



ALLIANCE™

<https://www.globalseafood.org>Health &
Welfare

Estudio: Síndrome de Heces Blancas en camarones puede ser causado por más de un patógeno

14 March 2022

By Luis Fernando Aranguren Caro, Ph.D. , Hung N. Mai, Ph.D. , Roberto Cruz-Florez, Ph.D. , Frances Lauren Agcalao Marcos , Rod Russel R. Alenton, Ph.D. and Arun K. Dhar, Ph.D.

Laboratorio de Patología Acuícola encuentra evidencia concluyente de que EHP no es el único patógeno asociado con la presencia del Síndrome de Heces Blancas en *Litopenaeus vannamei*

La microbiota intestinal del camarón es fundamental para la nutrición, el crecimiento, la resistencia a los patógenos y el mantenimiento del estado estable interno u homeostasis del huésped. Las características de alimentación de los camarones, como el pastoreo activo y el canibalismo, hacen que el huésped sea vulnerable a la invasión de patógenos. La colonización por microorganismos alternativos desestabiliza la microbiota intestinal, lo que conduce a infecciones y co-infecciones en un tracto gastrointestinal (GI) taxonómicamente diverso.

Aunque existe información limitada sobre los mecanismos inmunológicos específicos proporcionados por la microbiota intestinal del camarón, existe evidencia de su interacción con las actividades



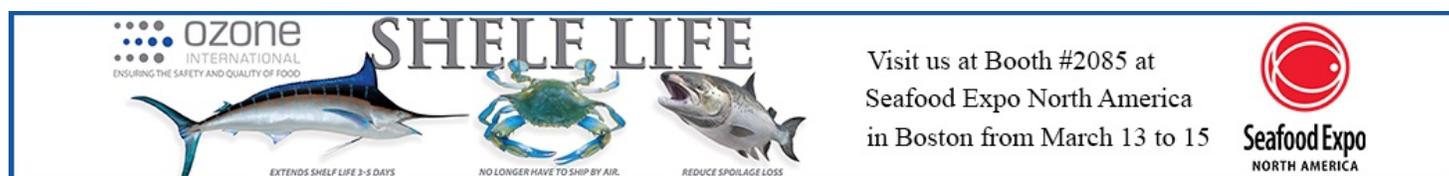
Cefalotórax (cabeza + tórax) de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) que muestra una decoloración blanca del tracto gastrointestinal. Los resultados de este estudio demostraron por primera vez la reproducción experimental de WFS en condiciones de laboratorio cuando los camarones se infectan simultáneamente con EHP y *V. parahaemolyticus*.

digestivas que afectan directamente el crecimiento del camarón y la gravedad de las enfermedades. Asimismo, se encontraron nuevas enfermedades emergentes que afectan el hepatopáncreas [glándula digestiva] del camarón y causan inhibición del crecimiento, disparidad de tamaño, pérdida de apetito y mortalidad crónica. Las enfermedades del camarón recientemente identificadas que presentan estos signos clínicos son la microsporidiosis hepatopancreática (HPM) causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) y el Síndrome de Heces Blancas (WFS), cuyo agente o agentes causales permanecen sin identificar.

La HPM es una enfermedad del hepatopáncreas en los camarones peneidos causada por varias especies de microsporidios [parásitos unicelulares formadores de esporas], incluido el EHP. Esta especie de microsporidio se ha encontrado en varios países asiáticos como China, Vietnam, Malasia, Indonesia, Tailandia e India. Recientemente, se ha reportado EHP en el Hemisferio Occidental en América del Sur. El principal signo clínico de EHP a nivel de granja es el retraso en el crecimiento del camarón, lo que lleva a una mayor variabilidad de tamaño y tasa de conversión alimenticia (FCR). En etapas avanzadas de la enfermedad, los camarones infectados con EHP generalmente muestran caparazones blandos y mortalidades crónicas. Se ha reportado EHP en varias especies de camarones

peneidos de cultivo, incluido el camarón tigre negro *P. monodon*, *L. vannamei* y *P. stylirostris*. EHP es un parásito intracelular que prolifera dentro del citoplasma de las células epiteliales de los túbulos afectados en el hepatopáncreas.

