

Efecto del ImmunoWall® en la Resistencia Contra el EMS en el Camarón Blanco (*Litopenaeus Vannamei*)

PhD Orapint Jintasataporn, Departamento de Acuicultura de la Universidad de Kasetsart, Bangkok, Tailandia, 2014

Ensayo solicitado por ICC Indl. Com. Exp. e Imp. Ltda.

El Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS) o Síndrome de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPNS) es una



enfermedad peligrosa causada por la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. Desde que se reportó el primer caso de EMS en China en el 2009, la enfermedad se expandió a Vietnam, Malasia, Tailandia y México, causando pérdidas anuales de más de US \$ Mil millones. Los brotes de EMS típicamente ocurren dentro de los primeros 30 días después de la siembra de camarones en un estanque nuevo y la mortalidad puede superar el 70%.

La enfermedad se transmite por vía oral y coloniza el tracto gastrointestinal del camarón. Ello genera una toxina que causa la destrucción del tejido y la disfunción del órgano digestivo de los camarones, conocido como hepatopáncreas. El objetivo de este ensayo fue evaluar el efecto del ImmunoWall® como aditivo capaz de reducir el impacto en los juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) infectados por la bacteria *Vibrio parahemolyticus* agente del EMS.

Para el estudio se asignaron 3 tratamientos:

- a) Alimento comercial estándar para el camarón vannamei
- b) Alimento comercial con 5 kg de ImmunoWall® por tonelada de alimento.
- c) Alimento comercial con 10 kg de ImmunoWall® por tonelada de alimento.

Camarón blanco saludable – Los camarones PL 8 fueron adquiridos de un criadero comercial en la provincia de Chachoengsao. Los camarones se aclimataron durante 5 días antes de asignarlos a los tanques de tratamiento previo al inicio de la prueba. Los camarones PL12 se destinaron a una pecera de cristal 100 L, con una salinidad de 20 ppt. La densidad de población de los animales de experimentación fue de 180 camarones PL12 por acuario (360ind./m²). La frecuencia de alimentación fue de 4 veces al día - 07.00, 11.00, 15.00 y 19.00 horas.

La composición del alimento se muestra en la Tabla 1. La composición proximal del alimento de prueba, como la humedad, proteínas, lípidos, fibras y cenizas, se analizó como se ha descrito por la AOAC (2000).

Tabla 1. Composición de la dieta experimental

<i>Materiales</i>	<i>Control</i>	<i>ImmunoWall® 0.5%</i>	<i>ImmunoWall® 1.0%</i>
Harina de pescado, atún	25	25	25
Harina de camarón	10	10	10
Harina de calamar	8	8	8
Harina de trigo	29.3	28.8	28.3
Harina de soja 45%	10	10	10
ImmunoWall®	0	0.5	1.0
Gluten de trigo	12	12	12
Aceite de pescado -Atún	0.5	0.5	0.5
Aceite de soja	0.5	0.5	0.5
Aceite de hígado de calamar	0.5	0.5	0.5
Lecitina de soja	1	1	1
Polimetil carbamida	0.7	0.7	0.7
Premezcla de Vitaminas- minerales	2.5	2.5	2.5
Suma	100	100	100
<i>Composición Proximal según AOAC (2000)</i>			
Humedad (%)	6.82	6.59	6.69
Proteína (%)	46.53	46.13	46.58
Lípido (%)	5.11	5.52	5.20
Fibra (%)	1.87	1.95	1.93
Ceniza (%)	10.91	10.78	10.92
Calcio (%)	2.38	2.35	2.56

ICC Brasil

Av. Brigadeiro Faria Lima, 1768 – CJ 4C
01451-909 - Sao Paulo/SP – Brazil
Phone: +55 11 3093-0791
faleconosco@iccbrazil.com.br
www.iccbrazil.com

Fósforo (%)	1.37	1.46	1.40
Energía bruta/Kg)	4706.53	4716.68	4712.31

Temperatura y Tolerancia al estrés de salinidad

Los camarones se trasladaron con el fin de estudiar la tolerancia al estrés a una temperatura de 35 °C. Cada tratamiento se replicó 4 veces y se utilizaron 10 camarones por replicación. La temperatura en condición de prueba aumenta continuamente hasta 35 °C y se controla a esta temperatura. La tasa de mortalidad se registró diariamente durante 10 días.



