Microsporidiosis en hepatopáncreas de camarones. Aplicación y limitaciones de las técnicas disponibles para su detección y vigilancia

Alexander Varela Mejías[1] ; José Cuauhtémoc Ibarra Gamez[1]*,
Luis Choc Martínez[2]

[1]Instituto Tecnológico de Sonora. Departamento de Biotecnología Acuícola. México
[2]Universidad de San Carlos de Guatemala, Escuela de Veterinaria, Unidad de Parasitología.

Artículo recibido el 25 de septiembre de 2025 y aceptado el 6 de febrero de 2026

Microsporidiosis in shrimp hepatopancreas: Application and limitations of available techniques for its detection and surveillance.

Abstract

Shrimp farming faces increasing challenges due to the impact of emerging diseases, among them microsporidiosis affecting the shrimp hepatopancreas. In recent years, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) has become the most significant microsporidian in terms of health and economic impact, owing to its wide geographic distribution and its ability to undergo horizontal transmission among shrimp, which complicates control measures. Microsporidian infections are often associated with growth retardation, size disparity, and greater susceptibility to bacterial coinfections. Their clinical signs lack diagnostic value due to their nonspecificity. Given this situation, it is essential to have reliable surveillance and detection systems. Currently, rapid techniques such as fresh mounts and stained smears are available, as are histopathological methods that enable evaluation of tissue infection, and molecular tools such as PCR, which provide sensitivity and specificity. However, no single technique ensures a definitive diagnosis; therefore, the combination of at least two approaches is recommended to improve the quality of results. Strengthening biosecurity systems, along with training farm and laboratory personnel, is key to implementing effective monitoring and early diagnosis programs. These efforts are fundamental to mitigating sanitary risks and preserving the sustainability of shrimp production.

Key words: microsporidia, hepatopancreas, diagnosis, *Enterocytozoon hepatopenaei*.

Resumen

La camaronicultura enfrenta desafíos crecientes debido al impacto de enfermedades emergentes, entre ellas la microsporidiosis, que afecta el hepatopáncreas de los camarones. En los últimos años, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) se ha consolidado como el microsporidio de mayor relevancia sanitaria y económica, debido a su amplia dispersión geográfica y a su capacidad de transmisión horizontal entre camarones, lo que dificulta las medidas de control. Las infecciones por microsporidios suelen asociarse con retraso en el crecimiento, disparidad de tallas y mayor susceptibilidad a coinfecciones bacterianas. Sus signos clínicos carecen de valor diagnóstico debido a su inespecificidad. Ante esta situación, resulta esencial contar con sistemas de vigilancia y detección confiables. Actualmente se dispone de técnicas rápidas como el análisis en fresco y las improntas teñidas, métodos histopatológicos que permiten evaluar la infección en tejidos y herramientas moleculares, como PCR, que aportan sensibilidad y especificidad. Sin embargo, ninguna técnica por sí sola asegura un diagnóstico concluyente, por lo que se recomienda combinar al menos dos enfoques

*Autor de correspondencia
Email: jose.ibarra@itson.edu.mx
ISSN 2594-0384 (Electrónica)

para mejorar la calidad de los resultados. El fortalecimiento de los sistemas de bioseguridad, unido a la capacitación de personal en granjas y laboratorios, es clave para implementar programas efectivos de monitoreo y diagnóstico temprano. Estos esfuerzos son fundamentales para mitigar el riesgo sanitario y preservar la sostenibilidad de la producción camaronera.

Palabras clave: microsporidia, hepatopancreas, diagnostico, *Enterocytozoon hepatopenaei*.

Introducción

Uno de los principales desafíos que enfrenta la camaronicultura, a nivel global, es el impacto generado de las patologías sobre sus producciones (OMSA, 2019). Esto es especialmente palpable al surgir nuevos patógenos, o cuando estos ingresan en áreas geográficas en las cuales no se habían detectado previamente. Desafortunadamente, esta dispersión de patógenos ha sido frecuentemente documentada y muchas veces facilitada por la actividad humana (Arthur *et al*., 2008; López-Carvallo *et al*., 2022; Nunan *et al.*, 2014; Pantoja y Lightner, 2014; Tang *et al.*, 2017; Varela y Peña, 2017).