A nivel de granja, WFS se manifiesta como hilos fecales blancos que flotan a lo largo de la superficie del agua en los estanques de engorde. Los camarones en estos estanques muestran signos clínicos inusuales, como una tasa de crecimiento deficiente, disparidad de tamaño, tracto gastrointestinal con decoloración amarillenta a blanquecina, caparazón blando y mortalidad crónica. Aunque durante mucho tiempo se ha sugerido una asociación entre EHP y WFS, ningún estudio ha reproducido con éxito este síndrome en un entorno de laboratorio controlado. Incluso cuando ocurren infecciones graves por EHP, WFS no siempre se manifiesta, y estas observaciones sugieren que WFS es el resultado de una interacción de más de un microorganismo y aún no se han identificado otros agentes causales. Se ha reportado una fuerte asociación entre WFS y EHP en regiones endémicas de EHP en el sudeste asiático y Venezuela. En estos casos, WFS y EHP se detectaron junto con otro patógeno oportunista, *Vibrio* spp., que causa Necrosis Hepatopancreática Séptica (SHPN).



(<https://www.o3illc.com/seafood>).

Este artículo – adaptado y resumido de la **publicación original** (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261289>). (Aranguren, LF et al. 2021. Experimental reproduction of White Feces Syndrome in whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*. *PLoS ONE* 16(12): e0261289) – reporta sobre nuestro estudio para aislar e identificar una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* como el eslabón perdido entre EHP y WFS. La co-infección de camarones infectados con EHP mediante un desafío de inmersión con una cepa única de *V. parahaemolyticus* que se aisló del intestino de un camarón (*L. vannamei*) que mostraba WFS nos permitió proporcionar la primera evidencia experimental de reproducción de WFS. Hasta donde sabemos, esta es la primera demostración de la reproducción de WFS en condiciones de laboratorio controladas utilizando dos patógenos únicos.

Configuración del estudio

Se obtuvieron *L. vannamei* libres de patógenos específicos (SPF) del Oceanic Institute (Oahu, Hawái). Durante al menos dos años consecutivos, esta población ha dado negativa por PCR para todos los patógenos de la lista de la OIE, así como para los patógenos no incluidos en la lista de la OIE, incluido el EHP. El bioensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Acuícola de la Universidad de Arizona. Todos los procedimientos para el muestreo y la eutanasia de los camarones se realizaron siguiendo las pautas establecidas por la Asociación Médica Veterinaria Estadounidense.

Para obtener información detallada sobre el diseño experimental y la cría de animales; aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* de camarones *L. vannamei* mostrando WFS y preparación de inóculo; desafío experimental para reproducir WFS; histopatología e hibridación *in situ*; PCR y PCR cuantitativa para detección de *V. parahaemolyticus* y cuantificación de EHP; y análisis estadísticos, consulte la publicación original.

Resultados y discusión

Los resultados de nuestro estudio describen por primera vez la reproducción experimental de WFS en camarones, *L. vannamei* pre-infectados con EHP (patógeno primario) y desafiados con un *V. parahaemolyticus* particular (patógeno secundario) aislado del tracto GI de un camarón que muestra WFS. Nuestros datos brindan respaldo empírico de una fuerte asociación de EHP con WFS según lo registrado en diferentes regiones del mundo. En Indonesia, de 2016 a 2018, y en Venezuela en 2019, observamos camarones con signos clínicos de WFS que mostraban lesiones histológicas típicas de EHP y SHPN. Nuestros hallazgos histológicos revelaron un escenario similar, ya que los camarones que experimentaron manifestaciones clínicas de WFS en condiciones de desafío de laboratorio también mostraron lesiones histológicas que recuerdan la patología EHP y SHPN.