La tolerancia al estrés de salinidad se realizó a 35 ppt. Los camarones se trasladaron a la unidad de prueba y se mantuvieron en estas condiciones. Cada tratamiento se replicó 3 veces y se utilizaron 15 camarones por replicación. La tasa de mortalidad se registró diariamente durante 10 días.

Desafío a la enfermedad

Después de los 30 días a partir del período inicial, se transfirieron los animales de experimentación en cada tratamiento al desafío en el acuario (20 ind.). Cada tratamiento se replicó 4 veces. Las bacterias virulentas, *Vibrio parahaemolyticus*, se desafiaron por tratamiento por inmersión para determinar la capacidad de resistencia de los camarones contra estas bacterias patógenas.

Cultivo de *Vibrio parahaemolyticus*

Un día antes del desafío, se cultivó el *Vibrio parahaemolyticus* en caldo nutriente con 1,5% de Na Cl (w / v). Treinta horas después del cultivo, se centrifugó el caldo para obtener las células de las bacterias. El patógeno se lavó 2-3 veces y se ajustó a 10^{12} antes de usarlo.

Tratamiento por inmersión

La prueba de desafío del *Vibrio parahaemolyticus* se estudió a través del tratamiento por inmersión en condiciones normales y bajo condiciones de estrés por salinidad, un día antes del desafío.

Se seleccionaron ochenta camarones al azar de cada tratamiento y se transfirieron a la población del acuario de 50 L, con un nivel de agua de 20 L y 20 ppt de agua de mar en condiciones normales. La prueba desafío se replicó 4 veces por tratamiento, con veinte camarones por replicación. Los camarones se desafiaron a través del tratamiento de inmersión, con una dosis de infección de 1.0 a 2.9×10^{12} CFU/mL. Al agua se le suministró una aireación fuerte durante el desafío. La tasa de mortalidad se registró diariamente durante 10 días y se contabilizó el *Vibrio spp.* desde el hepatopancreas de cada grupo después de 5 días de desafíos a través del método agar

ICC Brasil

Av. Brigadeiro Faria Lima, 1768 – CJ 4C
01451-909 - Sao Paulo/SP – Brazil
Phone: +55 11 3093-0791
faleconosco@iccbrazil.com.br
www.iccbrazil.com

TCB, para confirmar el patógeno y la inmunidad de los camarones para defenderse por sí mismos de las bacterias.

Para las condiciones de estrés por salinidad y el desafío por inmersión, se transfirieron cuarenta y cinco camarones de cada tratamiento a los acuarios de 50 L, con un nivel de agua de 20 L y 5 ppt de agua de mar. La prueba desafío se replicó 4 veces por tratamiento con 15 camarones por replicación. Los camarones se desafiaron a través del tratamiento por inmersión, con dosis de infección de 3,0 a 3,5 x 10¹² CFU/mL. Se suministró una fuerte aireación al agua durante el desafío. La tasa de mortalidad se registró diariamente durante 10 días. El *Vibrio Spp.* se contabilizó en el hepatopáncreas de cada grupo después de 5 días de desafíos a través del método agar TCB, para confirmar el patógeno y la inmunidad de los camarones para defenderse a por sí mismos de las bacterias.

Este estudio se realizó con un diseño completamente al azar (CRD). Todos los datos se analizaron a través de ANOVA de una vía (análisis de varianza). La Prueba de Rango Múltiple de Duncan se utilizó para determinar las diferencias entre la investigación de los medios de tratamientos. Las investigaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición y Alimentos Acuícolas del Departamento de Acuicultura de la Facultad de Pesca de la Universidad de Kasetsart, Bangkok, Tailandia.

