



ALLIANCE™

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



 Health & Welfare

# El microsporidio *Perezia* sp. y la enfermedad de algodón del camarón

23 September 2019

By Jee Eun Han, DVM, Ph.D. , Seung Chan Lee , Seul Chan Park and Marc Le Groumellec, DVM, Ph.D.

Detección por histopatología, y por nuevos métodos de hibridación in situ y PCR



En este estudio se analizaron muestras de camarones infectados con microsporidios, incluido el camarón tigre negro (*Penaeus monodon*), recolectadas en Madagascar, Mozambique y el Reino de Arabia Saudita y con signos clínicos de enfermedad del camarón de algodón. Foto de Darryl Jory.

Los microsporidios son parásitos intracelulares obligados en una variedad de huéspedes, desde invertebrados hasta humanos. La investigación de microsporidios se ha centrado más en hospedadores terrestres, pero aproximadamente el 50 por ciento de los géneros conocidos de microsporidios infectan hospedadores acuáticos como crustáceos y peces. Estas infecciones microsporidianas de huéspedes acuáticos se consideran un peligro potencial para la salud, así como un riesgo financiero en la acuicultura.

Una de las enfermedades críticas que afectan el cultivo del camarón es la "enfermedad de algodón del camarón" (CSD), y los agentes causantes asociados con esta enfermedad son los microsporidios que se encuentran en al menos cinco géneros, incluidos *Pleistophora*, *Thelohania*, *Perezia*, *Agmasoma* y *Ameson*. Estos parásitos microsporidianos infectan principalmente el músculo esquelético, haciendo que las regiones del cuerpo afectadas sean blancas u opacas, lo que le da el nombre común a esta enfermedad. Los camarones ligeramente infectados pueden verse y comportarse normalmente, pero las infecciones graves hacen que los camarones no sean comercializables o no sean comestibles. En los camarones, el aspecto blanco opaco del músculo está relacionado principalmente con infecciones microsporidianas. Sin embargo, otros agentes causales como los dinoflagelados, las bacterias o los virus también pueden estar relacionados con esta enfermedad.

Este estudio se centró en el microsporidio asociado con CSD en camarones recolectados de Madagascar, Mozambique y el Reino de Arabia Saudita. Investigamos sus características histopatológicas y determinamos su clasificación taxonómica por secuenciación de subunidades pequeñas de rADN (SSU de rADN). Estas secuencias se usan ampliamente para dilucidar las relaciones evolutivas entre organismos, ya que son de origen antiguo y se encuentran en todas las formas de vida conocidas.

Además, se desarrollaron métodos de diagnóstico específicos para esta enfermedad basados en: 1. hibridación in situ [ISH; un tipo de hibridación usando una cadena marcada complementaria de ADN, ARN o ácidos nucleicos modificados (es decir, sonda) para localizar una secuencia específica de ADN o ARN en una porción o sección de tejido]; y 2. reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un método ampliamente empleado en biología molecular para hacer numerosas copias de un segmento de ADN específico) dirigido a la secuencia de SSU de rADN.



A comprehensive solution for the wild seafood supply chain.

- ✓ Crew rights
- ✓ Food safety
- ✓ Environmental responsibility

**Best Seafood Practices**

LEARN MORE >

(<https://bspcertification.org/>).

## Configuración del estudio

Un total de 298 muestras de camarones con signos clínicos de CSD fueron enviadas desde Madagascar, Mozambique y Arabia Saudita Laboratorio de Patología Acuícola de la Universidad de Arizona durante un período de varios años. La Tabla 1 resume la información relevante.

