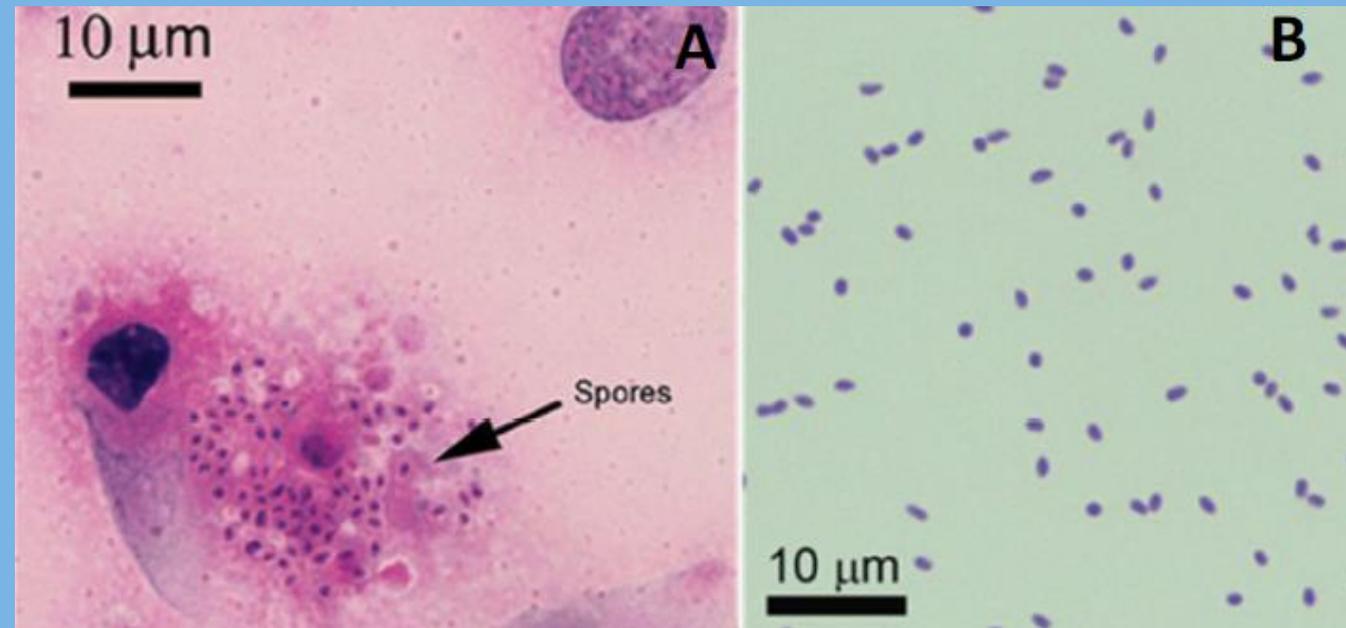


## La amenaza de EHP en América Latina y posibles soluciones para controlar o mitigar su impacto en la acuicultura del camarón *Penaeus vannamei*

- Actualización sobre la microsporidiosis hepatopancreática (HPM) causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)



NACA, 2015



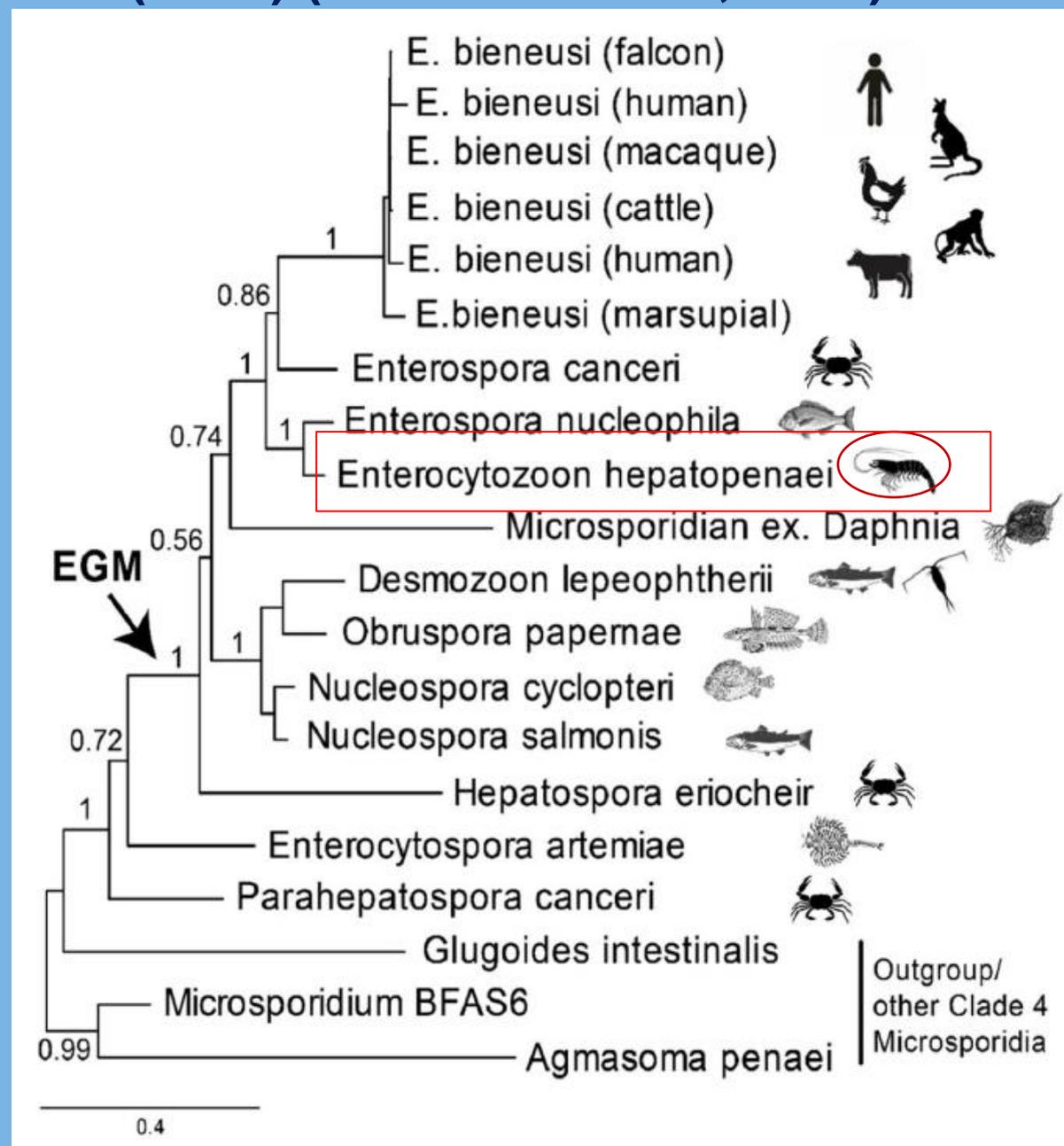
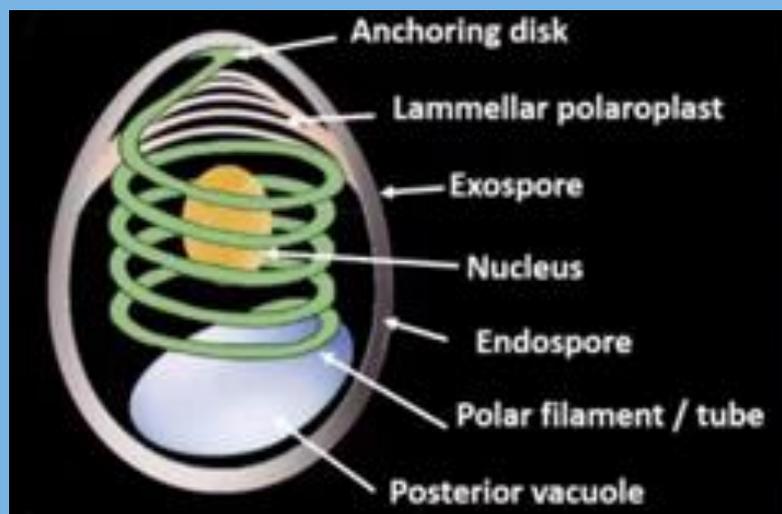
Prof. Shinn, 2021



## EHP - Taxonomía

### Enterocytozoon Group Microsporidia (EGM) (Stentiford et al., 2019)

- Filogenia y rango de hospedantes de miembros conocidos del EGM
- Microsporidios se clasifica dentro del Reino de los Hongos
- Esporas, unicelulares, parásitos obligados de animales, peces, insectos, crustáceos y humanos
- La infección de los miembros de EGM se limita al tracto gastrointestinal y a los órganos directamente asociados



## Antecedentes

- **Chaijarasphong et al., 2021**
  
- **Tailandia, 2004**
  - Primer reporte de microsporidio no identificado, en *Penaeus monodon* con retraso en el crecimiento y múltiples patógenos (MBV, HPV, IHHNV) (Chayaburakul et al.)
- **Tailandia, 2009**
  - *Enterocytozoon hepatopenaei* completamente caracterizado (Tourtip et al.)
  - Datos histológicos, ultraestructurales y filogenéticos (SSU rRNA genes)
- **Mediados-2010**
  - Aumento de la infección por EHP en *Penaeus vannamei* en la región Sureste de Asia,
- **Tailandia, 2013-2014 (Sanguanrut et al., 2018)**
  - Estudio de 196 estanques de cultivo para determinar los factores de riesgo asociados con EMS(AHPND)
  - Alta prevalencia 60% de los estanques fueron positivos para EHP por PCR anidada del hepatopáncreas a los 35 días de cultivo,
- **Brunei, 2015**
  - Reportado en *P. stylirostris* (Tang et al. 2015)
- **Tarjeta de la enfermedad de EHP (2015) emitida por NACA**