Del mismo modo, la movilización y dispersión de los hospedadores potenciales en una metapoblación generan una estructura espacial que puede facilitar el establecimiento inicial de un patógeno exótico. La influencia de esta estructura depende tanto de la biología del patógeno como de las características del entorno. En general, los patógenos que se dispersan mediante el movimiento de hospedadores infectados pueden colonizar fácilmente nuevas regiones. Así, la probabilidad de propagación de enfermedades está determinada por la interacción entre el rango de dispersión, la biología del patógeno y la estructura espacial del entorno (North y Godfray, 2017).

Durante los últimos años, el descubrimiento, descripción, detección y dispersión de nuevas especies de microsporidios, afectando particularmente al hepatopáncreas de los camarones, han cobrado relevancia. Siendo *Enterocytozoon hepatopenaei* la especie que ha generado mayor interés. Desde su descripción inicial (Tourtip *et al*., 2009), ha sido detectado y documentado en países como Tailandia, Vietnam, India, China, Indonesia, Malasia y Venezuela, se prevé que su dispersión continúe a otras regiones de producción de camarones (López-Carvallo *et al*., 2022; Tang *et al.*, 2017).

Previo al descubrimiento del *E. hepatopenaei*, la incidencia de microsporidiosis en camarones se atribuía a géneros como *Agmasoma* sp., *Ameson* sp., *Perezia* sp., *Pleistophora* sp. y *Tuzetia* sp., que comparten la característica de utilizar a los camarones como hospedadores intermediarios y a otra especie, generalmente peces, como hospedadores definitivos. Estos microsporidios generan un cuadro clínico muy característico en los camarones, denominado *"camarón de algodón"* o *"camarón de leche"* (Canning *et al*., 2002; Cuéllar-Anjel, 2014; Ibarra-Gámez *et al*., 2023; Jaroenlak *et al*., 2016; Johnson, 1995; Lightner, 1996).

Sin embargo, para *E. hepatopenaei*, los estudios realizados demostraron su capacidad para propagarse de forma horizontal, directamente entre camarones, sin necesitar de los peces como hospedadores y transmitiéndose oralmente mediante canibalismo y cohabitación entre animales infectados y sanos, lo cual dificulta su manejo y prevención (Chaijarasphong *et al*., 2020; Jaroenlak *et al*., 2016; Munkongwongsiri *et al.*, 2021; Tangprasittipap *et al*., 2013).

Para las infecciones de microsporidios en hepatopáncreas, los signos clínicos son inespecíficos y carecen de todo valor diagnóstico. Entre ellos, se ha observado un crecimiento retardado de los camarones afectados, ocasionando una elevada dispersión de tallas (Figura 1a), así como hepatopáncreas e intestino con coloración pálida (Figura 1b), y en ocasiones se ha asociado a la presencia del Síndrome de las heces blancas, en especial cuando se presentan en coinfecciones con bacterias, generalmente *Vibrio* (Aldama-Cano *et al*., 2018; Cruz-Flores *et al*., 2019; Ha *et al*., 2010; Munkongwongsiri *et al.*, 2021; Piamsomboon y Han, 2022; Shen *et al*., 2021; Tang *et al*., 2017).

Los microsporidios son parásitos intracelulares que se desarrollan en el citoplasma o, en algunos casos, en el núcleo. Carecen de mitocondrias y dependen del ATP producido por la célula invadida. Sus estrategias patogénicas varían, mientras algunas especies forman vesículas protectoras o estructuras denominadas *complejos xenoparasíticos*, reconfigurando a la célula parasitada, otras se desarrollan en contacto directo con el entorno intracelular, evadiendo, en ambos casos, el reconocimiento por parte del sistema inmune del hospedador (Stentiford *et al*., 2017).