## Han, CSD, Tabla 1

País y especies	Estadío	Grado	Órgano objetivo	No. muestras positivas/totales	PCR
Madagascar (P. monodon)	Adult	G3-G4	Músculo	3/3	NA
Madagascar (P. monodon)	Juvenil	G3-G4	Músculo/HP	6/30	NA
Madagascar (P. monodon)	Sub-adulto	NA	Músculo/HP	NA	pos.
Madagascar (P. monodon)	Sub-adulto	G3-G4	Músculo/HP	4/19	NA
Madagascar (P. monodon)	Adulto	G2-G3	Músculo /HP/corazón	3/5	NA
Madagascar (P. monodon)	Sub-adulto	G1-G3	Músculo/HP	6/28	NA
Madagascar (P. monodon)	Juvenil	NA	Músculo	NA	pos.
Madagascar (P. monodon)	Juvenil	G3-G4	Músculo/HP	35/35	NA
Madagascar (P. monodon)	Juvenil	NA	Músculo/HP	NA	pos.
Mozambique (P. monodon)	Juvenil	G3-G4	G3-G4 Músculo /HP/agallas/corazón/LO	4/23	NA
Mozambique (P. monodon)	PL	G3-G4	G3-G4 Músculo /HP/agallas/corazón/LO	2/50	NA
Mozambique (P. monodon)	Adulto	G3-G4	G3-G4 Músculo /HP/agallas/corazón/LO	4/4	NA
Saudi Arabia (P. indicus)	Adulto	G4	G3-G4 Músculo /HP/agallas/corazón/LO	3/3	NA
Saudi Arabia (P. indicus)	Adulto	G2-G4	Músculo/HP	30/93	NA
Saudi Arabia (P. indicus)	Adulto	NA	Músculo	NA	pos.
Saudi Arabia (P. indicus)	Juvenil	G2-G4	Músculo/HP	5/5	NA

Tabla 1. Muestras de la enfermedad de algodón del camarón utilizadas en este estudio (modificado de la tabla original). Las muestras se analizaron mediante examen histopatológico (para presencia de microsporidios) y ensayos de PCR. El sistema de grado G varía de G0 (negativo) a G4 (gravedad más alta). La columna de PCR indica el órgano diana positivo para *Perezia* sp. (HP: hepatopáncreas; LO: órgano linfoide). PL: postlarvas; pos: positivo; na: no disponible.

## Resultados y discusión

### Examen de histopatología

En camarones y otros crustáceos, *Perezia* spp. destruye los músculos y reemplaza gradualmente la musculatura por masas de etapas de desarrollo de parásitos y esporas. En las últimas etapas de la infección, los parásitos pueden invadir otros tejidos y órganos, como los cardiomiocitos, las células epiteliales y del tejido conectivo de las glándulas antenales, en el mismo camarón. En este estudio, varios tejidos del mismo camarón se vieron afectados por este microsporidio. El examen de histopatología reveló numerosas esporas de microsporidios en muestras recolectadas de Madagascar, Mozambique y Arabia Saudita. La infección afectó principalmente al hepatopáncreas y al músculo, en el nivel de gravedad correspondiente a grados que van desde G1 a G4.

Se observaron esporas maduras entre las fibras del músculo esquelético (Fig. 1A, B) y las etapas previas a las esporas y las esporas del epitelio infectado de los túbulos del hepatopáncreas (Fig. 1C, D). En las infecciones graves, también se observaron esporas dentro de las células epiteliales del filamento branquial (Fig. 1E, F), fibras musculares cardíacas (Fig. 1G) y células parenquimatosas del órgano linfoide (Fig. 1H). Las esporas que se extienden por todo el organismo en las etapas avanzadas de la infección podrían haberse derivado de la infección muscular: los músculos se deterioraron gradualmente y las esporas contaminaron los tejidos circundantes. Además, la mayoría de los casos (90 por ciento) de CSD fueron acompañados por infecciones de la enfermedad de ensuciamiento de las branquias causadas por *Zoothamnium* sp. o *Epistylis* sp., que indicó que los animales que sufren microsporidiosis probablemente eran débiles y susceptibles a infecciones secundarias o infestaciones.