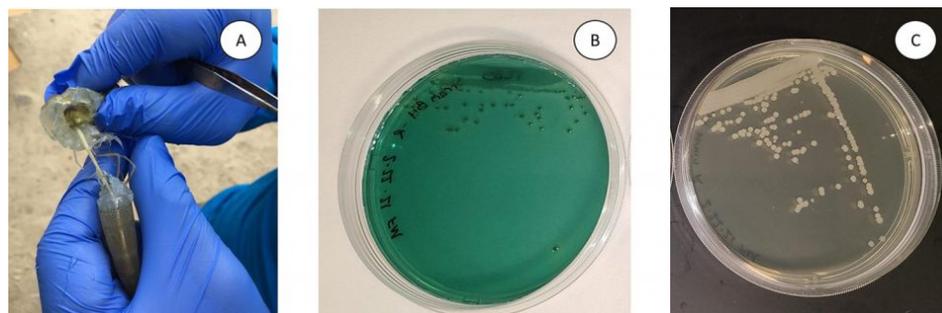


Fig. 1: Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* del tracto GI de *Litopenaeus vannamei* que muestra WFS. Un camarón *L. vannamei* juvenil que muestra un tracto gastrointestinal (GI) blanco, una manifestación clínica de WFS. Se sembró una sección del tracto GI en una placa TCBS (a). CFU Sacarosa negativa que indica crecimiento de *V. parahaemolyticus* en placa TCBS (b). Crecimiento de *V. parahaemolyticus* en medio TSA+2,5% NaCl (c).

Aranguren, WFS, Tabla 1

Ensayo	Tanque	Grupo	Número inicial de animales	Número final de animales	Supervivencia final (%)	CV%	WFS
1	1	Control negativo SPF	7	6	85.7	21.4	No
1	2	SPF + <i>V. parahaemolyticus</i>	7	6	85.7	27.6	No
1	3	Control positivo EHP	8	8	100	41.6	No
1	4	EHP + <i>V. parahaemolyticus</i>	7	4	57.1	40	Yes
2	1	Control negativo SPF	10	9	90	12	No
2	2	SPF + <i>V. parahaemolyticus</i>	10	8	80	10.1	No
2	3	Control positivo EHP	9	4	44.4	30.8	No

2	4	EHP + V. parahaemolyticus	8	2	25	40.7	Yes
---	---	------------------------------	---	---	----	------	-----

Tabla 1. Diseño experimental y supervivencia comparativa de camarones pre-infectados con EHP y desafiados con *V. parahaemolyticus* (aislado WFS) en dos ensayos independientes.

Fig. 2: Reproducción exitosa de WFS en *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones experimentales de laboratorio. Camarones que muestran signos clínicos del Síndrome de Heces Blancas (WFS) en camarones pre-infectados con EHP y desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* a través de la ruta de inmersión. Se observan hilos fecales de color blanco a amarillento en animales en diferentes tratamientos. La flecha negra indica hilo fecal blanco adherido a la abertura anal en camarones infectados con EHP que fueron desafiados con *V. parahaemolyticus*. Adaptado del original.

El Síndrome de Heces Blancas ha demostrado tener una de las etiologías más esquivas de cualquiera de las enfermedades del camarón que se han caracterizado hasta la fecha. Ha pasado más de una década desde que se publicó el primer informe formal de camarones infectados con EHP que muestra WFS, aunque la evidencia anecdótica sugiere que se ha observado WFS en estanques de engorde de camarones antes de esta publicación. A pesar de la presencia de WFS durante una década, la etiología [causalidad] del síndrome sigue sin ser concluyente.

También hay varias publicaciones con afirmaciones contradictorias con respecto al papel de EHP en WFS. Por ejemplo, algunos autores reportaron que WFS no es causado por EHP, mientras que otros encontraron una fuerte evidencia de un vínculo claro entre EHP y WFS. Hay un informe que afirma que *Vibrio cholerae* es el agente etiológico de WFS, aunque este hallazgo no ha sido confirmado por otros investigadores de ningún otro lugar a pesar de que WFS es un problema emergente en todo el mundo.