Adicionalmente, en el caso de *E. hepatopenaei*, se ha demostrado que puede actuar como factor de riesgo, incrementando la susceptibilidad a

infecciones bacterianas posteriores (Aranguren *et al*., 2017), y no se han encontrado tratamientos eficaces para su eliminación, siendo en muchas ocasiones costosos e inviables para estanques con camarones, por sus costos o por las condiciones extremas requeridas (Munkongwongsiri *et al*., 2021; Piamsomboon y Han, 2022).

Paralelo a la implementación de sistemas de bioseguridad, entre los que se incluye el uso de post larvas libres de patógeno y medidas de control y reducción de riesgo de ingreso de patógenos a centros de producción, es importante mantener sistemas de vigilancia activos que faciliten el monitoreo de poblaciones de camarones, verifiquen la eficacia de los sistemas de bioseguridad y permitan la detección de infecciones tempranas. Esto facilita y agiliza el manejo y toma de decisiones por parte del personal de producción (de Blas y Muniesa, 2014; Cuéllar-Anjel, 2014).

Ahora bien, para cualquier abordaje sanitario se debe considerar el tamaño y tipo de muestra a utilizar, para que esta sea representativa de la población en estudio. Se debe definir el tipo de muestra, ya sea dirigida o al azar, el tamaño de dicha muestra, el nivel de confianza en la técnica diagnóstica utilizada y su sensibilidad, así como el número esperado de animales potencialmente infectados y el tamaño de la población en estudio (de Blas y Muniesa, 2014; Lightner, 1996; Lightner y Pantoja, 2001).

Por ello, con el fin de facilitar la planeación y establecimiento de sistemas de vigilancia y detección en los centros de producción, se presentan a continuación, las principales técnicas diagnósticas disponibles en la actualidad y sus características, así como sus alcances y limitaciones.

Montajes en fresco e improntas

Por los equipos, entrenamiento, personal y tiempo de respuesta requerido, el análisis en fresco suele ser el método realizado con mayor frecuencia en granjas. Además, su aplicación rutinaria permite el desarrollo de pericia por parte de los analistas (Jithendran *et al*., 2021; Lightner. 1996; Morales-Covarrubias, 2013; Varela y Choc, 2020).

Mediante el uso de esta técnica, se puede realizar un monitoreo exploratorio y preliminar de microsporidiosis. Para ello, se debe disgregar suavemente el tejido hepatopancreático en un portaobjetos con agujas o pinzas finas y colocar un cubreobjetos con una presión muy ligera. En casos de infecciones moderadas o altas, es posible observar a las esporas, ovoides y regulares (Figura 1c). Sin embargo, puede resultar difícil identificar dichas estructuras debido a su pequeño tamaño (1,1 ± 0,2 por 0,6-0,7 ± 0,1 µm). El diagnóstico presuntivo se realiza mediante la observación de las esporas características al microscopio con el lente de 100X y utilizando aceite de inmersión. Este método puede ser ineficaz cuando la presencia de esporas es baja. Además, se requiere personal capacitado o con experiencia para la identificación específica de estos microorganismos (Chaijarasphong *et al*., 2020).

Para facilitar la detección de las esporas, se puede recurrir al uso de improntas teñidas, utilizando colorantes convencionales. Las preparaciones del frotis a partir de la muestra fecal o de hepatopáncreas se colocan en un portaobjetos, formando una capa delgada de tejido y se dejan secar a temperatura ambiente, para luego fijar con metanol durante 15 minutos y teñirlas con colorantes como Floxina B, Verde malaquita, Giemsa o Eosina y hematoxilina, se deja penetrar al colorante y se lava con agua corriente, para retirar el exceso (Figura 1d). Nuevamente, se observa el frotis con el lente de 100X y aceite de inmersión (Chaijarasphong *et al*., 2020; Jithendran *et al*., 2021).

Se debe tener claro que las técnicas de análisis en frescos y el uso de improntas teñidas constituyen análisis rápidos, útiles para la toma de decisiones o monitoreos de rutina. Pero que representan técnicas preliminares, no confirmatorias, ya que poseen baja especificidad y sensibilidad, asimismo, los analistas deben estar familiarizados con las esporas (Chaijarasphong *et al*., 2020; Jithendran *et al*., 2021; Piamsomboon y Han, 2022).

