

Doi:10.20062/j.cnki.CN 37-1453/N.2025.01.004

凡纳滨对虾不同组织对 EHP 的感染差异研究

常林瑞,张兆新,何传瑜,曹政,司凌郡,闫冬春

(鲁东大学 水产学院,山东 烟台 264039)

摘要:近年来,虾肝肠胞虫在我国对虾养殖区具有较高的流行风险,已成为影响对虾养殖业健康发展的主要病原。为了解 EHP 的早期感染机制,本研究利用常规 PCR 和 qPCR 技术,对投喂攻毒 10 天的凡纳滨对虾 5 种组织进行 EHP 检测。结果显示:不同组织中 EHP 阳性率由高到低为(中肠与游泳足相同)、鳃、肝胰腺、肌肉,分别为 70%、70%、60%、30%、10%;不同组织中 EHP 载量高低顺序为中肠、游泳足、鳃、肝胰腺、肌肉。这一结果表明,凡纳滨对虾在感染 EHP 早期阶段,多个组织可被感染,中肠是对 EHP 最为敏感的组织。

关键词:凡纳滨对虾;虾肝肠胞虫;不同组织;早期感染

中图分类号:S945.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-8020(2025)01-0025-06

虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)属微孢子虫门(Microspora)、微孢子虫科(Microsporidia)、肠胞虫属(*Enterocytozoon*)^[1],主要养殖虾类如斑节对虾(*Penaeus monodon*)、细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)、凡纳滨对虾(*L. vannamei*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)等都是其主要的感染对象^[2-5]。我国在 2013 年首次报道 EHP,之后在浙江、天津、江苏、山东等沿海省市的土塘和室内养殖基地均有 EHP 感染出现,并且感染率呈逐年上升趋势^[6-10]。EHP 是一种专营细胞内寄生的寄生虫,主要寄生在对虾肝小管上皮细胞的细胞质和肝小管的管腔中^[11]。感染早期,养殖虾通常没有明显的病理特征,但随着养殖周期的延长,感染 EHP 的对虾生长速度大幅降低,甚至停止生长,造成养殖个体大小出现明显差异;感染后期,出现肝小管上皮细胞脱落、细胞坏死和肝小管萎缩等肝胰腺坏死现象,使感染对虾更易受其它病原(如细菌或病毒)的感染而大量死亡^[12]。由于一般药物难以透过由几丁质和蛋白质构成的厚厚胞壁^[1],因此目前暂无有效的 EHP 防控药物,这也导致对虾的养殖风险日趋严重。EHP 引发的肝胰微孢子虫病(HPM)已经严重危害我国对虾的育苗及养殖产业,造成很大的经济损失,因此有学者建议将该病列入我国动

物疫病病种名录并制定相关的检测标准^[13]。

常规 PCR 检测显示 EHP 可感染凡纳滨对虾的肝胰腺、鳃、血淋巴、肠、心脏、肌肉等组织^[11,14];原位杂交和 TaqMan 实时荧光定量 PCR 结果表明,感染 EHP 的对虾多个组织均有杂交信号并且载量具有差异^[14-16]。但在 EHP 感染凡纳滨对虾的初期阶段,对虾不同组织感染情况的差异少有报道。本研究通过人工投喂的方式,对一批健康的凡纳滨对虾进行室内攻毒,采用常规 PCR 和荧光定量 PCR 方法对 EHP 的感染情况进行检测分析,以期探明在感染初期阶段,对虾不同组织对 EHP 敏感性的差异及 EHP 载量的不同,为对虾感染 EHP 的早期检测和有效预防进一步提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 样品来源

试验所用的健康凡纳滨对虾(平均长度 8.58±0.2 cm,平均质量 5.865±0.2 g)购自山东省东营市垦利区森森养殖场。每批随机取 18 只,用常规 PCR 方法进行常见对虾病原 EHP、IHHNV(传染性皮下及造血组织坏死病毒)和 WSSV(白斑综合

收稿日期:2024-08-03;修回日期:2024-10-30

基金项目:山东省自然科学基金面上项目(ZR2024MC115)

通信作者简介:闫冬春(1971—),女,教授,硕士研究生导师,博士,研究方向为水产动物病害研究。E-mail:yandongchun@ldu.edu.cn

症病毒)的检测。当检测结果均为阴性时,选取体色正常、规格均一的健康稚虾进行暂养,用于攻毒试验。

1.2 虾料的制备

试验所需病料虾采自滨州市北海新区,经检测只感染 EHP 的凡纳滨对虾稚虾,所需健康虾料采集自东营市垦利区经检测未感染 EHP、IHHNV 和 WSSV 的凡纳滨对虾成虾。分别取两类虾的头部和肌肉组织(去除头胸甲),剪碎并研磨混匀后,分装到 EP 管中,每只 EP 管添加一个养殖缸内实验虾体总重约 5% 的虾料,储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中备用。攻毒病料经 qPCR 检测, EHP 载量为 $10^5\text{ copies}\cdot\mu\text{L}^{-1}\text{ DNA}$ 。