Varios otros estudios con el objetivo de investigar el fenómeno WFS también han encontrado alguna asociación entre WFS y diferentes etiologías. Se ha reportado que las hebras fecales que contienen estructuras vermiformes llamadas microvellosidades transformadas agregadas (ATM) son uno de los agentes causantes de **WFS en Tailandia** (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099170>). WFS parece estar correlacionado con la coinfección con EHP y otros *Vibrio* spp. oportunistas que **causan SHPN** (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.038>). En India, se ha informado el Síndrome de Mortalidad por Carrera (RMS) en camarones que muestran WFS y SHPN. Investigadores que estudian el microbioma en camarones afectados por WFS reportaron que un aumento significativo de bacterias

Candidatus Bacilloplasma y *Phascolarctobacterium* y disminuciones en *Paracoccus* y *Lactococcus* pueden contribuir a **WFS en camarones** (<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8855-2>). Una fuerte infestación de gregarinas [parásitos intestinales], vibriosis y enteritis hemocítica, algún taxón bacteriano específico o “patobioma” [grupos de especies asociadas con un huésped que, cuando están presentes, reducen la fuerza del huésped en condiciones ambientales adecuadas], y diferentes **condiciones ambientales** (<https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107458>), en un estanque de engorde se han propuesto como los **factores que contribuyen** (<https://doi.org/10.1038/s41598-020-68891-6>), a causar WFS.

Si bien varios autores han intentado estudios para reproducir WFS en un entorno de laboratorio, pocos han tenido éxito en reproducir este síndrome de manera consistente y determinar la etiología. **Huang et al.** (<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00802-3>), descubrieron recientemente que el trasplante de la microbiota intestinal de camarones que muestran WFS a camarones sanos conduce a manifestaciones clínicas similares a las de WFS. Propusieron que WFS es causado por disbiosis [desequilibrio microbiano] en la microbiota intestinal y esta enfermedad compleja podría ser causada por patógenos particulares. Si bien una etiología no infecciosa merece una mayor investigación, no podemos ignorar el hecho de que WFS se ha asociado constantemente con patógenos particulares, en particular EHP. Además, la constante co-ocurrencia de ciertos patrones de las **comunidades bacterianas** (<https://doi.org/10.1038/s41598-020-68891-6>), en camarones que presentan WFS nos lleva a plantear la hipótesis de que WFS es el resultado de los efectos sinérgicos de dos patógenos con EHP posiblemente actuando como un patógeno primario y una bacteria no caracterizada perteneciente a la familia Vibrionaceae actuando como patógeno secundario.

Mediante experimentos de desafío de laboratorio, pudimos confirmar la presencia de hilos fecales blancos solo en camarones pre-infectados con EHP y posteriormente expuestos al aislado de *V. parahaemolyticus*. Esto demuestra que, para inducir manifestaciones clínicas de WFS, se requieren tanto EHP como este aislado de *V. parahaemolyticus* en particular. Los camarones expuestos solo a EHP o *V. parahaemolyticus* no desarrollaron WFS. Por lo tanto, la manifestación de WFS implica una combinación única de dos patógenos que no se habían observado previamente para ninguna enfermedad infecciosa del camarón conocida hasta la fecha.

Aranguren, WFS, Tabla 2

Ensayo	Tratamientos	Signos clínicos	Número de muestras	Detección de EHP % por histología H&E	Detección de SHPN % por histología H&E	Detección de EHP por hibridación in situ
1	Control negativo SPF	No WFS	6	0	0	0
1	SPF + <i>V. parahaemolyticus</i>	No WFS	6	0	0	0
1	Control positivo EHP	No WFS	8	100	37.5	100
1	EHP + <i>V. parahaemolyticus</i>	WFS	6	100	83.3	100
2	Control negativo SPF	No WFS	6	0	0	NT

2	SPF + V. parahaemolyticus	No WFS	6	0	0	NT
2	Control positivo EHP	No WFS	5	100	60	NT
2	EHP + V. parahaemolyticus	WFS	5	100	60	NT

Tabla 2. Un resumen de los datos de histopatología y PCR de *Penaeus vannamei* pre-infectados con EHP y desafiados con *Vibrio* sp. NT: no probado.

