



Alliance

(<https://www.aquaculturealliance.org>)



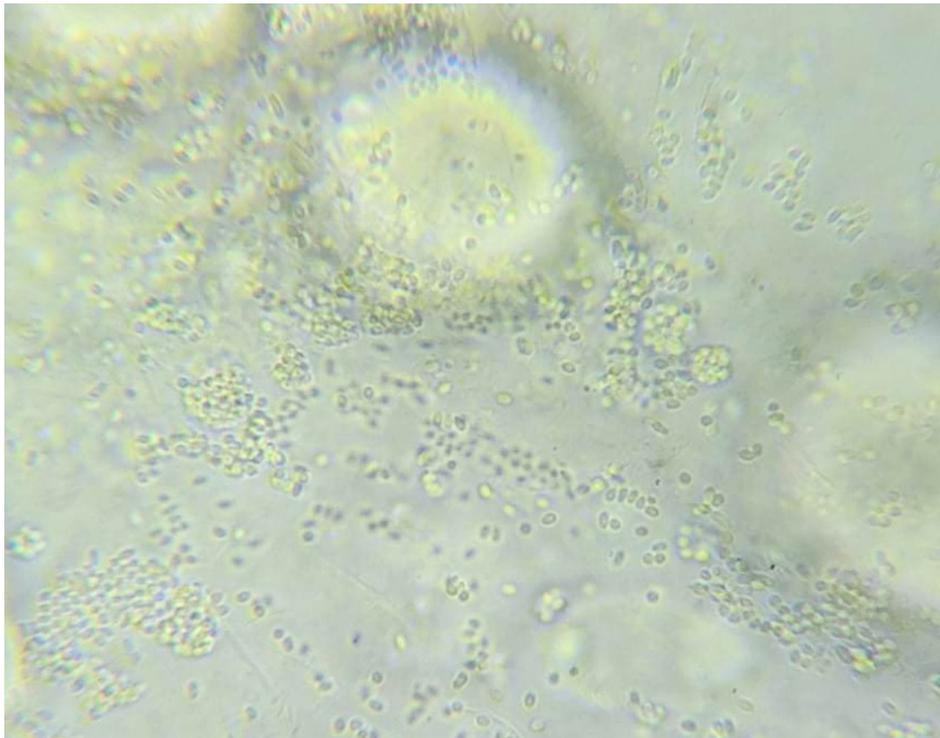
Health & Welfare

Evaluación in vitro de dos biocidas comerciales sobre la tasa de extrusión de esporas de EHP

Tuesday, 8 September 2020

By Khanittha Sang-Ngam , Diva J. Aldama-Cano, Ph.D. , Ornchuma Itsathitphaisarn, Ph.D. , Philippe Mahl , Phuong Do and Hoang Phan, Ph.D.

Ambos biocidas probados tuvieron un efecto inhibitor sobre la tasa de extrusión de esporas



Vista microscópica de esporas de EHP purificadas que no se tiñen.

Microsporidia es un vasto phylum [rango taxonómico para organismos que comparten un plan corporal similar] compuesto por más de 1400 especies de organismos eucariotas [aquellos cuyas células tienen un núcleo encerrado dentro de una envoltura nuclear], parásitos unicelulares e intracelulares relacionados con hongos. Son capaces de infectar una amplia variedad de huéspedes acuáticos y convertirse en un patógeno de gran relevancia en el medio acuático donde ha sido un problema emergente. En 2004, se reportó por primera vez de un microsporidio no identificado en el hepatopáncreas de especímenes de camarón tigre negro (*Penaeus monodon*) afectados por un crecimiento lento en Tailandia.

Sin embargo, no fue sino hasta 2009 cuando este patógeno fue plenamente caracterizado e identificado como *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), y la gravísima enfermedad que provocó en el camarón como la Microsporidiosis Hepatopancreática (HPM). Este patógeno se ha encontrado en el camarón tigre negro, el camarón patiblanco (*P. vannamei*) y posiblemente el camarón kuruma (*Marsupenaeus japonicus*), y se ha reportado en algunos países con importantes industrias acuícolas de camarón, como China, Vietnam, Indonesia, Brunéi, India, Malasia, la región de Australasia (sospechosa), Venezuela y México (posiblemente especies diferentes).