## Antecedentes

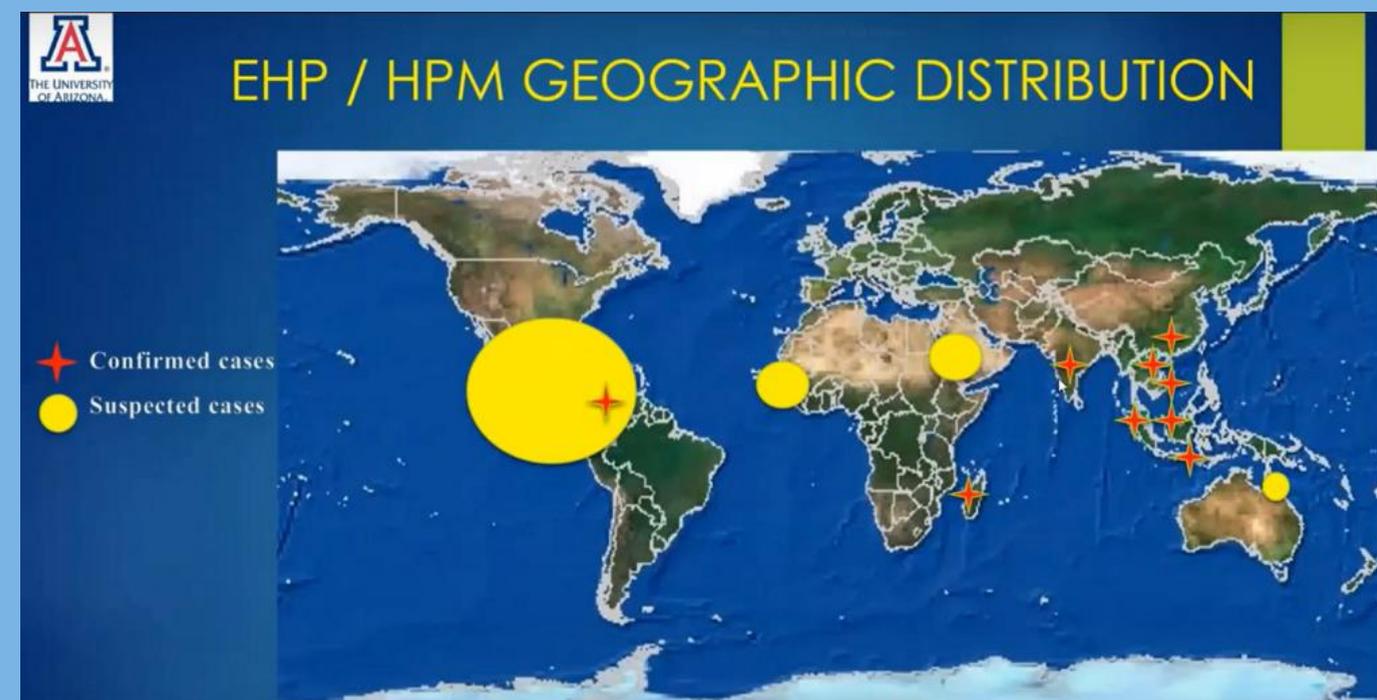
- Chaijarasphong et al., 2021; Aranguren et al. 2022

- **Rango de hospedero**

- *P. monodon*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*
- Sospechoso en *P. japonicus*

- **Distribución geográfica – EHP confirmado**

- Tailandia, Vietnam, Malasia, Brunéi, Indonesia, India and China
- Venezuela
- Madagascar



## Consulta en línea sobre estrategias para la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), 9-10/Feb/2021, NACA

- Dr Tim Flegel, Centex Shrimp, Tailandia

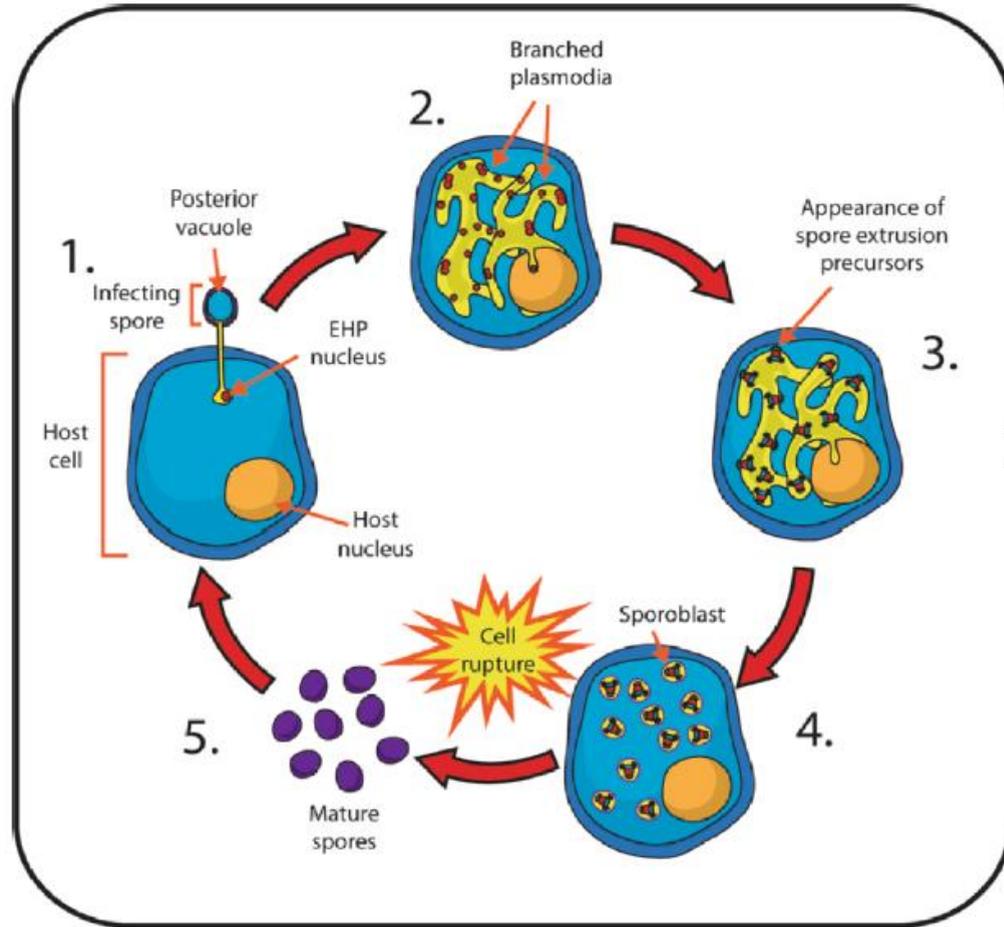
### Historia de *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

- **Naturaleza de EHP**

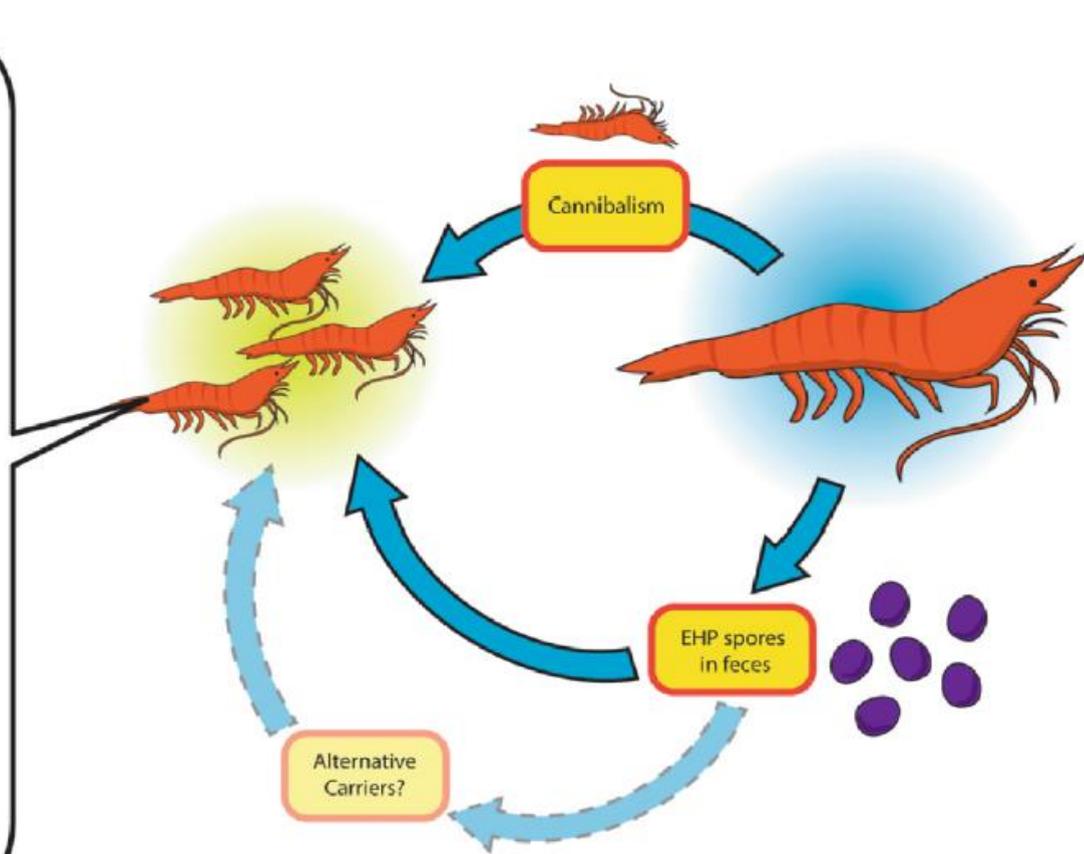
- EHP es un parásito microsporidio que infecta el hepatopáncreas de los camarones
- EHP causa microsporidiosis hepatopancreática (HPM)
- Asociado principalmente con retraso en el crecimiento (alto CV en tamaño y peso)
- No es letal, solo a una severidad muy alta y generalmente junto con vibrios patógenos
- No es la causa directa de WFS, pero puede ser un componente (Tangprasittipap et al. 2013)
- Al igual que los hongos, se reproducen y se propagan por esporas
- Tienen tamaños de genoma relativamente pequeños, como los de las bacterias (~ 3M bp)
- EHP no tiene mitocondrias u otras formas de producir ATP (Fuente de energía celular)
- EHP depende del hospedero para toda su energía

# Ciclo de Vida

■ Chaijarasphong et al., 2021



**Ciclo de vida**



**Transmisión horizontal**

## Patología de EHP

- Chaijarasphong et al., 2021

- **Ciclo de vida directo simple con un solo tipo de espora**
  - Transmisión horizontal entre un número limitado de especies de camarón penaeid
- **Transmisión horizontal por ingestión de esporas en estanques camaroneros**
  - Heces de camarones infectados con esporas de EHP
  - Canibalismo de camarones infectados
- **Transmisión horizontal demostrada en laboratorio**
  - Experimentos de convivencia
- **Se propuso la transmisión vertical (Vu-Khac et al., 2018)**
  - Falta de un examen histológico claro