1.3 试验设计

本研究设攻毒、阴性对照、空白对照 3 个组,每组 10 只对虾,养殖缸规格为 $50\text{ cm}\times 38\text{ cm}\times 40\text{ cm}$ 。每天早晚定时投喂,其中,第 1~3 天,空白对照组投喂颗粒直径 0.8 mm 的通威对虾配合饲料,阴性对照组投喂健康虾组织,攻毒组投喂感染 EHP 的虾组织,第 4~10 天所有实验组均投喂配合饲料。海水经过滤、沉淀后使用,盐度约为 $23\text{‰}\sim 25\text{‰}$,水温 $25\sim 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。24 h 充氧,每天吸污两次,每两天更换约 $1/3$ 的海水。

1.4 DNA 的提取及 PCR 扩增体系

在攻毒后第 10 天,用 DNA 试剂盒(DP324, TIANGEN)分别提取各组对虾肝胰腺、鳃、中肠、肌肉、游泳足的总 DNA,做好标记,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

常规 PCR 采用本实验室建立的方法^[10]。引物序列为 EHP 358 F: $5'\text{-ATT AGA CAC TGT AGT AGT TC-3'}$ 和 EHP 358 R: $5'\text{-GTT ATT GCC TTC TCC CTC-3'}$, 扩增子大小为 358 bp 。扩增体系 $25\text{ }\mu\text{L}$, 包含 $12.5\text{ }\mu\text{L}$ $2\times\text{PCR Mix}$ (TaKaRa, 大连)、引物 358 F/R ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, 无菌双蒸水 $9.5\text{ }\mu\text{L}$ 和 $2\text{ }\mu\text{L}$ DNA 模板。反应程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 、 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s 、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s 、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s , 共 35 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增序列,用紫外凝胶成像系统观察结果并拍照。

荧光定量 PCR 参考 Liu 等^[17] 建立的荧光定

量 PCR 方法。引物序列为 EHP 157F: $5'\text{-AGT AAA CTA TGC CGA CAA-3'}$ 和 EHP 157R: $5'\text{-AAT TAA GCA GCA CAA TCC-3'}$, 扩增子大小为 157 bp 。扩增体系 $25\text{ }\mu\text{L}$, 包含 $12.5\text{ }\mu\text{L}$ $2\times\text{SYBR Green Premix Taq}$ (TaKaRa, 大连)、引物 157 F/R ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, 无菌双蒸水 $9.5\text{ }\mu\text{L}$ 和 DNA 模板 $2\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s 、 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s 、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , 共 35 个循环,采用 Bio-Rad-CFX 管理器进行扩增检测 and 数据分析。