Resultados.

La temperatura y la tolerancia al estrés por salinidad del camarón blanco alimentado con diferentes dietas se presentan en la Tabla 3 y 4. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en la mortalidad de los camarones expuestos a estas temperaturas y al estrés de salinidad durante los 10 días. Las altas temperaturas de 35 °C indujeron alguna mortalidad durante los 4 primeros días, después de ese tiempo, los camarones pudieron tolerar esta condición. En cuanto al estrés por salinidad, todos los camarones sobrevivieron a esta condición, lo cual que significa que los camarones pueden adaptar su fisiología en esta salinidad.

Tabla 3. Tasa de mortalidad acumulada (porcentaje) del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) ante la prueba de estrés por temperatura 35°C.

Día después del Desafío	Control	ImmunoWall® 0.5%	ImmunoWall® 1.0%	Valor -P
Tasa de Mortalidad (%)	60.00 ^a	57.50 ^a	47.50 ^a	0.816
Tasa de Supervivencia (%)	40.00 ^a	42.50 ^a	52.50 ^a	0.816

Nota:^{a,b} Los valores con letras distintas en una fila muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tabla 4. Tasa de mortalidad acumulada (porcentaje) del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) ante la prueba de estrés por salinidad a 35 ppt.

Día después del estrés	Control	ImmunoWall® 0.5%	ImmunoWall® 1.0%	Valor -P
Tasa de Mortalidad (%)	0	0	0

ICC Brasil

Av. Brigadeiro Faria Lima, 1768 – CJ 4C
01451-909 - Sao Paulo/SP – Brazil
Phone: +55 11 3093-0791
faleconosco@iccbrazil.com.br
www.iccbrazil.com

Tasa de Supervivencia (%)	100	100	100
---------------------------	-----	-----	-----	-------

Nota: Los valores en cada tratamiento fueron los mismos. No hubo análisis estadístico.

Las tablas 5 y 6 se centran en el efecto del ImmunoWall® sobre la resistencia a las enfermedades del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) mediante el tratamiento de inmersión. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) después del desafío con *Vibrio parahaemolyticus* bajo condiciones normales y con estrés de salinidad.

En condiciones normales (tabla 5), la tasa de mortalidad del grupo de control fue mayor ($p < 0,05$) que la del grupo de camarones alimentados con ImmunoWall®. El conteo de *Vibrio spp.* en el hepatopáncreas del camarón, después del desafío, demostró que el grupo de camarones alimentados con 1% ImmunoWall® tenía capacidad de hemolinfa para defenderse contra las bacterias virulentas, seguido por el grupo alimentado con 0,5% de ImmunoWall® y el grupo de control, respectivamente.

Bajo condición de estrés de 35 ppt, la mortalidad de los camarones después del desafío por *Vibrio parahaemolyticus* (Tabla 6) mostró diferencias significativas ($p < 0,05$). Los camarones alimentados con ImmunoWall® exhibieron una baja mortalidad ($p < 0,05$). El conteo de *Vibrio spp.* en el hepatopáncreas de los camarones después de ser desafiados demostraron que el grupo de camarones alimentados con el 1% ImmunoWall® tenían una mejor capacidad de hemolinfa para la defensa contra bacterias virulentas que los alimentados con 0,5% de ImmunoWall® y el grupo de control, respectivamente.

Tabla 5. Tasa de mortalidad acumulada (en porcentaje) del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) desafiado por el tratamiento de inmersión con una dosis de *Vibrio parahaemolyticus* de 10^{12} cfu/ml.