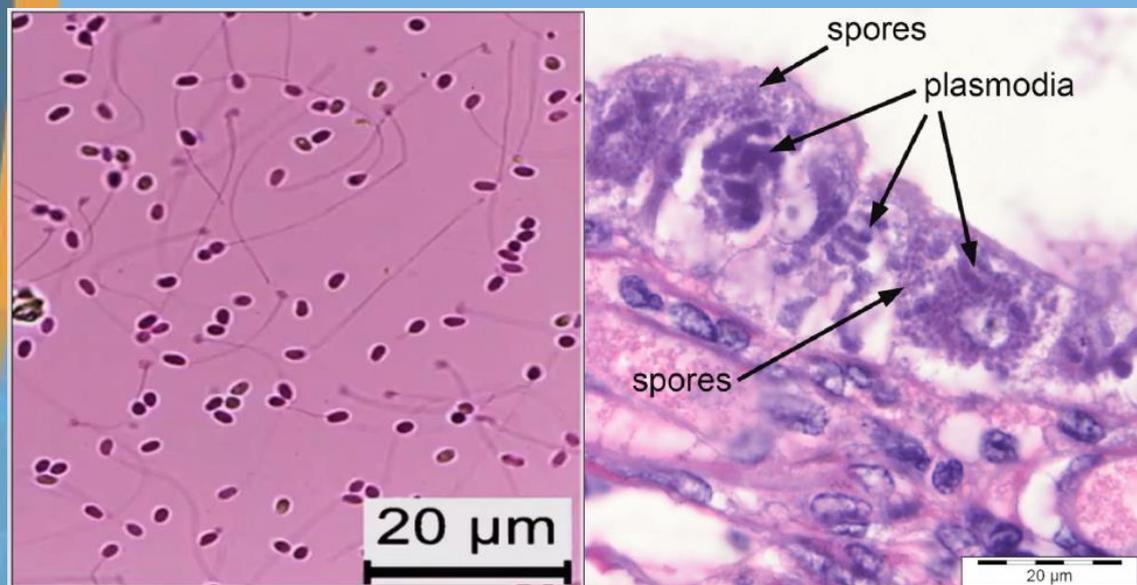
## Consulta en línea sobre estrategias para la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), 9-10/Feb/2021, NACA

- Dr K. Sritunyalucksana, Dr T Flegel (Tailandia)

### Detección de esporas de *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

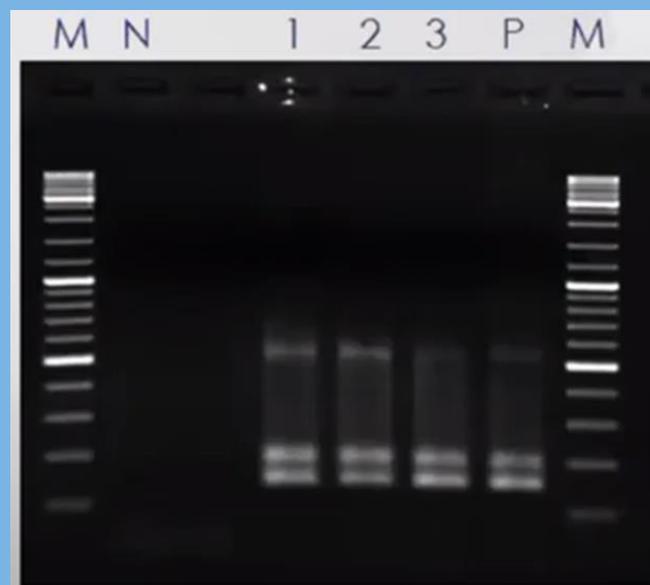
#### ■ Microscopía

- Preparación en fresco,
  - Tinción acuosa de floxina B al 2%,
- Histología



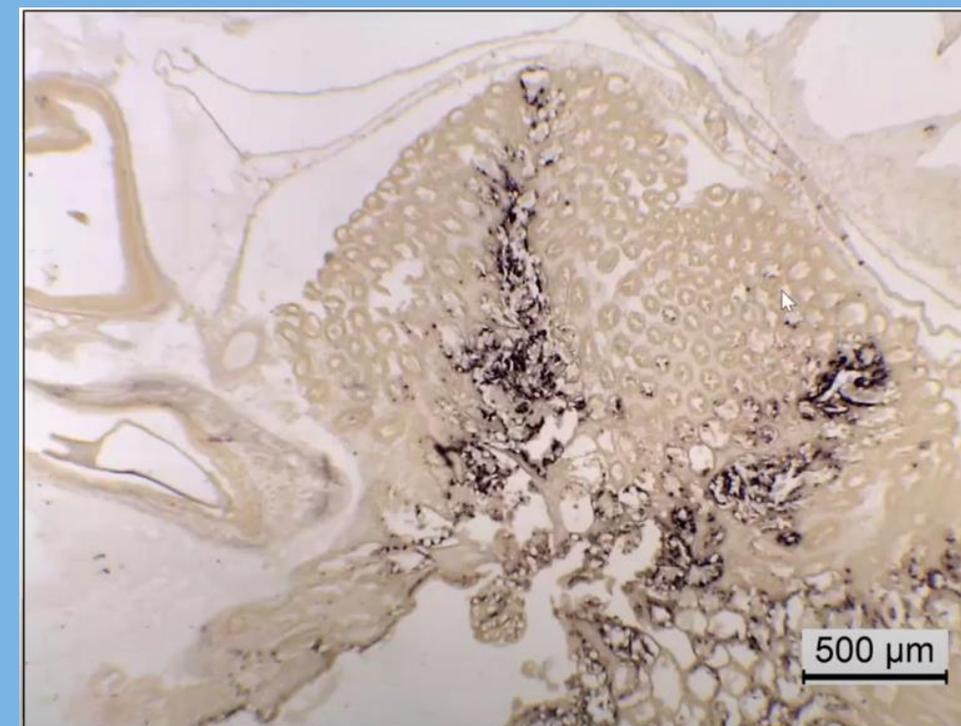
#### ■ PCR

- PCR de un paso
- qPCR
- PCR anidada
- EHP-SWP
- SSU r-RNA



#### ■ Hibridación in situ

- Distribución desigual de esporas en el HP
- Para qPCR debe homogeneizar todo HP y utilizar una submuestra



## Consulta en línea sobre estrategias para la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), 9-10/Feb/2021, NACA

- Dr K. Sritunyalucksana, BIOTEC, Tailandia

## Desarrollo de herramientas de investigación para el estudio de la patogénesis y control de EHP en Camarón (Biotec)

Genoma completo de EHP (Boakye, 2017)

Diagnóstico específico de EHP por el método de PCR anidada utilizando SWP-PCR (Jaroenlak et al. 2016) - Proteína de la pared de las esporas

environmental microbiology

Environmental Microbiology (2017) 19(5), 2077–2089

doi:10.1111/1462-2920.13734

**Decay of the glycolytic pathway and adaptation to intranuclear parasitism within Enterocytozoonidae microsporidia**

Dominic Wiredu Boakye,<sup>1</sup> Pattana Jaroenlak,<sup>2,3</sup> Anuphap Prachumwat,<sup>4</sup> Tom A. Williams,<sup>5</sup> Kelly S. Bateman,<sup>6</sup> Ornchuma Itsathitphaisarn,<sup>2,3</sup> Kallaya Sritunyalucksana,<sup>4</sup> Konrad H. Paszkiewicz,<sup>1</sup> Karen A. Moore,<sup>1</sup> Grant D. Stentiford<sup>6\*</sup> and Bryony A. P. Williams<sup>1\*</sup>

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

**A Nested PCR Assay to Avoid False Positive Detection of the Microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in Environmental Samples in Shrimp Farms**

Pattana Jaroenlak<sup>1,2</sup>, Piyachat Sanguanrut<sup>2,3</sup>, Bryony A. P. Williams<sup>4</sup>, Grant D. Stentiford<sup>5</sup>, Timothy W. Flegel<sup>2,6</sup>, Kallaya Sritunyalucksana<sup>3,6</sup>, Ornchuma Itsathitphaisarn<sup>1,2\*</sup>

## Consulta en línea sobre estrategias para la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), 9-10/Feb/2021, NACA

- Dr K. Sritunyalucksana, BIOTEC, Tailandia

### Reservorios ambientales de esporas EHP

- Mejillones (*Mytilopsis* sp.)
- *Artemia* sp
- Poliqueto (*Nantia* sp.)
- Copépodo
- Muestras ambientales y alimentos vivos
  - Detección de EHP por PCR usando SWP