El EHP puede transmitirse horizontalmente a través de la convivencia con especímenes infectados, canibalismo, agua, suelo o equipo contaminados. El ciclo de vida de los microsporidios se divide en tres etapas principales, que incluyen la proliferativa (merogonia), la producción de esporas (esporogonia) y la etapa infecciosa (espora madura). Las esporas son generalmente de forma ovoide, de tamaño pequeño de ~ 1 a 4 μm y contienen un filamento polar de cuatro a cinco espirales que se pueden extruir y utilizar para perforar células hospedadoras e inyectar materiales infecciosos. Se pueden encontrar en los túbulos epiteliales hepatopancreáticos. Durante muchos años, se ha reportado que el principal signo de infección por EHP es un crecimiento retardado en los camarones afectados y sin signos externos visibles; sin embargo, estas infecciones pueden ser un factor de riesgo para que los patógenos oportunistas puedan iniciar infecciones secundarias.



Síndrome de Heces Blancas en Camarones: ¿Predictor de EHP?

Un estudio demuestra una fuerte asociación entre el Síndrome de las Heces Blancas y *Enterocytozoon hepatopenaei* en regiones endémicas de EHP. Las estrategias de bioseguridad pueden minimizar el riesgo de propagación de patógenos en las Américas.



Global Aquaculture Alliance

A medida que la industria del cultivo de camarón se intensifica y aumenta su producción, las enfermedades continúan desempeñando un papel importante en su éxito. Un enfoque ampliamente utilizado para tratar enfermedades en granjas acuáticas es la aplicación de productos químicos bajo estrategias de prevención o remedio para controlar los impactos de las enfermedades y el medio ambiente en el estanque. En el caso del EHP, hubo confusión sobre sus agentes causantes, y generalmente se relacionaba con otras enfermedades como la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND), también conocida como Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS).

A partir de los resultados anteriores de un modelo de desafío de coinfección, se llegaron a varias conclusiones importantes sobre la destrucción progresiva de los tejidos hepatopancreáticos y la susceptibilidad de los camarones a *Vibrio* spp. causando AHPND / EMS y Necrosis Hepatopancreática Séptica (SHPN).

Además, otro estudio encontró una correlación entre EHP y el Síndrome de Heces Blancas (WFS) mientras se cuantificaban cantidades masivas de esporas de EHP en las heces de camarones infectados con WFS. El diagnóstico de EHP puede realizarse mediante microscopía (montaje húmedo de tejido hepatopancreático), métodos moleculares (PCR) y análisis de tejidos (histología o hibridación in situ).

El desarrollo de tensioactivos de superficie y el tratamiento farmacológico para EHP es uno de los métodos adecuados para controlar la EHP. Existe todavía una oportunidad para un gran número de productos que pueden ser estudiados por su idoneidad para tratar y controlar las infecciones por EHP, como los biocidas [sustancias químicas utilizadas para destruir o controlar organismos nocivos]. En este artículo se presentan los resultados y observaciones obtenidos al estudiar el efecto biocida de dos productos comerciales, Aqua-Protect y Antizol (fabricados por Virbac Vietnam). El objetivo de este estudio fue determinar el potencial de estos dos agentes biocidas contra la extrusión de esporas de EHP en condiciones de laboratorio mediante estudios in vitro.

Configuración del estudio

Se obtuvieron dos lotes diferentes de camarones infectados con EHP de dos fuentes geográficamente diferentes: las provincias de Pathum Thani (Lote 1) y Chanthaburi (Lote 2) en Tailandia. Estos camarones fueron aclimatados a temperaturas que oscilaron entre 28 y 29 grados-C con aireación constante en el laboratorio durante 2 días (Unidad de Servicio en Centex Shrimp, Universidad de Mahidol, Bangkok) antes de que se recolectaran sus hepatopáncreas y se usaran para la purificación de esporas de EHP según el método publicado de **Aldama-Cano et al.** (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.039>) (2018). La tasa de extrusión de esporas se midió y se reportó como $77,0 \pm 2,65$ por ciento y $70,3 \pm 2,08$ por ciento, respectivamente, para los Lotes 1 y 2 de las esporas de EHP.

La preparación de las soluciones de prueba de los dos biocidas comerciales fue la siguiente: Aqua-Protect y Antizol se diluyeron en agua destilada para obtener soluciones madre iniciales de 1000 ppm, que luego se diluyeron a 1, 5 y 10 ppm para Aqua-Protect, y 10, 20 y 40 ppm para Antizol para probar en el Lote 1 de las esporas de EHP. Para el Lote 2 de las esporas de EHP, Aqua-Protect se diluyó a 1, 5, 10 y 20 ppm, y Antizol se diluyó a concentraciones de trabajo de 10, 20, 40 y 80 ppm de la reserva de 1000 ppm (Tabla 1). Para ambos lotes, las diluciones se prepararon de 10 a 20 minutos antes de agregar las esporas activas purificadas y el experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente (~ 25 grados-C).