Por lo general, en un estanque de engorde de camarones, la población cultivada comienza a mostrar la presencia de EHP primero. Más tarde, durante el ciclo de crecimiento, los camarones comienzan a desarrollar una decoloración blanca en el tracto gastrointestinal y comienzan a aparecer hilos fecales blancos flotantes en el estanque. Por histología de H&E [una de las principales tinciones para estudiar tejidos], observamos un orden secuencial similar en la patología celular durante el proceso de infección. Un patógeno primario, en este caso EHP, causó las lesiones histológicas típicas y, más tarde, los camarones afectados mostraron SHPN causado por *V. parahaemolyticus* oportunista que se usó para desafiar a los camarones infectados con EHP. La imagen de histopatología en la Fig. 3D muestra claramente la co-infección de EHP representada por una inclusión típica de plasmodio y bacterias en el mismo túbulo de HP. Esto establece el papel de un patógeno primario como EHP para acentuar el impacto de bacterias oportunistas como *Vibrio* sp. resultando en WFS.

Camarones en el grupo de tratamiento EHP+*V. parahaemolyticus* en nuestros dos ensayos mostraron una gran disparidad de tamaño, que es mayor o comparable a los camarones infectados con EHP o *V. parahaemolyticus* solo (Tabla 1). Un hallazgo similar también fue informado por Liu et al. (2015. Development of real-time PCR assay for detection of microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and detection in shrimp samples under different. *Prog Fish Sci.* 2015.). Estos autores informaron el impacto de EHP en la variación de tamaño de los camarones en una granja de engorde cuando se encontró que la carga de patógenos era $> 10^3$ copias/ng de ADN total en el tejido hepatopancreático. En nuestro estudio, la carga media de EHP en camarones que mostraban signos clínicos de WFS fue de $1,4 \times 10^7$ copias/ng de ADN extraído, que es superior a lo que Liu et al. (2015) mencionaron se requiere para observar una gran variación de tamaño. En estudios previos, los camarones que muestran WFS muestran un número de copias del orden de $\sim 10^6$ copias/ng de **ADN de hepatopáncreas** (<https://doi.org/10.3354/dao03522>), extraído.

Es muy probable que la reproducción de WFS en camarones infectados con EHP y desafiados con *V. parahaemolyticus* se deba a las acciones sinérgicas del microsporidiano y una cepa bacteriana particular en los túbulos hepatopancreáticos. Como se mencionó anteriormente, Huang y sus colegas sugirieron que WFS es causado por la disbiosis de la microbiota intestinal y esta propuesta tiene algunas similitudes con nuestro hallazgo. Nuestras observaciones durante la etapa temprana de la infección por EHP en camarones que muestran WFS incluyen un alto contenido de lípidos en el túbulo hepatopancreático, pero algunas células del hepatopáncreas están muy infectadas. Sin embargo, en este punto, no hay una respuesta inmunitaria celular obvia del camarón, como inflamación o congestión hemocítica. Más tarde, a medida que avanza la infección, las células epiteliales infectadas con EHP en el túbulo HP se desprenden y exponen la membrana basal subyacente del túbulo a bacterias oportunistas que colonizan rápidamente los túbulos afectados.

La colonización bacteriana luego conduce a una respuesta celular del huésped que resulta en una

Fig. 3: Análisis histopatológico del tejido del hepatopáncreas. Tinción H&E (hematoxilina y eosina-floxina de Mayer-Bennet) del tejido hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* de cuatro grupos experimentales: control negativo SPF (A), SPF+ *V. parahaemolyticus* (B), control positivo EHP (C) y EHP+ *V. parahaemolyticus* (D). Se muestra la presencia de cuerpos de inclusión citoplasmáticos (flechas negras) que corresponden a un estadio de plasmodio y esporas (punta de flecha) típicas de la infección por EHP. Se indican las barras de escala de 200 μm (A), 50 μm (B) y 10 μm (C-D). Adaptado del original.