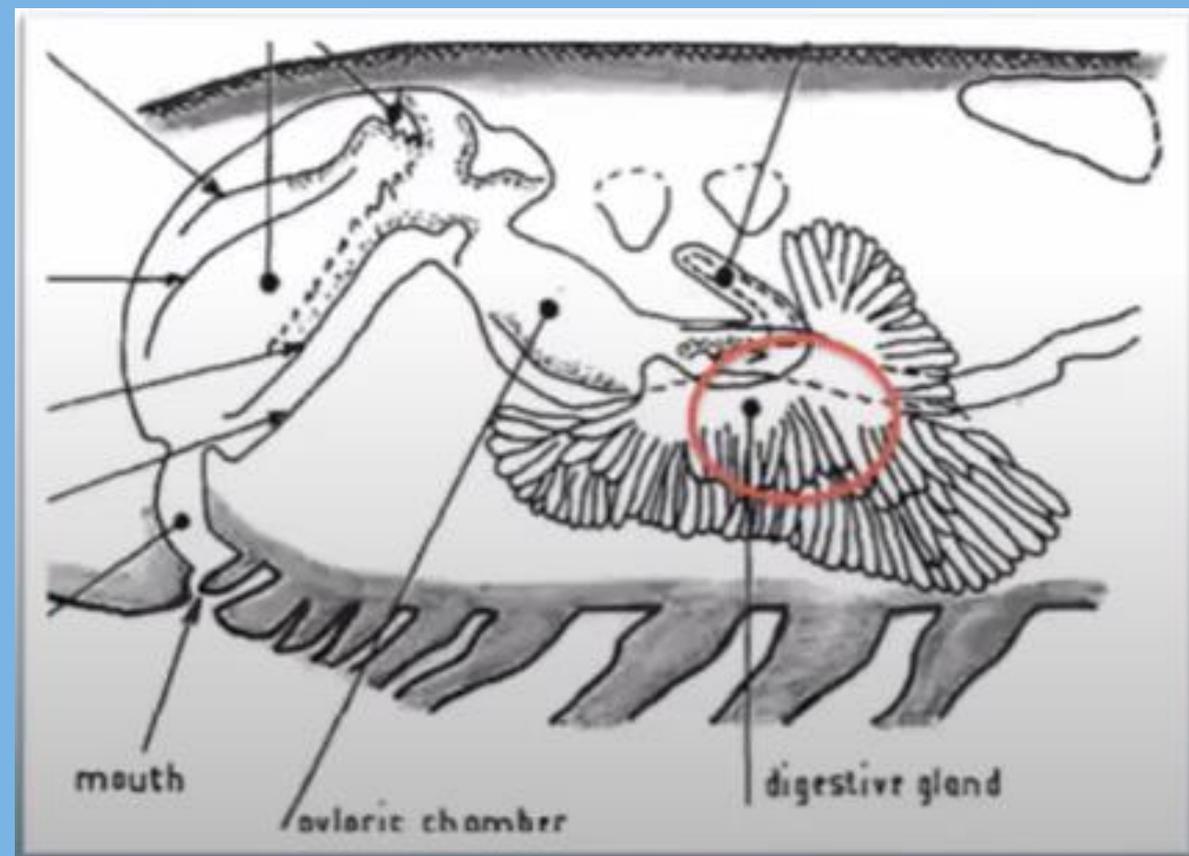


## Consulta en línea sobre estrategias para la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), 9-10/Feb/2021, NACA

- Dr. Celia R. Lavilla-Pitogo, Brunéi

### Revisión de la anatomía del hepatopáncreas (HP)

- El HP del camarón está formado por cientos de túbulos que funcionan individualmente
- Esta estructura permite que los túbulos no afectados de HP continúen funcionando a pesar de la presencia de anomalías o agentes patógenos
- La severidad y el alcance del daño o la presencia de parásitos determinan el grado de función de HP
- HP crece hacia afuera a través de células que se dividen activamente en las puntas de los túbulos
- El círculo rojo en el centro es la parte más antigua del HP



## Consulta en línea sobre estrategias para la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), 9-10/Feb/2021, NACA

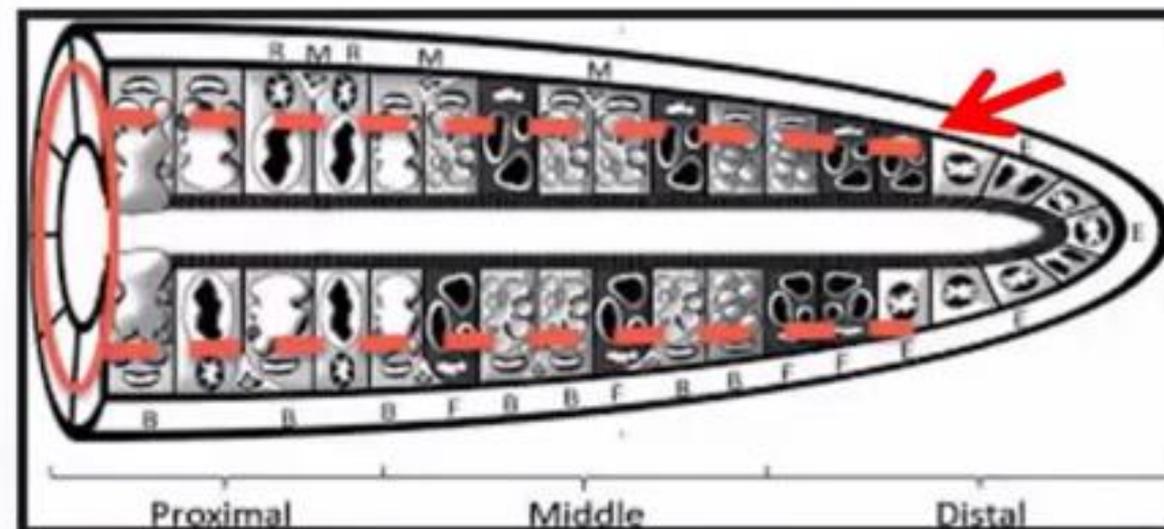
■ Dr. Celia R. Lavilla-Pitogo

### Revisión de la anatomía del hepatopáncreas (HP)

#### ■ Infección EHP de las células R, B, F de los túbulos del hepatopáncreas

- Las células embrionarias en la punta del túbulo del HP no están infectadas por EHP
- El alto número de esporas cerca del área de las células embrionarias indica una infección muy severa
- Las esporas se liberan en el lumen en grandes cantidades
- Las esporas dejan el camarón a través de las heces en el medio ambiente

Estructura detallada del túbulo de HP



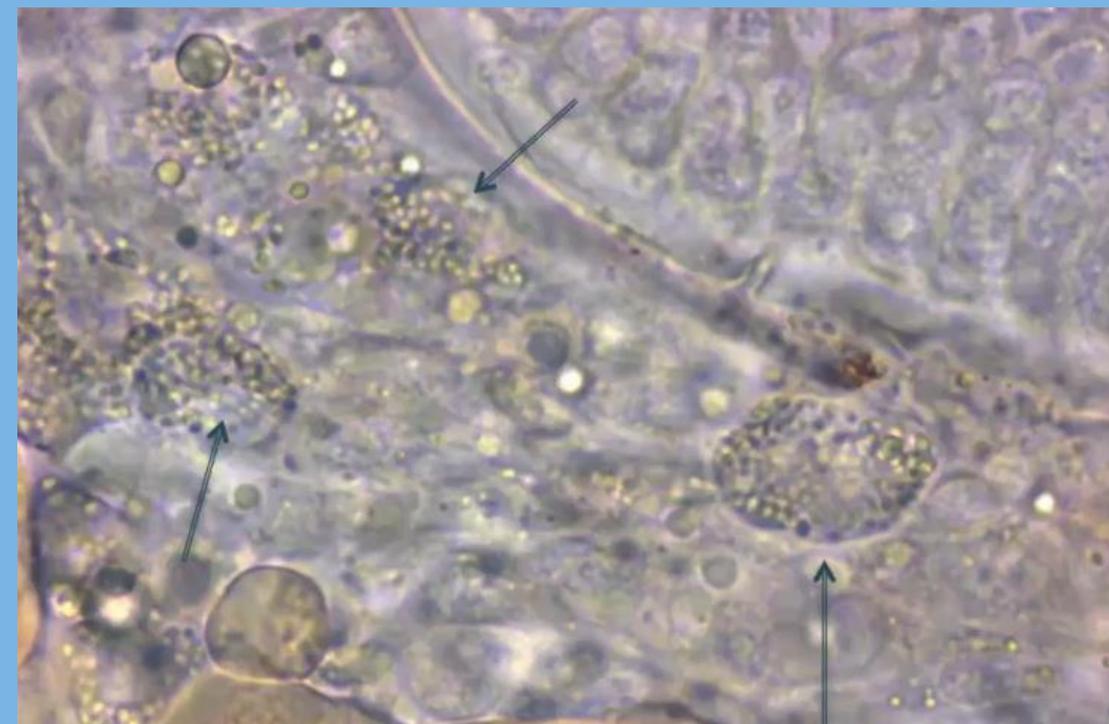
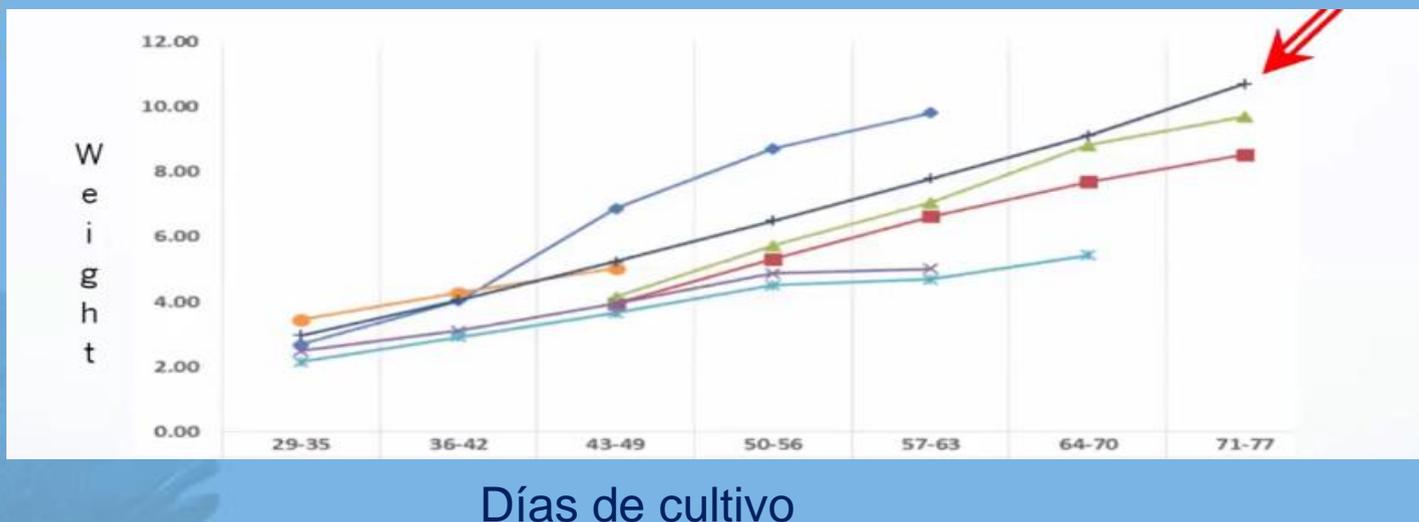
## Consulta en línea sobre estrategias para la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), 9-10/Feb/2021, NACA

■ Dr. Celia R. Lavilla-Pitogo

### Desarrollo de diagnósticos prácticos en las granjas acuícolas

- Uso de la curva de crecimiento como herramienta de diagnóstico,
- El objetivo de la producción (flecha roja)

- Hepatopáncreas altamente infectado con EHP; Las esporas forman grupos en el citoplasma (flechas)
- 100X, inmersión en aceite, tamaño de esporas 0.7-1µm