Phan, extrusión de esporas de EHP, Tabla 1

Compuesto biocida	Lote 1 de EHP			Lote 2 de EHP			
Aqua-Protect	1 ppm	5 ppm	10 ppm	1 ppm	5 ppm	10 ppm	20 ppm
Antizol	10 ppm	20 ppm	40 ppm	10 ppm	20 ppm	40 ppm	80 ppm

Tabla 1. Concentraciones de trabajo preparadas de las soluciones de prueba.

En cuanto a los ensayos de extrusión de esporas, los ensayos de inhibición de esporas de EHP se realizaron en tubos de reacción de 100 μ L. Cada tubo se preparó agregando esporas de EHP purificadas a cada concentración de los productos diluidos para lograr la concentración final de esporas de 10^4 esporas / μ L. Las pruebas de control se realizaron en agua destilada estéril (SDW) en lugar de soluciones de prueba. Todas las reacciones se incubaron durante 120 minutos a temperatura ambiente (~ 25 grados-C). Para calcular la velocidad de extrusión, se depositaron 3 μ l de cada reacción en un portaobjetos de vidrio junto con 10 μ l de floxina B al 2 por ciento y 10 μ l de celulosa al 0,2 por ciento, después de lo cual se incubaron durante 10 minutos. Se contaron cien esporas y se puntuaron como esporas extruidas o no extruidas. Cada reacción se contó bajo un microscopio tres veces para calcular una velocidad de extrusión media que, a su vez, se dividió por la velocidad de extrusión del tratamiento de control correspondiente de cada lote para calcular la velocidad de extrusión normalizada (Fig. 1).

Fig. 1: Diagrama esquemático de experimentos de dos fórmulas biocidas sobre esporas de EHP.

Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA), utilizando SPSS versión 22 (IBM). Se aplicó la prueba post-hoc de rango múltiple de Duncan para múltiples comparaciones de diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Resultados y discusión

Las pruebas de extrusión de esporas in vitro se llevaron a cabo con dos lotes de esporas de EHP recolectadas de dos fuentes diferentes de camarones infectados con EHP. Las tasas de extrusión de los tratamientos de control fueron ~ 77,0 por ciento y ~ 70,3 por ciento del primer y segundo lote de esporas, respectivamente (Tabla 1). Estos valores se utilizaron para normalizar la velocidad de extrusión de las esporas tratadas en sus respectivos lotes experimentales.

Se observó que ambos lotes de esporas de EHP activas respondieron a los tratamientos con los biocidas de manera similar. Bajo un microscopio óptico (Leica, aumento de 100 ×), se puede observar un alto número de esporas extruidas en el tratamiento de control (Fig. 2 A; donde los tubos polares han sido extruidos demostrando su etapa activa e infecciosa), mientras que una reducción significativa de la extrusión del tubo polar se observó en las esporas de EHP activas tratadas con 20 ppm de Aqua-Protect (Fig. 2B) y 80 ppm de Antizol (Fig. 2C). El análisis estadístico indicó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en las velocidades de extrusión de esporas de EHP después de ser tratadas con los biocidas (Tabla 2 y Fig. 3).

Fig. 2: Vistas representativas de esporas de EHP extruidas y no extruidas donde los tubos polares están marcados con flechas rojas. (A) Tasa de extrusión de esporas de EHP activas en la muestra de control sin productos químicos añadidos; (B) Extrusión de esporas de EHP activas después de ser tratadas con 20 ppm de Aqua-Protect durante 120 minutos; y (C) Velocidad de extrusión de esporas de EHP activas tratadas con 80 ppm de Antizol durante 120 minutos. La barra de escala es de 20 μm .

Phan, extrusión de esporas de EHP, Tabla 2

Aqua-Protect	Lote 1	Lote 2	Antizol	Lote 1	Lote 2
Control	100 \pm 2.65a	100 \pm 2.08A	Control	100 \pm 2.65x	100 \pm 2.08X
1 ppm	59.74 \pm 3.61b	80.57 \pm 3.79B	10 ppm	9.96 \pm 1.15y	17.06 \pm 1.00Y
5 ppm	38.96 \pm 8.66c	33.18 \pm 6.66C	20 ppm	14.29 \pm 1.00y	9.00 \pm 2.52Y
10 ppm	36.80 \pm 3.51c	18.96 \pm 3.51D	40 ppm	.36 \pm 1.53y	9.00 \pm 2.31Y
20 ppm	N/D	4.74 \pm 0.58E	80 ppm	N/D	3.32 \pm 1.53Y