Por su naturaleza y alcance, este tipo de técnicas es propensa a generar *falsos negativos*. Para diagnósticos definitivos es necesario recurrir a otros métodos de mayor confiabilidad. En el caso de personal ya familiarizado con este tipo de patógenos mediante histopatología, es posible detectar esporas mediante análisis en fresco con mayor facilidad. Sin embargo, esto no es un condicionante obligatorio.

Finalmente, existen cuadros clínico-lesionales en hepatopáncreas con fuertes similitudes a los causados por las microsporidiosis en hepatopáncreas, por ejemplo, las generadas por infecciones de haplosporidios (Cuéllar-Anjel, 2014; Johnson, 1995; Lightner, 1996; Varela, 2018). Pudiendo originar falsos positivos. Ante ello, en casos sospechosos se pueden enviar muestras a laboratorios externos especializados.

Técnicas histopatopatológicas

Su utilización, permite no solamente detectar a los



Figura 1. a) Disparidad de tallas, signo clínico que podría estar ocasionado por presencia de microsporidios en hepatopáncreas. b) Juvenil de *Penaeus vannamei* mostrando palidez en hepatopáncreas. c) Observación microscópica de hepatopáncreas, sin tinción, presencia de posibles microsporidios. 100X. d) Impronta de hepatopáncreas fijada con metanol, presencia elevada de estructuras basofílicas, ovoides y regulares (flechas), compatibles con microsporidios. 100X. H&E

microsporidios, sino, además, observar los diferentes estadios de desarrollo del parásito y determinar el grado de infección y afectación en los tejidos, así como la posible presencia de otras patologías o estado físico general del organismo (Lightner, 1996; Varela, 2023), lo que le confiere gran aplicabilidad.

Existen protocolos ampliamente utilizados para el procesamiento de muestras de camarones. Presentando algunas variaciones, pero todos enfatizando en la importancia de la adecuada fijación de la muestra, generalmente utilizando para ello el Davidson AFA y en el posterior procesamiento de los tejidos de interés (Bell y Lightner, 1988; Howard *et al*., 2004; Lightner, 1996; Varela, 2023).

Histopatológicamente, los camarones afectados por microsporidiosis en hepatopáncreas, muestran presencias variables de esporas, las cuales se pueden observar dentro de las células epiteliales de los túbulos, así como libres en el interior del lumen tubular (Figura 2a). Estas esporas son ovoides, ligeramente basofílicas y dependiendo del estadio de desarrollo, es posible observar plasmodios multinucleados esporogonales (Figura 2b), los cuales son inicialmente eosinofílicos y posteriormente se tornan fuertemente basofílicos. No se observan respuestas inmunes como