Día después del desafío	Control	ImmunoWall® 0.5%	ImmunoWall® 1.0%	Valor -P
día1	0.0	0.0	0.0	...
día2	6.3 ^a	2.5 ^b	0.0 ^b	0.003
día3	11.3 ^a	6.3 ^b	2.5 ^{bc}	0.001
día4	15.0 ^a	6.3 ^b	5.0 ^b	0.008
día5	18.8 ^a	6.3 ^b	6.3 ^b	0.004
día 6	18.8 ^a	6.3 ^b	6.3 ^b	0.007
día7	18.8 ^a	7.5 ^b	6.3 ^b	0.010
día8	18.8 ^a	7.5 ^b	6.3 ^b	0.010
día9	18.8 ^a	7.5 ^b	6.3 ^b	0.010
día10	20.0 ^a	7.5 ^b	6.3 ^b	0.004

ICC Brasil

Av. Brigadeiro Faria Lima, 1768 – CJ 4C
01451-909 - Sao Paulo/SP – Brazil
Phone: +55 11 3093-0791
faleconosco@iccbrazil.com.br
www.iccbrazil.com

Tasa de Mortalidad (%)	20.0 ^a	7.5 ^b	6.3 ^b	0.004
Conteo de <i>Vibrio spp.</i> (cfu/g)	2.6X10 ^{4a}	3.2 X10 ^{3c}	1.3 X10 ^{3c}	<0.001
Conteo de <i>Vibrio spp.</i> (Log cfu/g)	4.41 ^a	3.50 ^c	3.12 ^d	<0.001

Nota: a, b Los valores con letras distintas en una fila muestran diferencias significativas (P < 0.05).

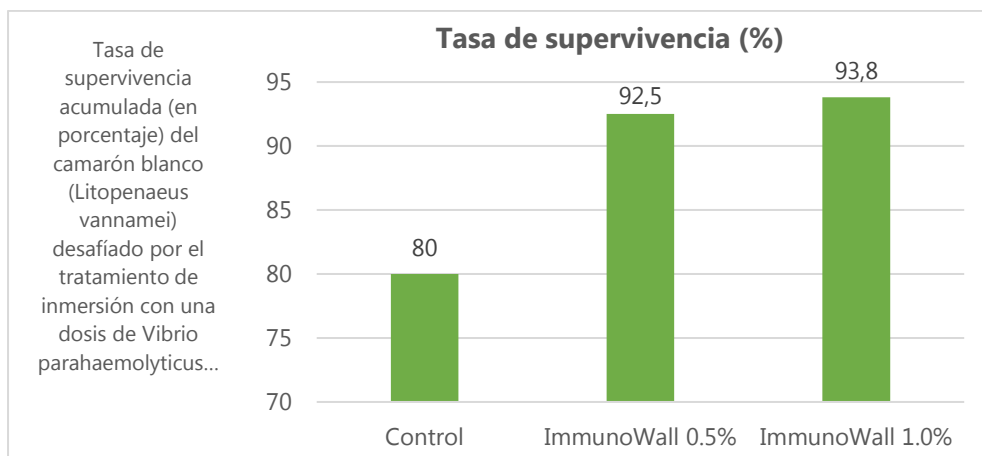


Tabla 6. Tasa de mortalidad acumulada (en porcentaje) del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) desafiado con la prueba de salinidad a 35 ppt y con el tratamiento de inmersión, con una dosis infectada de *Vibrio parahaemolyticus* de 10¹²cfu/ml