Tabla 2. Tasa normalizada de extrusión de esporas de EHP después de dos horas de tratamiento. Los datos se presentan como medias \pm desviaciones estándar de las velocidades de extrusión de esporas (porcentaje, %) que se normalizaron frente a la velocidad de extrusión de su respectivo tratamiento de control. N / D - No hecho. Diferentes superíndices son significativamente diferentes entre sí en la misma columna ($p < 0.05$). Las letras mayúsculas y minúsculas representan datos de cada lote de esporas de EHP analizadas.

N/D – Not Done. Different superscripts are significantly different from one another in the same column ($p < 0.05$). Uppercase letters and lowercase letters represent data from each batch of EHP spores tested.

Fig. 3: Velocidad normalizada de extrusión de esporas después de 120 minutos de incubación con cada compuesto a diferentes concentraciones. Las velocidades de extrusión de cada experimento se normalizaron frente a la velocidad de extrusión de su respectivo experimento de control. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), las letras A, B, C y D minúsculas y mayúsculas indican diferencias en los tratamientos de Aqua-Protect, mientras que X e Y minúsculas y mayúsculas indican diferencias en los tratamientos de Antizol.

Los datos de las pruebas muestran que los biocidas fueron eficaces contra ambos lotes de esporas de EHP inhibiendo la extrusión del tubo polar de esporas después de 120 minutos de incubación (Tabla 2 y Fig. 3). Para Antizol, las tasas máximas de inhibición variaron del 92,6 por ciento (Lote 1, 40 ppm) al 96,7 por ciento (Lote 2, 80 ppm), mientras que

para Aqua-Protect las tasas de inhibición fueron del 63,2 por ciento (Lote 1, 10 ppm) a 95,2 por ciento (lote 2, 20 ppm).

Comparando los dos productos, Antizol fue más efectivo que Aqua-Protect a la misma dosis de 10 ppm, mientras que Aqua-Protect fue más efectivo que Antizol a la dosis de 20 ppm (Tabla 2 y Fig. 3). Se encontró que el efecto inhibitor de Aqua-Protect depende de la dosis ya que un aumento en la concentración de 1 ppm a 20 ppm condujo a una disminución en la velocidad de extrusión. Sin embargo, la velocidad de extrusión en respuesta a la aplicación de Antizol no disminuyó significativamente ya que la dosis aumentó de 10 ppm.

Conclusión

Los resultados de nuestro estudio presentado aquí mostraron que los biocidas Aqua-Protect y Antizol tuvieron un efecto inhibitor sobre la tasa de extrusión de las esporas de EHP cuando se trataron in vitro en condiciones de laboratorio. Si bien ambos biocidas parecen inhibir la extrusión en un entorno de laboratorio estricto, es necesario considerar varios factores al optimizar los procedimientos para su uso en el campo, como los niveles de toxicidad para los animales (los datos están disponibles), los métodos / estrategias de aplicación, las concentraciones óptimas de trabajo, área o volumen de agua a tratar y otras consideraciones.

También sería necesario determinar si un enfoque profiláctico o preventivo es más adecuado que un enfoque correctivo, ya que se ha recomendado que la mayoría de los productos químicos evaluados para posiblemente combatir las infecciones por EHP se utilicen entre períodos de cultivos como medida preventiva de bioseguridad. Una vez que se determine el mejor enfoque, el uso de desinfectantes como biocidas para controlar las infecciones por EHP podría convertirse en una práctica común tanto para los camaroneros afectados como para los no afectados.

Referencias disponibles del autor correspondiente.

Authors



KHANITTHA SANG-NGAM

Virbac, Aquaculture Division, France



DIVA J. ALDAMA-CANO, PH.D.

Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology (CENTEX Shrimp)
Mahidol University, Thailand

**ORNCHUMA ITSATHITPHAISARN, PH.D.**

Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology (CENTEX Shrimp)
Mahidol University, Thailand

**PHILIPPE MAHL**

Virbac, Aquaculture Division, France

**PHUONG DO**

Virbac, Aquaculture Division, France

**HOANG PHAN, PH.D.**

Autor correspondiente
Virbac, Aquaculture Division, France

hoang.phan@virbac.vn (<mailto:hoang.phan@virbac.vn>).

Copyright © 2016–2020 Global Aquaculture Alliance

All rights reserved.