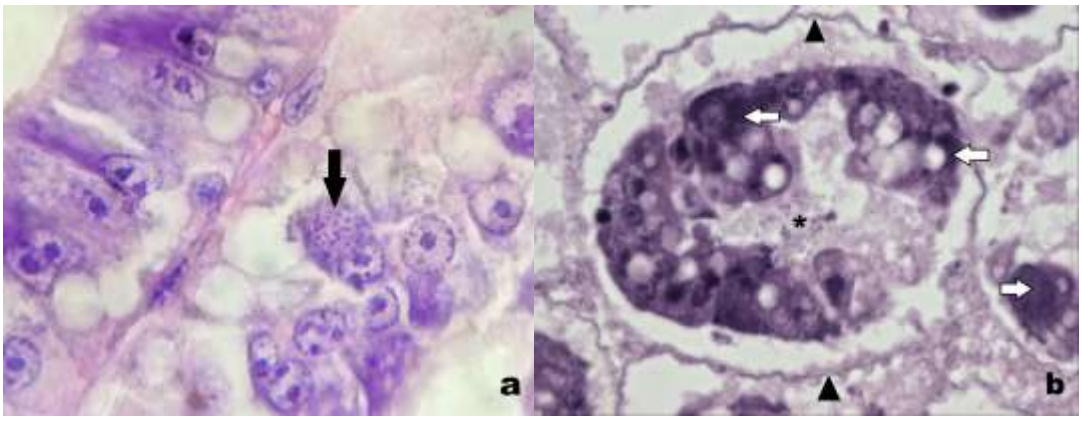


Figura 2. Secciones histopatológicas de hepatopáncreas infectados por microsporidios. a) Corte sagital de la región medial de un túbulo: se observan estructuras basofílicas (flecha), dentro del citoplasma de una célula epitelial. b) Corte axial de túbulo en el cual se observan esporas libres en el lumen (asterisco), plasmodios basofílicos (flechas); se observa, además, el desprendimiento epitelial de su membrana basal (cabezas de flecha), atrofia, desprendimientos celulares y algunas células picnóticas. Ninguna de las dos imágenes muestra respuestas inflamatorias por parte del hospedador. Tinción H&E. 100X.

agregación hemocítica o melanosis (Tourtip *et al*., 2009; Varela, 2018; Tang *et al*., 2017).

Sin embargo, dadas las dimensiones de los microsporidios y considerando los límites de definición de la histopatología, no es posible identificar la especie particular presente mediante esta técnica. Para ello, la especificidad puede ser incrementada con la inclusión de herramientas como la hibridación *in situ* o confirmación mediante técnicas moleculares como el PCR (López-Carvallo *et al*., 2022; Munkongwongsiri *et al*., 2021; Tang *et al*., 2017).

No obstante, se debe considerar que, aun sin reconocer en forma concluyente la especie de microsporidio presente, todo microsporidio en hepatopáncreas es potencialmente patogénico y, por tanto, indeseable. Por lo tanto, la histopatología presenta alta aplicabilidad y suficiente sensibilidad para detectar sus infecciones.

Técnicas moleculares

Se han desarrollado múltiples metodologías y protocolos para la detección de microsporidios en el hepatopáncreas, como PCR convencional, PCR en tiempo real, PCR anidada, LAMP, qPCR, etc. (Jithendran *et al*., 2021; Jaroenlak *et al*., 2016; Rajendran *et al*., 2016).

Muchas de estas metodologías han demostrado ser altamente específicas para el diagnóstico de EHP, sin embargo, en algunos casos se han demostrado ser menos selectivas en la detección de otros microsporidios que infectan a camarones. Por ejemplo, los métodos que utilizan cebadores dirigidos al gen SSU-rRNA del *E. hepatopenaei* pueden presentar reacción cruzada con microsporidios estrechamente relacionados, como *Enterospora canceri*, *Vitafforma* sp. y *Hepatospora eriocheir* (falsos positivos), lo que los hace inadecuadas para la detección exclusiva de *E. hepatopenaei*. En estos casos, el uso de cebadores que detectan el gen que codifica la proteína de la pared de las esporas y el gen de la beta-tubulina se considera de gran utilidad diagnóstica para la detección específica de esta especie (Jaroenlak *et al*., 2016; Jithendran *et al*., 2021; Peña-Navarro *et al*., 2023; Rajendran *et al*., 2016).

Se debe tener claro, además, que la técnica de PCR posee como sus principales fortalezas su alta sensibilidad y especificidad, por lo que constituye una herramienta poderosa de detección de patógenos, pero no distingue *per se* entre la presencia de un agente y su infección o patología. Un resultado positivo indica que la secuencia blanco de los cebadores se encuentra presente y seria una verdadero positivo. Pero también puede ser por contaminación de la muestra o selección de secuencias no específicas, lo cual no implica, necesariamente, que exista enfermedad (falso positivo) (Varela y Choc, 2020).

Con este enfoque, las técnicas moleculares constituyen, por tanto, una herramienta de detección y no de diagnóstico. Esta limitante puede solucionarse fácilmente combinándola con otras técnicas, de modo que el PCR, en sus diferentes modalidades, pasa a ser una herramienta ideal y necesaria para confirmar la identidad de agentes detectados por otros medios, como la histopatología o los análisis en fresco.