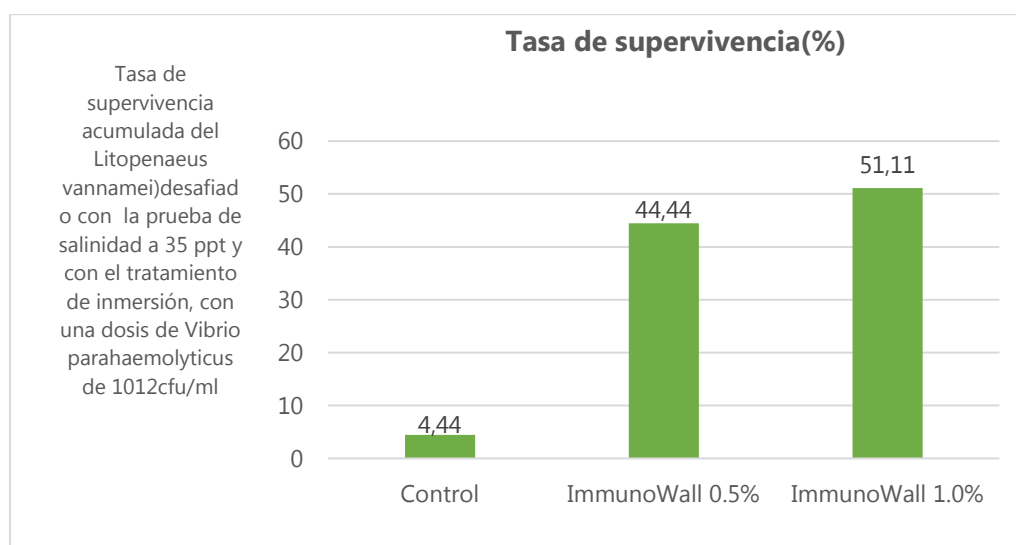
Días después del estrés	Control	ImmunoWall® 0.5%	ImmunoWall® 1.0%	Valor -P
día1	51.11 ^a	28.89 ^b	24.44 ^b	0.020
día2	66.67 ^a	42.22 ^b	35.56 ^b	0.020
día3	73.33 ^a	48.89 ^b	40.00 ^{bc}	<0.001
día4	82.22 ^a	53.33 ^b	44.44 ^{bc}	<0.001
día5	86.67 ^a	53.33 ^b	46.67 ^b	<0.001
día6	93.33 ^a	55.56 ^b	48.89 ^b	<0.001
día7	95.56 ^a	55.56 ^b	48.89 ^b	<0.001
día8	95.56 ^a	55.56 ^b	48.89 ^b	<0.001
día9	95.56 ^a	55.56 ^b	48.89 ^b	<0.001
día10	95.56 ^a	55.56 ^b	48.89 ^b	<0.001
Tasa de Mortalidad (%)	95.56 ^a	55.56 ^b	48.89 ^b	<0.001

ICC Brasil

Av. Brigadeiro Faria Lima, 1768 – CJ 4C
01451-909 - Sao Paulo/SP – Brazil
Phone: +55 11 3093-0791
faleconosco@iccbrazil.com.br
www.iccbrazil.com

Conteo de <i>Vibrio spp.</i> (cfu/g)	9.6 X10 ^{6a}	2.5 X10 ^{6bc}	3.2 X10 ^{5d}	<0.001
Conteo de <i>Vibrio spp.</i> (Log cfu/g)	6.98 ^a	6.38 ^b	5.43 ^d	<0.001

Nota: a, b Los valores con letras distintas en una fila muestran diferencias significativas (P < 0.05).



Conclusión

El ImmunoWall® mostró ser muy eficaz en la reducción de la mortalidad de los camarones expuestos al estrés de temperatura, la alta salinidad y la inmersión con *Vibrio parahaemolyticus*, quien es el agente trasmisor del EMS.

Los mejores resultados se obtuvieron con ImmunoWall® para ambos niveles de inclusión asociados con la alta salinidad (35 ppt). Como el *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria halófila, que se desarrolla y prospera mejor en un medio de alta salinidad, el ImmunoWall® lo controla mediante, el aumento de la actividad inmune, mejorando la supervivencia de los camarones en un 50% en comparación con otras dietas sin este aditivo.

Para más información: ricardo.toledo@iccbrazil.com.br

ICC Brasil

Av. Brigadeiro Faria Lima, 1768 – CJ 4C
01451-909 - Sao Paulo/SP – Brazil
Phone: +55 11 3093-0791
faleconosco@iccbrazil.com.br
www.iccbrazil.com