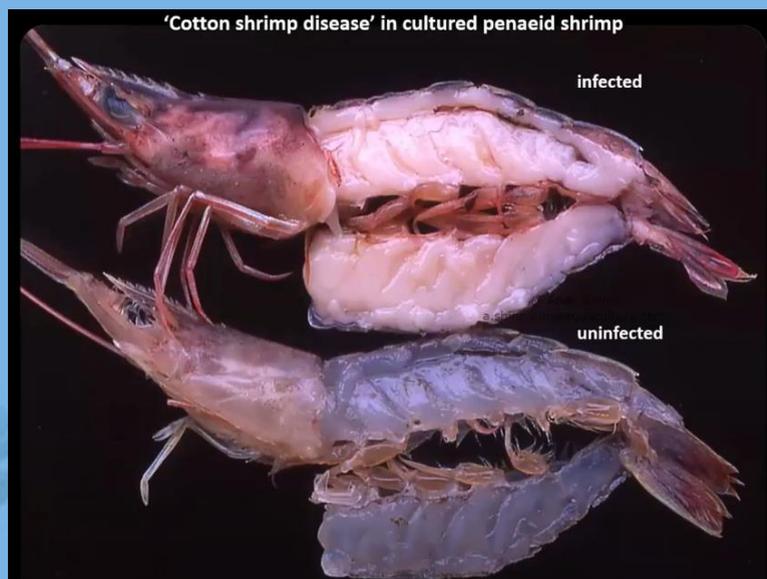


## Consulta en línea sobre estrategias para la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), Feb 9-10/2021, NACA

■ Prof. Andy Shinn, INVE (Tailandia), Benchmark

### ■ Agmasoma

- Enfermedad camarón algodón en penaeid
- Infecta solo el músculo y el tejido conectivo
  - Esporas grandes 2 x 3  $\mu\text{m}$
  - Los camarones se infectan cuando comen peces infectado
  - Ciclo de vida indirecto



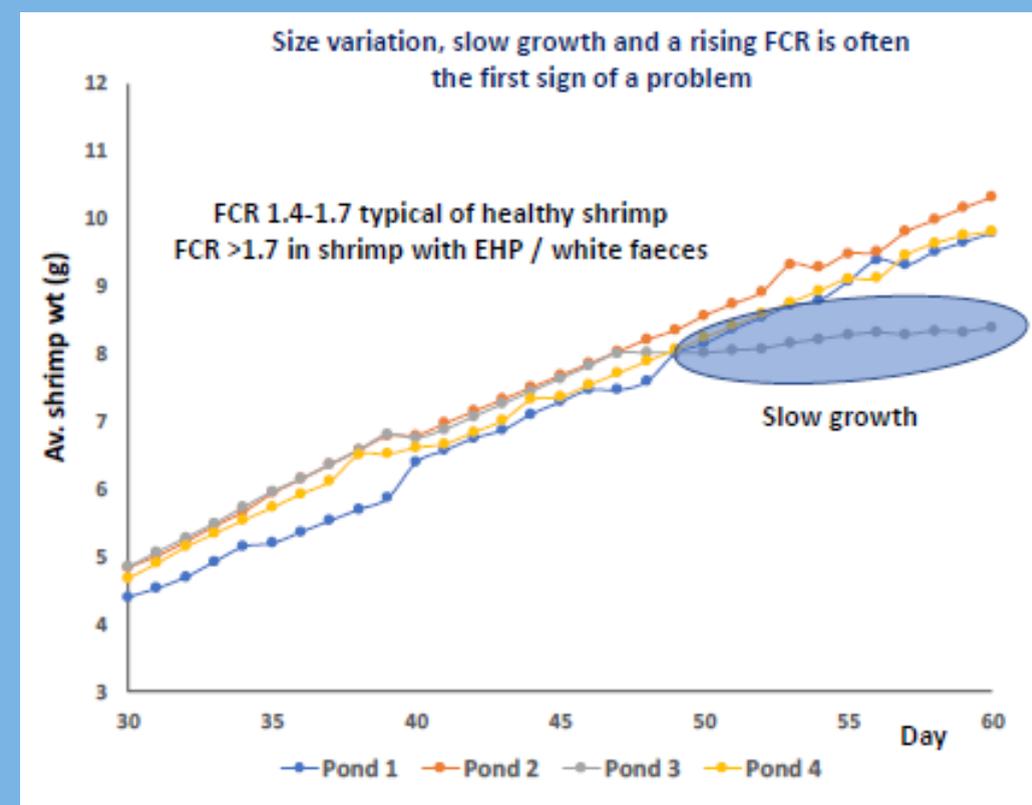
### ■ EHP

- Variación de tamaño
- Ciclo de vida directo



### ■ Curva de crecimiento

- La variación de tamaño, el crecimiento lento y el aumento de la conversión alimenticia son a menudo el primer signo de un problema



## Consulta en línea sobre estrategias para la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), 9-10/Feb/2021, NACA

### Prof. Andy Shinn

#### Hepatopáncreas e intestino

- Corte el intestino y colóquelo en un portaobjetos limpio
- Heces exprimidas con un cubreobjeto, luego el intestino se monta en una gota de NaCl al 1,5%
- Las manchas de pigmentación sugieren que este animal está bajo estrés y tal vez lidiando con problemas de salud



Pequeños pedazos del HP anterior, medio y posterior se colocan separado en un portaobjetos para su examen.

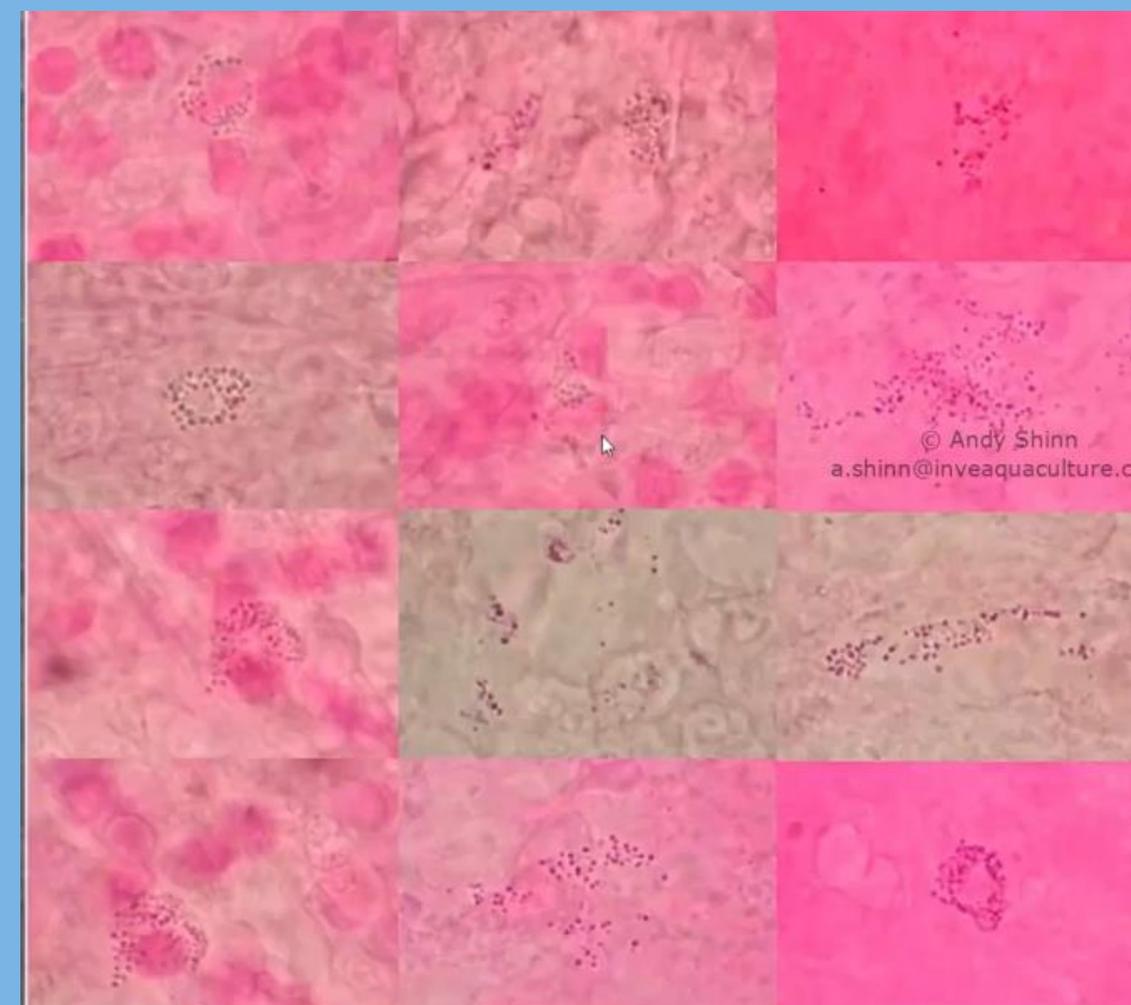
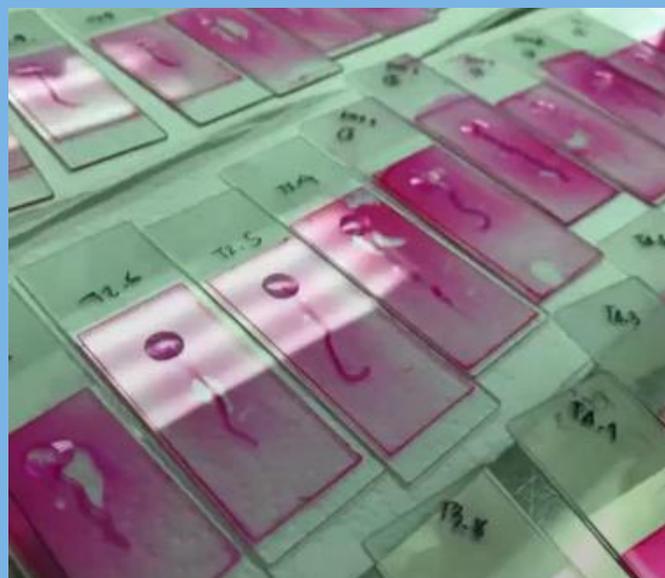


## Consulta en línea sobre estrategias para la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), 9-10/Feb/2021, NACA

■ Prof. Andy Shinn

### ■ Observación por microscopía

- Agregar una gota de floxina B en la preparación del intestino durante 5-10 minutos antes de examinar el portaobjeto con la lente de inmersión en aceite mejora la detección de esporas