Consideraciones finales

Sin duda, la presencia de microsporidios en hepatopáncreas ha alcanzado un creciente interés durante los últimos años, se han descubierto nuevas especies, en diversas regiones geográficas. Los estudios de muchas de estas especies son limitados o ausentes, pero algunos de ellos se han relacionado con reducciones en la capacidad de crecimiento de los camarones y en incrementos en su susceptibilidad a infecciones secundarias. Esto representa una gran amenaza para los centros productivos, ya que su presencia puede generar incrementos sustanciales en los factores de conversión alimenticia y menores sobrevivencias, con la consecuente reducción directa de utilidades.

Se requiere establecer mecanismos de prevención, como el uso de post larvas certificadas como spf para este agente. Una vez que los animales se encuentran en los centros de producción, es necesario establecer programas de detección temprana y de monitoreo. Esto implica la necesidad de capacitar constantemente al personal sanitario de las granjas, instituciones académicas y personal oficial a cargo del monitoreo sanitario. Esto es especialmente importante si se considera la frecuencia con la que se han descubierto nuevas especies, lo que obliga al desarrollo, a la mejora y al entrenamiento en técnicas diagnósticas.

Las diferentes modalidades de detección, desde la observación clínica hasta el análisis en fresco, el uso de improntas, histopatología y PCR, podrían ser insuficientes para lograr un diagnóstico definitivo cuando se utilizan de forma individual. Por lo tanto, se recomienda ampliamente, la combinación de al menos dos técnicas para la obtención de resultados concluyentes.

Independientemente de la técnica utilizada, es importante considerar que todas las especies de microsporidios en hepatopáncreas, son potencialmente dañinos, afectando la capacidad de crecimiento de los camarones y su respuesta ante infecciones secundarias, por lo que es necesario conocerlo y monitorearlo. No es posible controlar lo que no conocemos.

Claramente, la prevención de esta o cualquier patología en camarones, es menos costosa y más eficaz que la corrección una vez que estas ingresan a los centros de producción. No obstante, en caso de estar presente y detectarse a tiempo, brinda la posibilidad de tomar acciones correctivas, como la decisión de cosechas tempranas en organismos que no presentarán la capacidad de crecimiento necesaria. Evitando incurrir en el incremento de costos de producción infructuoso.

La constante comunicación entre los centros de producción con instituciones de investigación, laboratorios diagnósticos especializados, comités de sanidad y autoridades competentes es crucial, facilitando el flujo de información verificada y la retroalimentación epidemiológica, así como la asistencia en medidas de control o atenuación de eventos infecciosos.

Agradecimiento

A la Dra. Katty Tang, por facilitar la figura 2b, utilizada en este trabajo.

Referencias

Aldama-Cano, D. J; Sanguanrut, P; Munkongwongsiri, N; Ibarra-Gamez, J. C; Itsathitphaisarn, O; Vanichviriyakit, R; Flegel, T. W; Sritunyalucksana, K; Thitamadee, S. (2018). Bioassay for spore polar tube extrusion of shrimp *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). Aquaculture Volume 490, 1 March 2018. pp 156-161. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.02.039

Aranguren, L. F; Han, J, E; Tang, K. F. J. (2017). *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei.* Aquaculture. Vol. 471. Pp 37-42. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.12.038

Arthur, J. R; Baldock, C. F; Bondad-Reantaso, M. G; Perera, R; Ponia, B; Rodgers, C. J. (2008). Pathogen risk analysis for biosecurity and the management of live aquatic animal movements. In Bondad-Reantaso, M, G; Mohan, C, V; Crumlish, M; Subasinghe, R, P. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

Bell, T. A; Lightner, D. V. (1988). A Handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society. Baton Rouge. USA.

Canning, E; Curry, A; Overstreet, R. (2002). Ultrastructure of *Tuzetia weidneri* sp. (Microsporidia: Tuzetiidae) in Skeletal Muscle of *Litopenaeus setiferus* and *Farfantepenaeus aztecus* (Crustacea: Decapoda) and new data on *Perezia nelsoni* (Microsporidia: Pereziidae) in L. setiferus. Acta Protozool. 41:63-77.