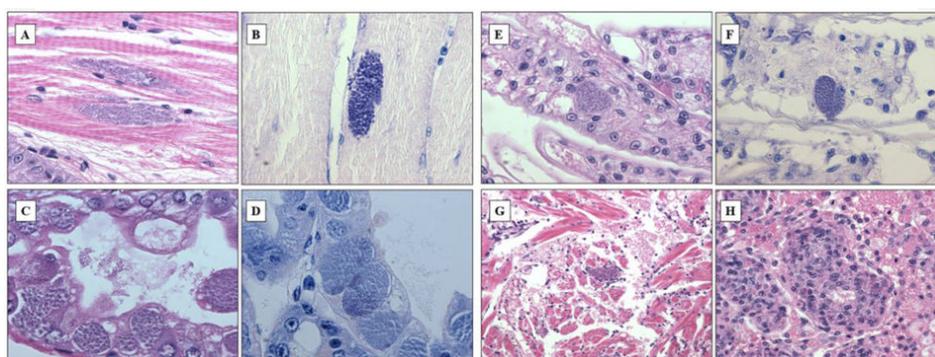


Fig. 1: Lesiones representativas características de la enfermedad causada por el microsporidio encontrado en camarones peneidos de Madagascar, Mozambique y Arabia Saudita. (A, B) Esporas maduras acumuladas entre las fibras musculares esqueléticas; (C, D) preesporas (flechas) y etapas de esporas (puntas de flecha) dentro de las células epiteliales del túbulo del hepatopáncreas (el recuadro muestra células desprendibles); (E, F) acumulaciones

intracitoplasmáticas de esporas maduras dentro de las células epiteliales del filamento branquial; (G) esporas maduras dentro de las fibras musculares del corazón; (H) células parenquimatosas de túbulos de órganos linfoides. Tinción: (A, C, E, G, H) hematoxilina / eosina-floxina de Mayer-Bennett; (B, D, F) Giemsa. Barras de escala = 30  $\mu$ m.

## Secuencia de SSU de rADN del nuevo microsporidio que causa CSD

Realizamos una PCR dirigida a las secuencias de SSU de rADN de los camarones que exhibían CSD, recolectados en Madagascar, y se obtuvo un fragmento de 1,2 kbp y se secuenciaron. La secuencia de nucleótidos de SSU de rADN se depositó en Genbank. Según los resultados de la prueba, la secuencia de nucleótidos tenía una identidad del 94 por ciento con la secuencia de SSU de rADN de *Pleistophora* sp. infectando a *Penaeus setiferus*, y 93 por ciento de identidad con la de un microsporidio no identificado de *Metapenaeus joineri*. En 2002, *Pleistophora* sp. de *P. setiferus* fue re-identificado como *Perezia nelsoni* mediante exámenes morfológicos. En base a la información de secuencia, por lo tanto, ahora consideramos que el microsporidio recién identificado pertenece al género *Perezia*, y nos referiremos a él como *Perezia* sp. lo sucesivo. La CSD causada por *Perezia* sp. parece extenderse a varios países productores de camarones, incluidos Madagascar, Mozambique, Arabia Saudita (el presente estudio), Estados Unidos y Japón, pero no se ha estudiado lo suficiente.

En este estudio, los ADN genómicos extraídos de las muestras de Madagascar y Arabia Saudita se sometieron a PCR con cebadores específicos dirigidos a SSU de rADN. Las secuencias obtenidas fueron 100 por ciento idénticas para ambas muestras. Casualmente, el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) detectado en estos mismos 3 países (Madagascar, Mozambique y Arabia Saudita) también mostró patrones genómicos idénticos.

## *Perezia* sp. – ISH específico

La sonda reaccionó fuertemente tanto al músculo esquelético como al hepatopáncreas (Fig. 2A-C), y también a otros órganos como las branquias, el corazón y los órganos linfoides (datos no mostrados), correspondientes a los resultados de histopatología. La sonda diseñada a partir de la secuencia de SSU de rADN de *Perezia* sp. parecía ser específico para camarones con síntomas de CSD de Madagascar, Mozambique y Arabia Saudita.