## Medidas de control para EHP con posible aplicación en campo

- Chaijarasphong et al., 2021; Aldama-Cano et al., 2018

### La implementación de protocolos sólidos de bioseguridad

- Actualmente no hay métodos terapéuticos comprobados disponibles para tratar el camarón infectado con EHP
- Medidas preventivas contra EHP
  - El suministro de postlarvas libre de EHP – PCR negativo
  - Medidas adecuadas de bioseguridad antes y después de la siembra
- Control de la extrusión de esporas (inactivación) por productos químicos y temperatura

## Consulta en línea sobre estrategias para la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), 9-10/Feb/2021, NACA

■ **Dr Diva J. Aldama-Cano, BIOTEC, Tailandia**

### ■ **Control e inactivación de esporas de EHP con químicos y temperatura**

- **Las esporas de EHP se inactivan en 1 min a 75°C (Munkongwonsiri et al. 2021)**
  - No hay riesgo de transmisión de EHP, incluso si es PCR positivo debido a los procesos estándar de fabricación de alimentos peletizados (alta temperatura)
- **Las esporas de EHP en el agua de cultivo pierden actividad en 10 días o pueden inactivarse con cloro (Pattarayingsakul et al. 2022)**
  - El agua no tratada contaminada con EHP puede ser una fuente de infección, tratamiento con hipoclorito de calcio 20 ppm
- **Bioensayos para la extrusión de tubo polar de esporas de EHP en camarón (Aldama-Cano et al. 2018)**
  - La actividad de las esporas puede inhibirse mediante el uso de dosis bajas de cloro, KMnO<sub>4</sub> y etanol
    - Formalina: 200 ppm/24h, 90% inactivado
    - Cloro: 40 ppm/15 min, 100% inactivado; 10 ppm/24h, 100% inactivado
    - KMnO<sub>4</sub>: 15 ppm/15min, 100% inactivado; 5 ppm/24h, 100% inactivado
    - Etanol: 20%/15min, 100% inactivado
  - La actividad de las esporas puede inhibirse congelando a -20°C durante al menos 2 horas

## Consulta en línea sobre estrategias para la microsporidiosis hepatopancreática causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), 9-10/Feb/2021, NACA

### ■ Control en instalaciones de criaderos de larvas-PLs (Prof. Andy Shinn)

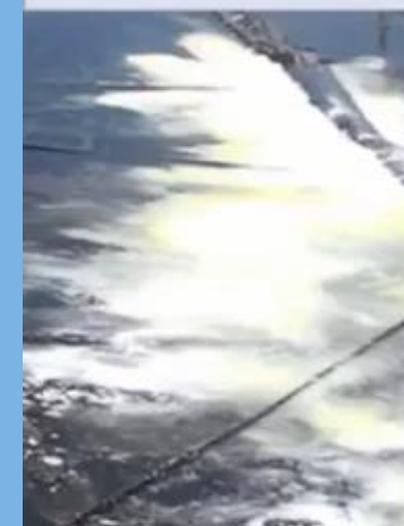
- Remoje los tanques y tuberías en NaOH al 2,5% durante 3 horas y seque durante 7 días,
- Un aumento en el pH >12 resulta en la desactivación del 90% de las esporas,
- Practique una bioseguridad estricta,
- Siembra solo de camarones libres de EHP,
- Realizar exámenes regulares de EHP: los túbulos HP inflamados pueden sugerir una infección por EHP,
- Si los PL comen menos de lo esperado, verifique el HP y obtenga una muestra para el análisis de EHP,
- Uso de dietas de alta calidad para promover la salud de los camarones

### ■ Prevención de EHP en granjas (Dr. Celia R. Lavilla-Pitogo)

- Desinfección del fondo y la pared del estanque mediante el uso de productos químicos para desactivar las esporas de EHP
- Cal viva, óxido de calcio, 6 toneladas por hectárea, elevar el pH por encima de 12 durante un par de días
- Entre cultivos y durante la preparación de los estanques

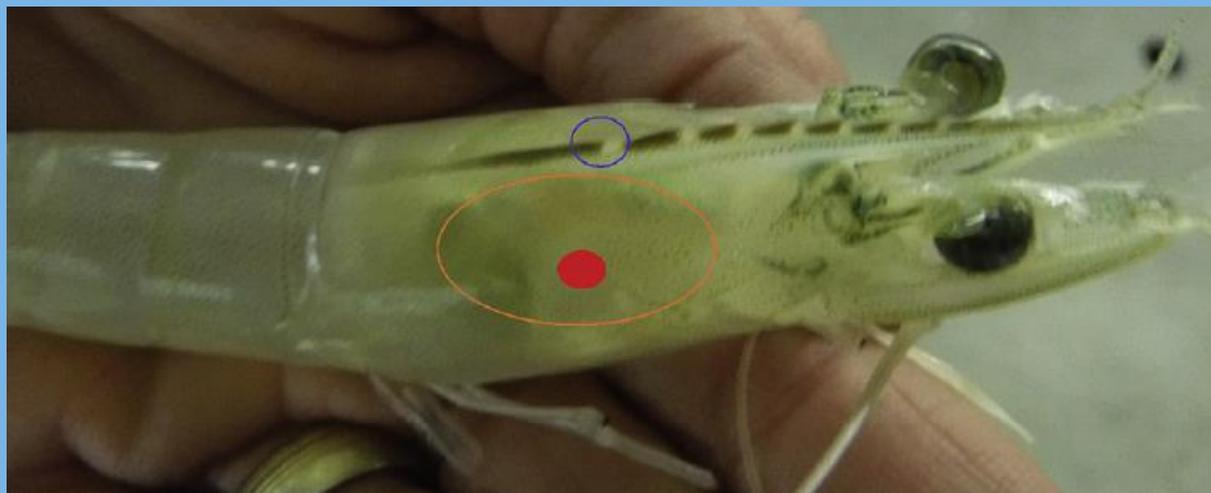


NaOH 2.50 kg + 150 lt H2O >>> Adulk

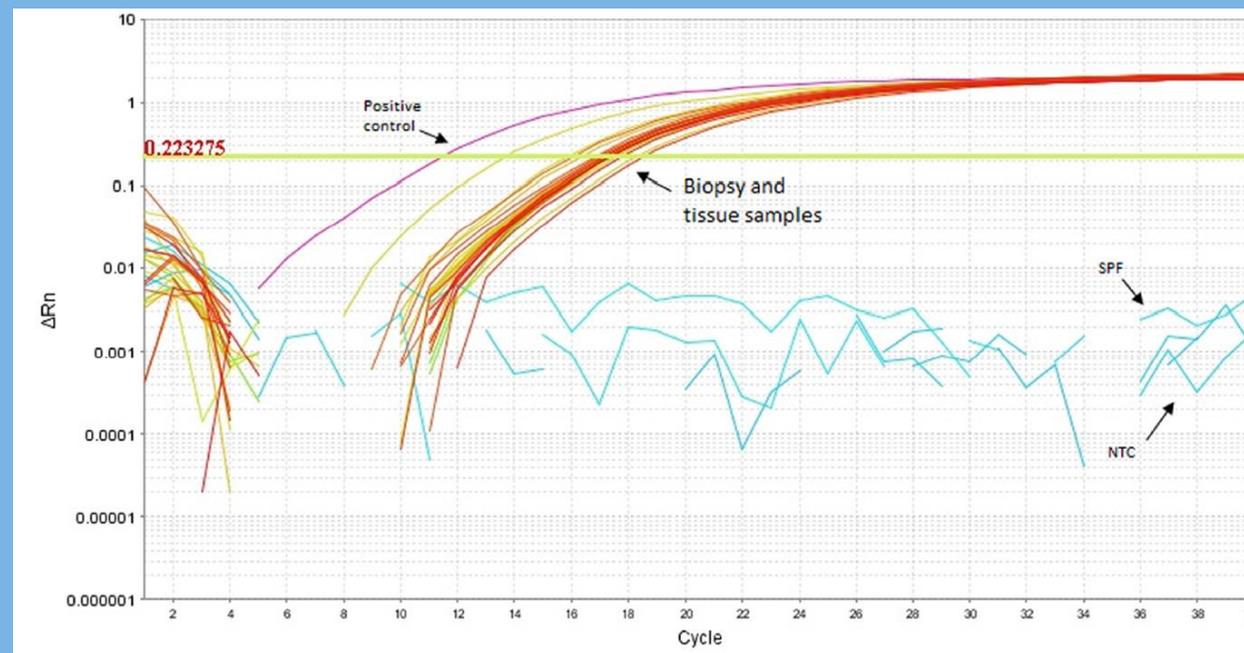


## Detección de *Enterocytozoon hepatopenaei* utilizando un método de muestreo invasivo pero no letal en camarones (*Penaeus vannamei*)

- Cruz-Flores et al. 2019, University of Arizona
- Una metodología de muestreo invasiva pero no letal que utiliza una jeringa para recolectar muestras de biopsia de hepatopáncreas (HP) de reproductores de *Penaeus vannamei* para detectar las esporas de *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) por qPCR



La metodología de muestreo consistió en el uso de una jeringa TB de 1 ml con una aguja de 25G X 5/8 para recoger el tejido HP.



