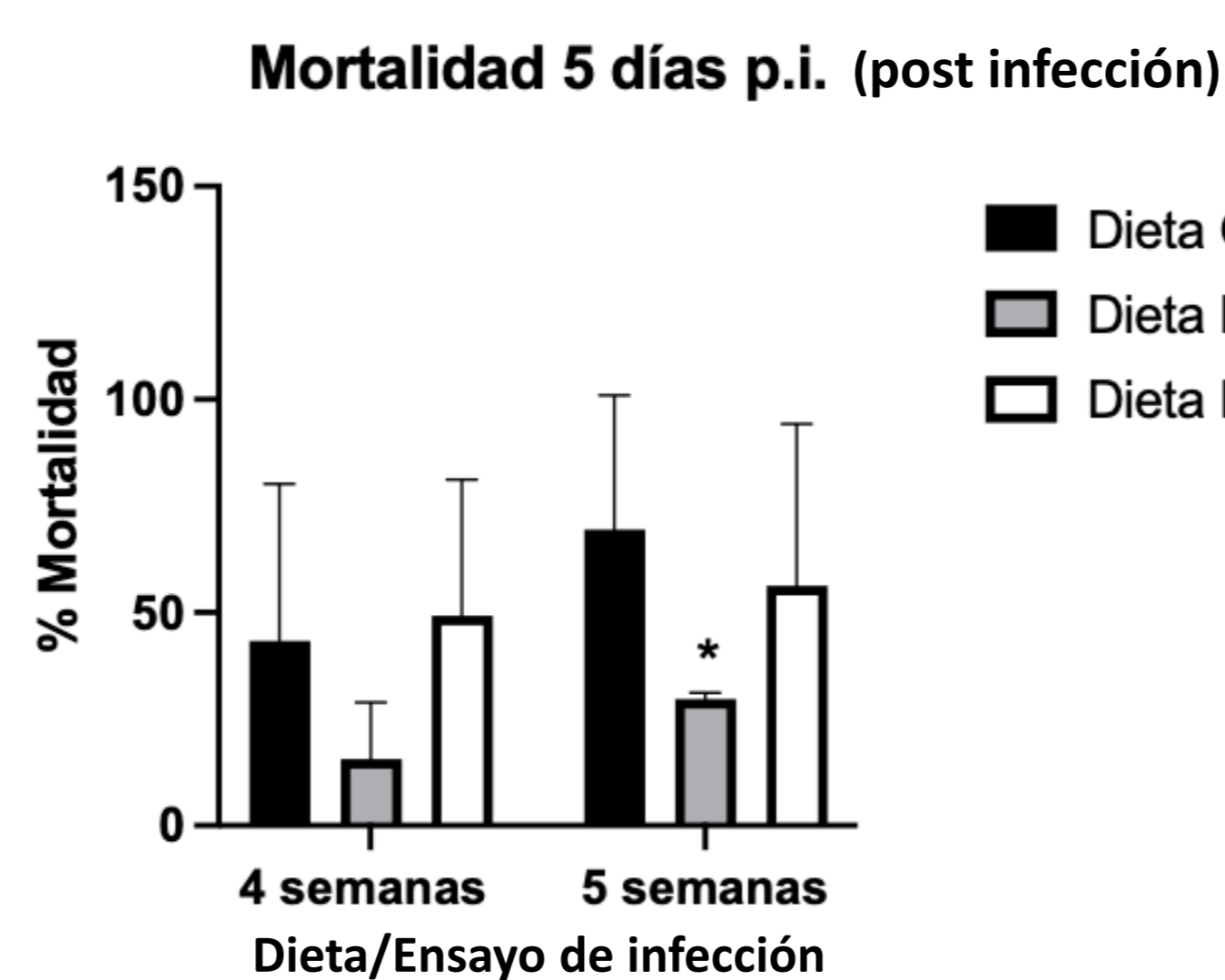


Figura 3. Mortalidad media (%) en camarones alimentados con dietas funcionales sometidos a ensayos de infección con *Vibrio parahaemolyticus* (cepa Vp_{AHPND}).

2. Animales supervivientes portadores

2A. Empleando la Vp-qPCR (muestras de HP) se estableció el porcentaje de supervivientes portadores (Fig. 4):

- Ensayo 1 (tras 4 semanas de alimentación): no hubo diferencias significativas entre grupos.
- Ensayo 2 (tras 5 semanas de alimentación): disminuyó **significativamente** (*) el porcentaje de portadores en el grupo alimentado con la **dieta E**.