Chaijarasphong, T; Munkongwongsiri, N; Stentiford, G, D; Aldama-Cano, D. A; Thansa, K; Flegel, T. W; Sritunyalucksana, K; Itsathitphaisarn, O. (2020). The shrimp microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP): Biology, pathology, diagnostics and control. Journal of Invertebrate Pathology. DOI: 10.1016/j.jip.2020.107458

Cruz-Flores, R; Hung, Mai, H. N; Noble, B. L; Schofield, P. L; Dhar, A. K. (2019). Detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* using an invasive but non-lethal sampling method in shrimp (*Penaeus vannamei*). Journal of Microbiological Methods. Volume 162, July 2019, Pages 38-41. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.05.008

Cuéllar-Anjel, J. (2014). Parásitos en camarones. p. 197-224. En: Morales, V. y Cuéllar-Anjel, J. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.

de Blas, I; Muniesa, A. (2014). Vigilancia Epidemiológica en Camaronicultura. p. 309-328. En: Morales, V. y Cuéllar-

Anjel, J. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.

Ha, N. T; Ha, D. T; Thuy, N. T; Lien, V. T. K. (2010). Occurrence of microsporidia *Enterocytozoon hepatopenaei* in white feces disease of cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Vietnam. Aquatic Animal Health.

Howard, D. W; Lewis, E. J; Keller, B, J; Smith, C. S. (2004). Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS. 5: 218p.

Ibarra-Gámez, J. C; Rubio-García, M. F; Sánchez-Díaz, R; Casillas-Hernández, R; Martínez-Ibarra, D. M. (2023). Identification techniques to prevent the current emerging disease hepatopancreatic microsporidiosis in white shrimp *Penaeus vannamei*: an Overview. Latin American Journal of Aquatic Research, 51(1): 1-11, 2023. DOI: 10.3856/vol51-issue1-fulltext-2693

Jaroenlak, P; Sanguanrut, P; Williams, B. A. P; Stentiford, G. D; Flegel, T. W; Sritunyalucksana, K; Itsathitphaisarn, O. (2016). A Nested PCR Assay to Avoid False Positive Detection of the Microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in Environmental Samples in Shrimp Farms. PLoS ONE 11(11): e0166320. DOI: 10.1371/journal.pone.0166320

Jithendran K.P, Poornima M, Patil P.K, Otta S.K, Ezhil Praveena, P; Raja, A; Kumar, S; Bhuvaneswari, T; Rajendran, V; Kumar, T. S. (2021). Hands on Training on Diagnostics and Management of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in shrimp, Training Manual Series, No-23, 2021, 102 pp.

Johnson, S. K. (1995). Handbook of Shrimp Diseases; Sea Grant Publ. No. TAMU-SG-90-601, Texas A&M University. USA.

Lightner, D. V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Lousiana, USA.

Lightner, D. V; Pantoja, C. (2001). Manual para el Diagnóstico de Enfermedades del Camarón. United States Department of Agriculture-Programa de Reconstrucción Huracán Mitch. USDA/CSREES/USAID/UAZ).

López-Carvallo, J. A; Cruz-Flores, R; Dhar, A. K (2022). The emerging pathogen *Enterocytozoon hepatopenaei* drives a degenerative cyclic pattern in the hepatopancreas microbiome of the shrimp (*Penaeus vannamei*). Scientific Reports. 12:14766. DOI: 10.1038/s41598-022-19127-2

Morales-Covarrubias, M. S. (2013). Camarón Análisis en Fresco, herramienta de diagnóstico. 1era. edición. CIAD-OIRSA, p.p. 86

Munkongwongsiri, N; Aldama-Cano, D. J; Suebsing, R; Thaiue, D; Prasartset, T; Itsathitphaisarn, O; Sritunyalucksana, K. (2021). Microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) spores are inactivated in 1 min at 75 °C. Aquaculture 533-736178. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.736178

North, A. R; Godfray, H. C. (2017). The dynamics of disease in a metapopulation: The role of dispersal range. Journal of Theoretical Biology 418 (2017) 57–65

Nunan, L; Lightner, D. V; Pantoja, C; Gómez-Jiménez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. Dis Aquat Org. Vol. 111: 81-86, 2014.