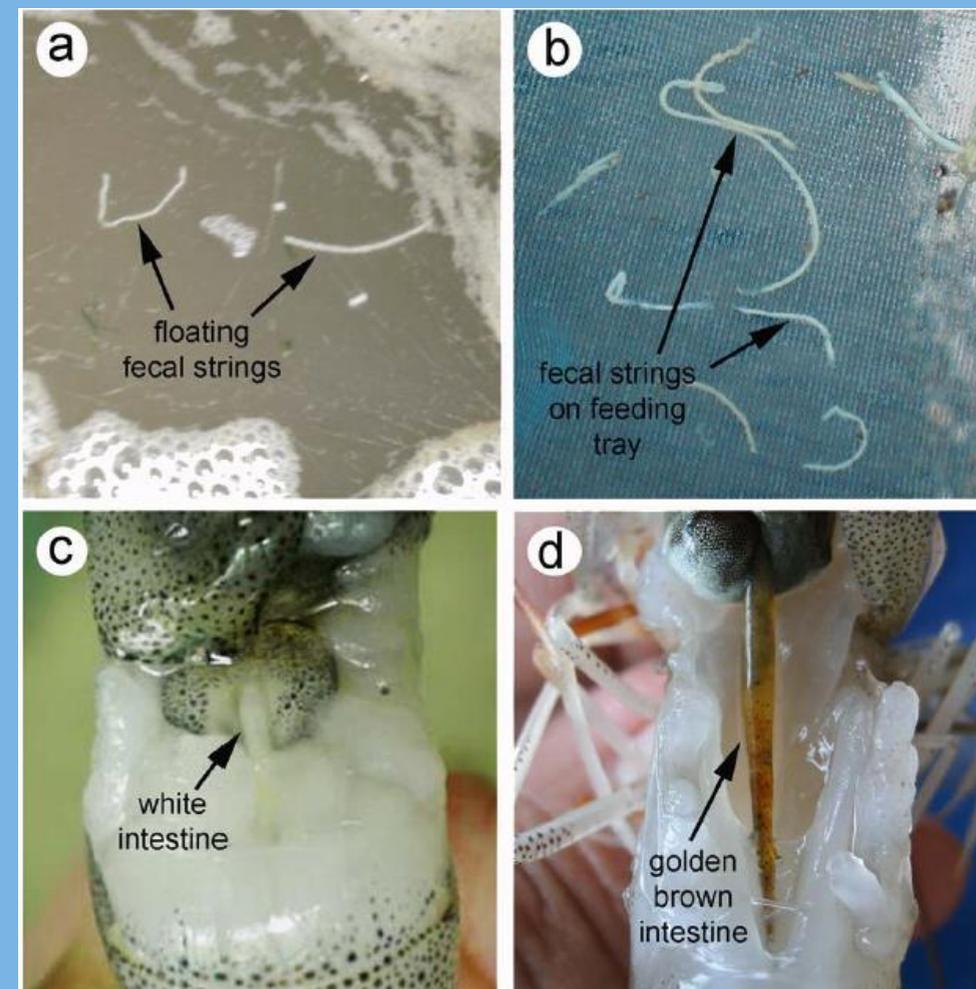
Diagramas de amplificación de biopsia y muestras de tejido por qPCR. Tanto la biopsia como la muestra de tejido tuvieron CT similares ( $17.07 \pm 0.92$ ).

**Ct:** Umbral del ciclo, **SPF:** libres de patógenos específicos; **NTC:** no template control "sin ADN".

## Síndrome de Heces Blancas (WFS) y EHP

■ Chaijarasphong et al., 2021

- **EHP como factor de riesgo para otras enfermedades**
  - **AHPND** (Enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda)
  - **SHPN** (Necrosis séptica del hepatopáncreas)
- **Las infecciones por EHP pueden estar asociadas con WFS en *P. vannamei***
  - **WFS signos externos**
    - Intestinos blancos
    - Heces blancas en estanques de camarones
  - **WFS a veces visto en camarones infectados con EHP**
    - Camarones en estanques de engorde
    - En estudios de desafíos en laboratorio

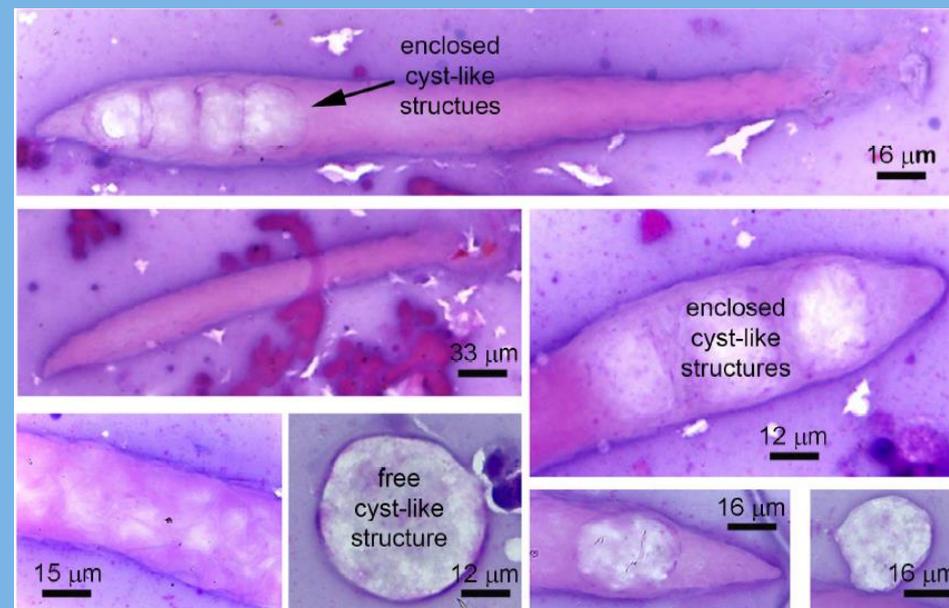


Sriurairatana et al., 2014

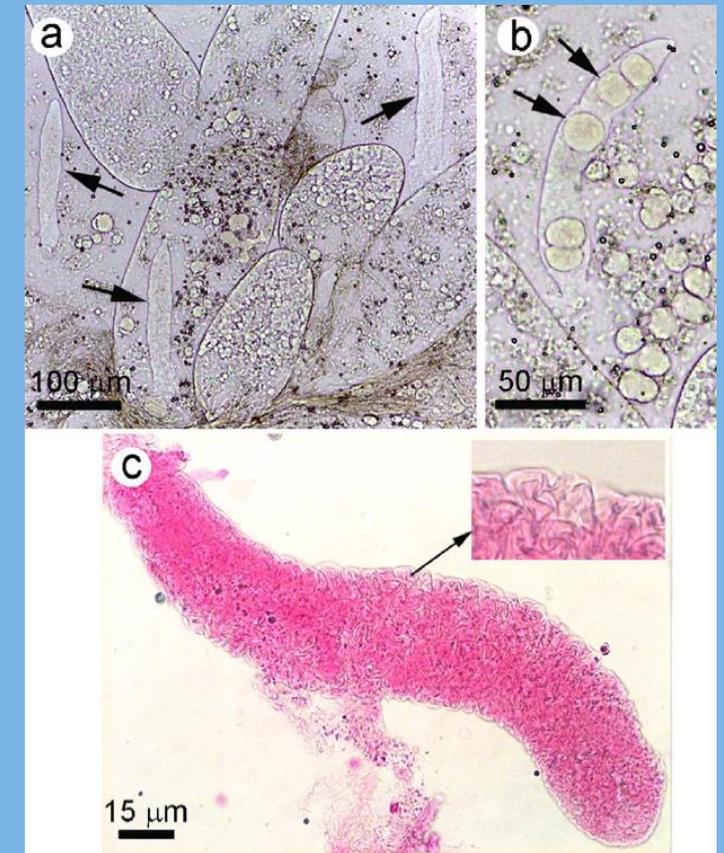
## Síndrome de Heces Blancas (WFS) y EHP

■ Chaijarasphong et al., 2021

- **Los síntomas de EHP y WFS no siempre son concurrentes**
  - El estanque de camarones puede ser positivo para EHP después de que el camarón dejó de producir heces blancas
  - Estanques libres de EHP que exhiben heces blancas que contienen estructuras vermiformes llamadas microvellosidades transformadas agregadas (ATM)



H&E - frotis de hepatopáncreas teñido



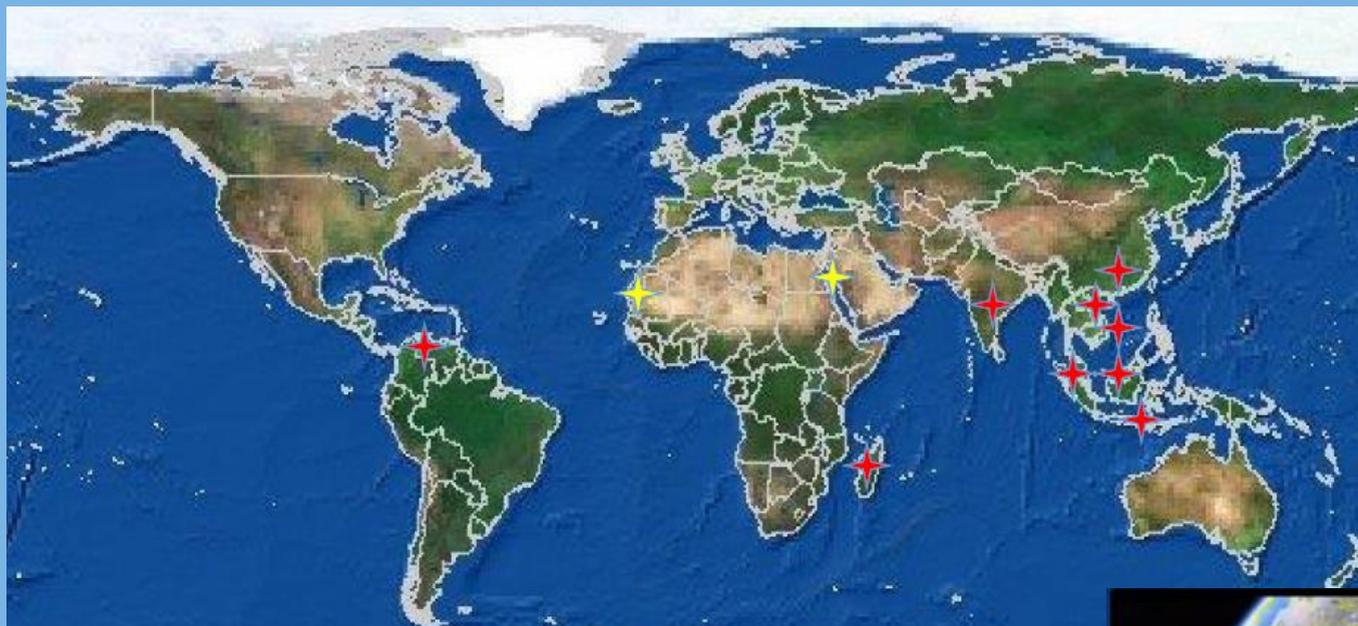
[A] & [B] Ensamblaje fresco de cuerpos vermiformes (ATM) en tejido hepatopancreático de camarón.  
[C] Tinción de ATM con Rosa de Bengala (Sriurairatana et al., 2014)

## Síndrome de Heces Blancas (WFS) y EHP

- Chaijarasphong et al., 2021
  
- **Síntomas del WFS en respuesta a otras causas**
  - Fuertes infecciones de gregarinas
  - Vibriosis
  - Enteritis hemocítica
  
- **Las heces blancas en el estanque no son un indicador de infecciones por EHP**
  