inflamación hemocítica, melanización [pigmentación] posterior y más desprendimiento. Hay una atrofia de moderada a grave de las células del túbulo hepatopáncreas que conduce a una disfunción parcial o total del hepatopáncreas. En un camarón sano, la mayor parte de las heces generadas por la digestión del alimento consiste en vacuolas residuales de las células del hepatopáncreas, que implican un proceso importante para empaquetar y eliminar los productos de desecho del sistema digestivo. En los camarones infectados con EHP, cuando el grupo de células del hepatopáncreas se libera del túbulo al tracto gastrointestinal, la combinación de lípidos, alimento digerido/no digerido, EHP y la masa bacteriana contribuirán a la formación de una hebra blanquecina. Es posible, debido a la presencia de lípidos en las heces, que la masa fecal se vuelva más ligera en comparación con las heces de un camarón sano y flote en la superficie del agua en lugar de hundirse al fondo del estanque.

Las alteraciones que involucran el tracto gastrointestinal, donde un signo de la enfermedad son las heces blanquecinas, son comunes a todos los animales, incluidos los humanos. En los humanos, las heces blanquecinas son causadas por cambios en el microbioma intestinal o por patógenos particulares como *Cryptosporidium* spp. Este también podría ser el caso de WFS de camarones, donde la enfermedad, y por lo tanto los signos particulares, son causados por dos etiologías distintas. Nuestro estudio muestra claramente que los dos patógenos inducen heces blancas en camarones y muestra de manera decisiva que EHP juega un papel central en el desarrollo de este síndrome, como propuso nuestro grupo de investigación en **investigaciones anteriores** (<https://www.globalseafood.org/advocate/white-feces-syndrome-shrimp-predictor-ehp/>).

Nuestro estudio proporciona evidencia concluyente de que EHP no es el único patógeno asociado con la presencia del Síndrome de Heces Blancas. En Tailandia, algunos estudios han demostrado la asociación de WFS en la población de camarones con un aumento de *Vibrio* spp. donde se analizaron los intestinos en camarones, con y sin WFS. Un aumento de la población intestinal de *Vibrio* de un camarón normal con $1,8 \times 10^7$ CFU [unidades formadoras de colonias]/g de población frente a camarones WFS con $6,1 \times 10^7$ CFU/g. Algunos de estos *Vibrio* spp. encontrados en esas muestras fueron *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. damsela*. Esto corrobora nuestra identificación de una cepa de *V. parahaemolyticus* como el patógeno no identificado que co-infecta con EHP en camarones que manifiestan WFS. Sin embargo, es posible que otras especies de *Vibrio* además de *V. parahaemolyticus* puedan inducir WFS.

Conclusiones

EHP es un patógeno entérico primario de camarones peneidos. La infección con EHP en asociación con una cepa particular de *V. parahaemolyticus* conduce al desarrollo de WFS. Estos hallazgos también corroboran y brindan una explicación de por qué WFS se manifiesta en áreas donde EHP y *V. parahaemolyticus* también son endémicos.

Authors



LUIS FERNANDO ARANGUREN CARO, PH.D.

Corresponding author
Aquaculture Pathology Laboratory
School of Animal and Comparative Biomedical Sciences
The University of Arizona
Tucson, Arizona, USA

lfarangu@email.arizona.edu (<mailto:lfarangu@email.arizona.edu>)



HUNG N. MAI, PH.D.

Aquaculture Pathology Laboratory
School of Animal and Comparative Biomedical Sciences
The University of Arizona
Tucson, Arizona, USA

**ROBERTO CRUZ-FLOREZ, PH.D.**

Ensenada Center for Scientific Research and Higher Education (CICESE)
Baja California, Mexico

**FRANCES LAUREEN AGCALAO MARCOS**

Aquaculture Pathology Laboratory
School of Animal and Comparative Biomedical Sciences
The University of Arizona
Tucson, Arizona, USA

**ROD RUSSEL R. ALENTON, PH.D.**

Aquaculture Pathology Laboratory
School of Animal and Comparative Biomedical Sciences
The University of Arizona
Tucson, Arizona, USA

**ARUN K. DHAR, PH.D.**

Aquaculture Pathology Laboratory
School of Animal and Comparative Biomedical Sciences
The University of Arizona
Tucson, Arizona, USA

Copyright © 2022 Global Seafood Alliance

All rights reserved.