Al principio, identificamos erróneamente la infección de *Perezia* sp. como infección por EHP mediante examen histopatológico normal. Sin embargo, esta sonda ISH no reaccionó a *P. stylirostris* infectado con *E. hepatopenaei* (Fig. 2D). No se observó reacción en ninguno de los tejidos preparados a partir de *P. vannamei* libre de patógenos. Tampoco *P. vannamei* y *P. monodon*, así como los poliquetos infectados con un microsporidio similar a *Agmasoma* no identificado, no reaccionaron a las sondas ISH (datos no incluidos aquí).

Fig. 2: Ensayo de hibridación in situ (ISH) con una sonda génica marcada con digoxígeno específica para la detección del microsporidio que causa la enfermedad de algodón del camarón. El precipitado azul oscuro indica la presencia del parásito (A) dentro de las células epiteliales del túbulo hepatopáncreas de *Penaeus indicus* de Arabia Saudita, (B) entre las fibras musculares esqueléticas de *P. monodon* de Mozambique y (C) dentro de las células epiteliales del túbulo hepatopáncreas de *P. monodon* de Madagascar. (D) Parte del hepatopáncreas de *P. stylirostris* de Brunei infectada por *Enterocytozoon hepatopenaeique* muestra resultados representativos, enfatizando la especificidad de la sonda como lo demuestra la ausencia de precipitado azul oscuro. Mancha: contratinción Bismark-Brown. Barras de escala = 30 µm.

### **Perezia sp. – PCR específica**

Para fines de diagnóstico, diseñamos un par de cebadores de PCR dirigidos al ADN de *Perezia* sp. y generamos un amplicón de 443 pb (término de biología molecular para designar una pieza de ADN o ARN que es la fuente y/o producto de los eventos de amplificación o replicación), que se muestra en la Fig. 3. Esta reacción de PCR es específica del microsporidio *Perezia* sp. que causa CSD, y por lo tanto puede ser útil para monitorear este parásito. Estos cebadores no reaccionaron al ADN microsporidiano de los camarones infectados con *E. hepatopenaei* (datos no mostrados). Además, no hubo reacción cruzada al ADN genómico de los camarones (*P. vannamei*, *P. monodon*, *P. indicus*, *P. stylirostris* y *Macrobrachium rosenbergii*), poliquetos, calamares y *Artemia* spp. (datos no mostrados).

No analizamos las muestras de Mozambique por PCR, pero la sonda reaccionó intensamente a ISH depositando los productos de reacción en las células objetivo en las muestras de Mozambique. En este estudio, describimos microsporidios que infectan los músculos y el hepatopáncreas que causan CSD en camarones de Madagascar, Mozambique y Arabia Saudita en la región del Mar Rojo-Océano Índico.

Fig. 3: Resultados de PCR específicos de *Perezia* sp. Carriles 1-2: Hepatopáncreas de *Penaeus monodon* de Madagascar; Carriles 3-6: músculo de *P. monodon* de Madagascar; Carriles 7-8: músculo de *P. indicus* de Arabia Saudita; Carril 9: Enterocytozoon hepatopenaei (EHP); Carril 10: control libre de patógenos específicos (SPF); Carril 11: control negativo (NC).

## Perspectivas

Las infecciones microsporidianas se confirmaron mediante análisis histopatológico y los parásitos se identificaron como *Perezia* sp. Además, desarrollamos ensayos de ISH y PCR capaces de detectar este parásito. Estos métodos pueden ayudar a los productores de camarones en el diagnóstico y manejo de la CSD causada por el microsporidio *Perezia* sp.

*Referencias disponibles de la primera autora.*

## Authors

---



**JEE EUN HAN, DVM, PH.D.**

Laboratory of Aquatic Biomedicine, College of Veterinary Medicine  
Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

[hanje1223@gmail.com](mailto:hanje1223@gmail.com) (<mailto:hanje1223@gmail.com>)



**SEUNG CHAN LEE**

Laboratory of Aquatic Biomedicine, College of Veterinary Medicine  
Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea



**SEUL CHAN PARK**

Laboratory of Aquatic Biomedicine, College of Veterinary Medicine  
Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea



**MARC LE GROUMELLE, DVM, PH.D.**

AQUALMA, Aquaculture de la Mahajamba  
Mahajanga 401, Madagascar

All rights reserved.