- **La presencia de esporas de EHP en heces blancas**
  - Puede ayudar a diferenciar entre EHP y ATM o infecciones por gregarinas
  
- **Las infecciones severas de EHP a menudo se acompañan de proliferación bacteriana**
  - Bacterias específicas pueden desencadenar WFS en camarones severamente infectados

## Síndrome de Heces Blancas (WFS) y EHP

- Reproducción experimental del síndrome de las heces blancas en camarón blanco, *Penaeus vannamei* - PLoS ONE 16(12) – Aranguren et al. 2021



- Distribución geográfica de WFS
- Aranguren Caro et al., 2022

- Distribución geográfica de EHP
- Aranguren Caro et al., 2021



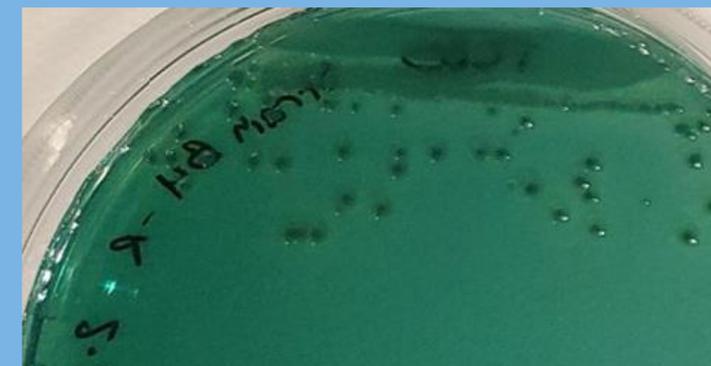
## Síndrome de Heces Blancas (WFS) y EHP

- Reproducción experimental del síndrome de las heces blancas en camarón blanco, *Penaeus vannamei* - PLoS ONE 16(12) – Aranguren et al. 2021
- Granja - nivel de WFS
  - Hebras fecales blancas flotando en la superficie del agua en estanques de engorde
  - Tasa de crecimiento deficiente, disparidad de tamaño
  - Tracto gastrointestinal con coloración amarillenta a blanquecina
  - Exoesqueleto blando y mortalidades crónicas
- La asociación entre EHP y WFS se ha sugerido durante mucho tiempo
  - Ningún estudio ha reproducido con éxito este síndrome en un entorno de laboratorio controlado
  - Incluso cuando se producen infecciones graves por EHP, WFS no siempre se manifiesta
  - WFS puede ser el resultado de una interacción de más de un microorganismo u otro agente causal aún no identificado



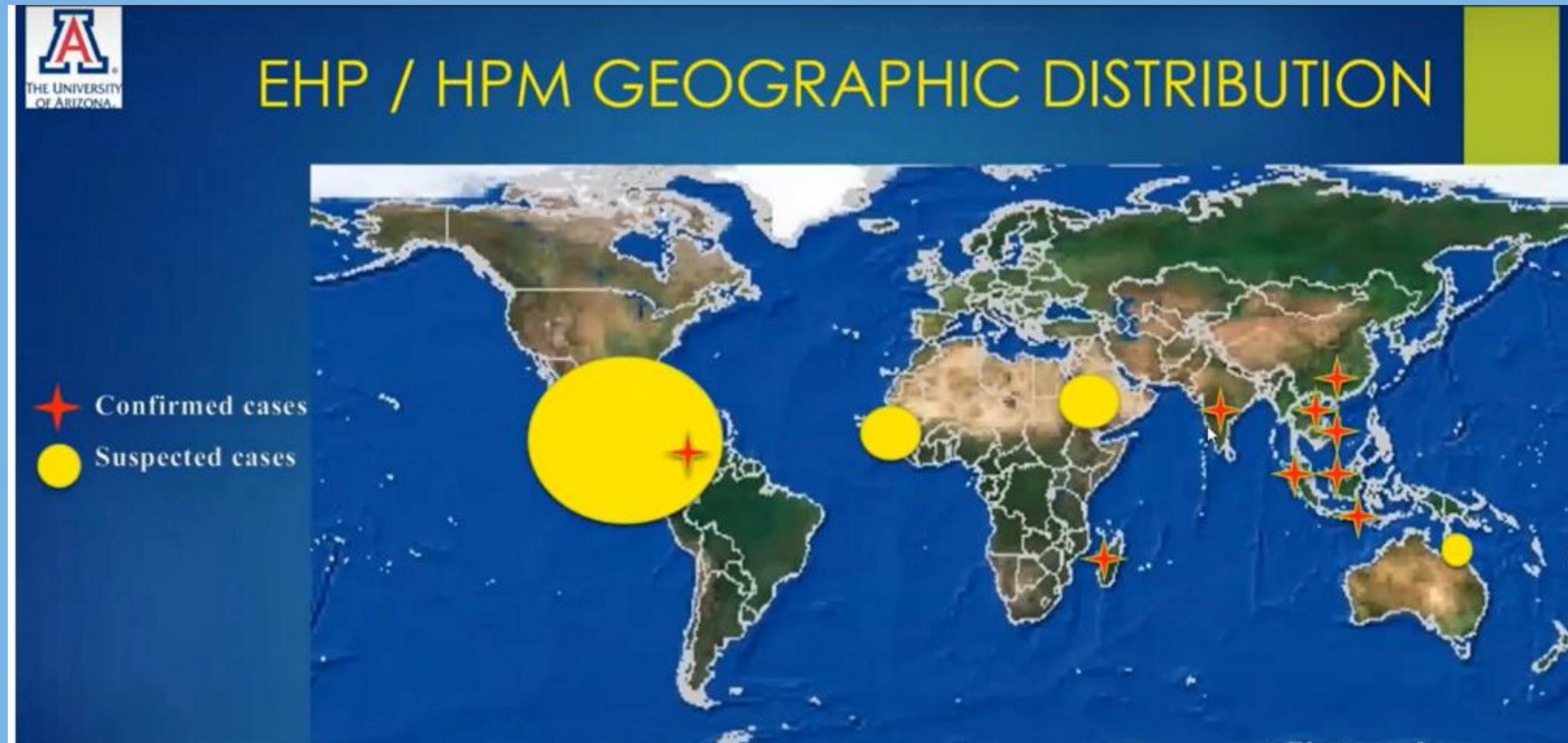
## Síndrome de Heces Blancas (WFS) y EHP

- Reproducción experimental del síndrome de las heces blancas en camarón blanco, *Penaeus vannamei* - PLoS ONE 16(12) – Aranguren et al. 2021
- En este estudio, el equipo de Arizona aisló e identificó una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) como el eslabón perdido entre WFS y EHP
  - Vp se aisló del intestino de *P. vannamei* mostrando heces blancas e intestinos blancos
  - Esporas de EHP se aisló de SPF *P. vannamei* (2,5-3,5 g) infectado con EHP de Tailandia
  - La primera demostración de reproducción del WFS en condiciones controladas de laboratorio utilizando dos patógenos únicos
    - ***Vibrio parahaemolyticus* - bacteria**
    - **EHP - microsporidio**



## Microsporidiosis hepatopancreática (HPM) a nivel mundial y su estado actual en América Latina

- Dr Aranguren Caro, 25-August-2022 (Webinar org. por Sea Technology - Panama)



## Microsporidiosis hepatopancreática (HPM) a nivel mundial y su estado actual en América Latina

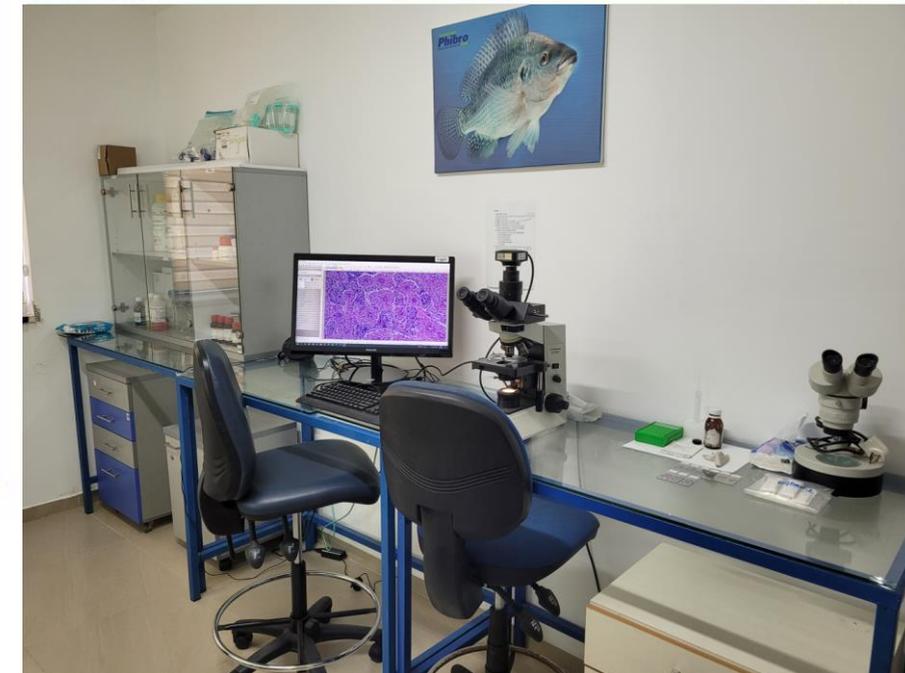
- By Dr Aranguren Caro, 25-August-2022 (Webinar org. por Sea Technology - Panama)

### Observaciones relevantes

- **HPM** está presente en la industria camaronera en **América Latina**
- Es posible que en algunos casos el microsporidio presente no sea **EHP**
- Es probable que estos agentes causantes de **HPM**, tengan una ruta fecal-oral directa
- 18S rRNA es una buena técnica de PCR para detectar HPM
- La presencia de **EHP** debe confirmarse mediante al menos dos métodos de PCR:
  - **18S rRNA** y **SWP1**
- Otros nuevos métodos de diagnóstico podrían ser útiles para discriminar **EHP** de otros microsporidios
- La manifestación clínica crónica de **EHP/HPM** termina en necrosis hepatopancreática séptica (**SHPN**)
- La microsporidiosis hepatopancreática es causada por varias especies de Microsporidios.
- **EHP** es uno de los agentes causante de **HPM**.



Phibro Aqua



**Muito Obrigado**

**Dr. Allan Heres**  
[allan.heres@pahc.com](mailto:allan.heres@pahc.com)  
**+972-52-5185748**