Supervivientes portadores

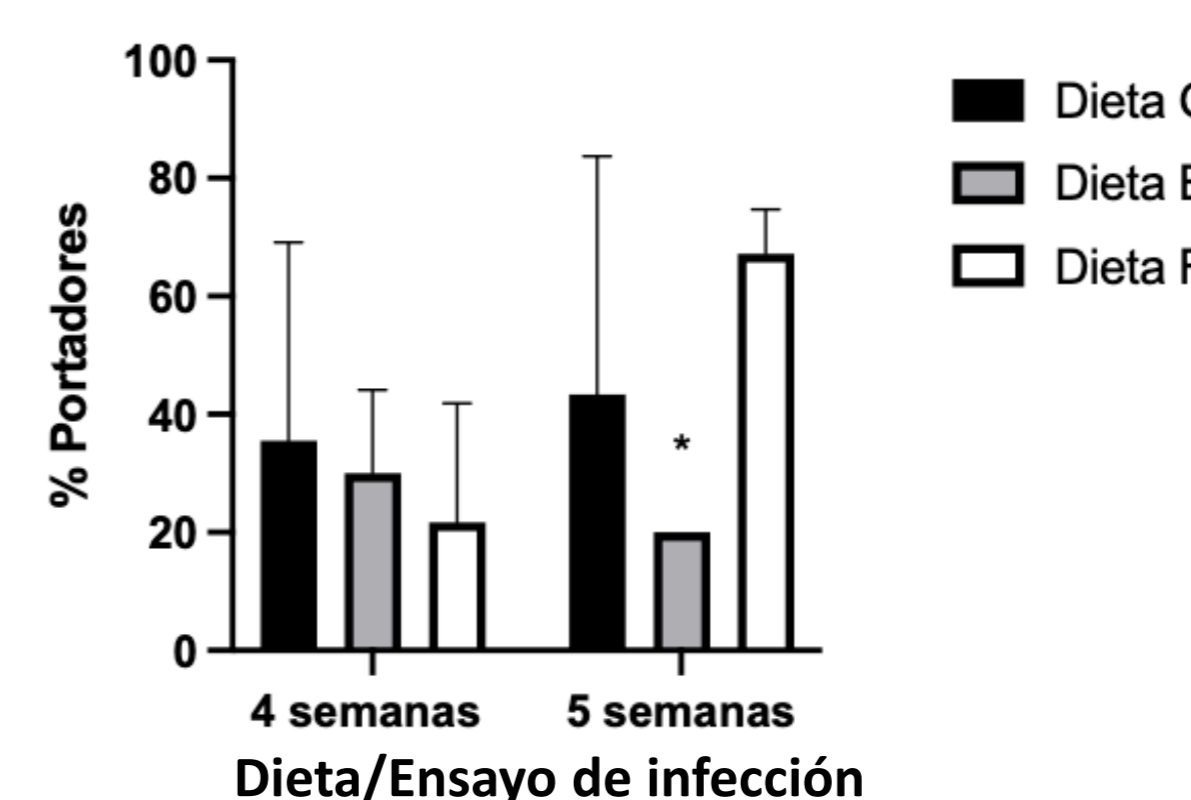


Figura 4. Porcentaje medio de animales portadores 5 días post-infección alimentados con dietas funcionales supervivientes a la infección con *Vibrio parahaemolyticus* (cepa Vp_{AHPND}).

2B. Empleando la Vp-qPCR (muestras de HP) se valoró la carga bacteriana en animales supervivientes (Tablas 2 y 3):

Tabla 2. Categorías de animales portadores según su carga bacteriana (valores de CT y ufc/g de HP).

HP de camarones	Rango de CT (Vp-qPCR)	Vp _{AHPND} (ufc/g HP)	Categoría portadores
Muertos (enfermos)	14-27	5x10 ³ – 1x10 ⁹	
	14-36	1x10 ⁶ – 1x10 ⁹	Carga alta
Supervivientes	26-29	1x10 ³ – 1x10 ⁶	Carga media
	29-33	10 – 1x10 ³	Carga baja
	33-36	<10	No portador

Tabla 3. Categorías (carga bacteriana) de camarones portadores en los dos ensayos de infección con *Vibrio parahaemolyticus* (cepa Vp_{AHPND}).

Ensayo de infección con cepa Vp _{AHPND}	Dieta	Categoría portadores
1 (tras 4 semanas de alimentación)	G (control)	Baja-media
	E	Media-alta
	F	Baja-media
2 (tras 5 semanas de alimentación)	G (control)	Media-alta
	E	Media-alta
	F	Baja-media

3. Detección y carga bacteriana (*Vibrio parahaemolyticus*) en agua de tanque

El patógeno se detectó en el agua de los acuarios de mantenimiento de los camarones infectados a lo largo del periodo post-infección (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del ensayo de Vp-qPCR con ADN extraído de muestras de agua de acuarios con camarones infectados con *Vibrio parahaemolyticus* (cepa Vp_{AHPND}).

Días post-infección	Rango de CT (Vp-qPCR)	Vp _{AHPND} (ufc/mL agua)
0 (previo a infección)	34-35	0
1	22-25	5x10 ³ – 3x10 ⁶
2	21-29	5x10 ³ – 5x10 ⁶
3	23-29	5x10 ³ – 5x10 ⁶

REFERENCIAS

- Bondad-Reantaso et al., M G, McGladdery, S E, East, I, y Subasinghe, RP. 2001. Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. In FAO Fisheries Technical Paper No.402 (p. 240).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. In Nature and Resources (Vol. 35, Issue 3).
- Tang, K.F.J, Bondad-Reantaso, MG, Arthur, JR, MacKinnon, B, Hao, B, Alday-Sanz, V, Liang, Y, y Dong, X. 2020. Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1190.

FINANCIACIÓN

Proyecto "Fitobióticos para la mejora de la salud, rendimiento productivo y reducción en el uso de antibióticos en acuicultura (PhytoAqua)", Programa de Cooperación Tecnológica Internacional (PCTI) del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) (IDI-20200081).