OMSA. (2019). Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual de diagnóstico en animales acuáticos. 6 ed. Paris, Francia.

Pantoja, C; Lightner D. V. (2014). EMS/AHPND descripción de la enfermedad en Asia y América. P. 172-177. En: Morales, V. y Cuéllar-Ánjel (eds). 2014. Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones penaeidos. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382p.

Peña-Navarro, N; López-Carvallo, A; Chacón, B; Cruz-Flores, R. (2023). Application of PCR-based diagnostic tools that target *Enterocytozoon hepatopenaei* for the molecular detection of a *Vittaforma*-like microsporidium that infects *Penaeus vannamei* from Costa Rica. Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 200, (2023) 07958. DOI: 10.1016/j.jip.2023.107958

Piamsomboon, P; Han, J. E. (2022). White Feces Syndrome, A Multifactorial Syndrome of Cultured Shrimp: A Mini Review. Fishes, 7, 339. DOI:10.3390/f ishes7060339

Rajendran, K.V; Shivam, S; Praveena, P. E; Sahaya, J. J; Kumar, T. S; Avunje, S; Jagadeesan, V., Pradsad, S.V.A.N.V., Pande, A; Krishnan, A. N; Alavandi, S.V., Vijayan, K.K. (2016). Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* in India. Aquaculture. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.12.034

Shen, H; Fan, X; Qiao, Y; Jiang, G; Wan, X; Cheng, J; Li, H: Dou, Y; Li, H; Wang, L; Shi, W; Qin, Y; Shen, J. (2021). The links among *Enterocytozoon hepatopenaei* infection, growth retardation and intestinal microbiota in different sized shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture Reports. Volume 21, November 2021, 100888. DOI: 10.1016/j.aqrep.2021.100888

Stentiford, G. D; Feist, S. W; Stone, D. M; Bateman, K. S; Dunn, A. M. (2013). Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems. Trends in Parasitology, 29(11), 567–578. DOI: 10.1016/j.pt.2013.08.005

Tang, K. F. J; Aranguren, L. F; Piamsomboon, P; Han, J. E; Maskaykina, I. Y; Schmidt, M. M. (2017). Detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and Taura syndrome virus in *Penaeus vannamei* cultured in Venezuela, Aquaculture. DOI: 10.1016/ j.aquaculture.2017.07.043

Tangprasittipap, A; Srisala, J; Chouwdee, S; Somboon, M; Chuchird, N; Limsuwan, C; Srisuvan, T; Sritunyalucksana, T; Flegel, T. W; Sritunyalucksana, K. (2013) The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*). BMC Veterinary Research, 9, 139.

Tourtip, S; Wongtripop, S; Stentiford, G, D; Bateman, K. S; Sriurairatana, S; Chavadej, J; Sritunyalucksana, K; Withyachumnarnkul, B. (2009). *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. Journal of Invertebrate Pathology 102 (2009) 21–29

Varela, A. (2018). Patologías del hepatopáncreas en camarones marinos cultivados en América y su diagnóstico diferencial mediante histopatología. Revista AquaTIC, 50: 13-30.

Varela, A. (2023). Diagnóstico sanitario en camarones marinos mediante el uso de técnicas histopatológicas. Revista Ciencia Pesquera (2023) 31 (2): 65 – 75

Varela, A; Choc-Martínez, L. (2020). Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones; Usos, alcances y limitaciones. Rev. Inv. Vet. Perú 31(3): e18165. DOI: 10.15381/rivep.v31i3.18165.

Varela, A; Peña, N. (2017). Transfronterización de enfermedades infecciosas en la camaronicultura. Una revisión. Repertorio Científico. Vol. 20, N.º 1: Junio, 2017: 1-11