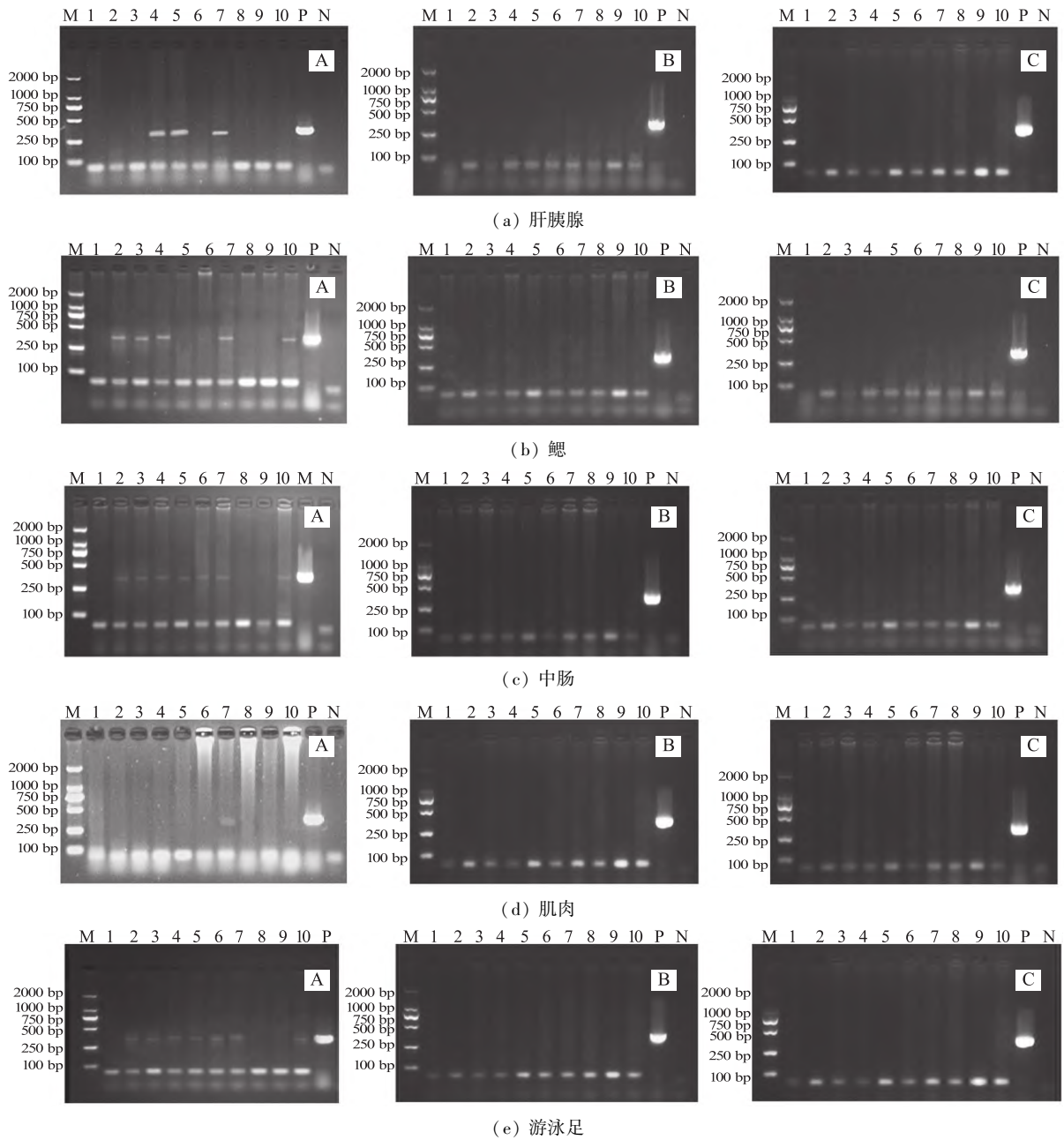
2 结果

2.1 凡纳滨对虾生长状况

在整个试验期间,各组养殖对虾摄食正常,没有出现白便及异常死亡现象。由于攻毒时间仅为 10 d,攻毒组与对照组对虾体重和体长没有明显差异,与试验前相比也没有明显变化。

2.2 常规 PCR 检测 EHP

在攻毒试验的第 10 天,阴性对照组、空白对照组对虾经常规 PCR 检测均无特异性条带出现,说明这两种对照组对虾均无 EHP 感染(图 1(b), (c))。攻毒组对虾的五种组织常规 PCR 检测结果如图 1 所示, EHP 阳性结果在 358 bp 处出现明显的扩增条带。攻毒组 10 只对虾中,中肠(图 1(c) A)和游泳足(图 1(e) A)中 EHP 的阳性率最高,为 70%,对应 2、3、4、5、6、7、10 号对虾个体;其次为鳃组织(图 1(b) A),有 6 只呈 EHP 阳性,分别为 2、3、4、6、7、10 号个体,阳性率为 60%;肝胰腺(图 1(a) A)中有 3 只呈 EHP 阳性,分别为 4、5、7 号个体,阳性率为 30%;肌肉(图 1(d) A)中仅有 1 只呈阳性,为 7 号个体,阳性率为 10%。常规 PCR 检测 EHP 阳性率高低顺序为中肠与游泳足相同、鳃、肝胰腺、肌肉,中肠、游泳足和鳃的阳性率检测具有一致性。在攻毒第 10 天,有 1 只对虾(7 号个体)的五种组织同时检测出 EHP 阳性,有 3 只对虾(4、5、7 号个体)的肝胰腺、中肠、游泳足 3 种组织同时检测出 EHP 阳性。由此可见,在 EHP 初期感染阶段,对虾的多个组织器官都可成为孢子侵染的目标,使感染个体成为 EHP 的携带者。



注:A 代表攻毒组对虾;B 代表阴性对照组对虾;C 代表空白对照组对虾;M 代表 DL 2000 DNA Marker;1~10 代表 1~10 号对虾样品;P 代表阳性对照;N 代表阴性对照(无菌双蒸水)。

图 1 对虾 5 种组织 DNA 常规 PCR 检测结果
Fig.1 Ordinary PCR detection results of five tissues in experimental shrimp

2.3 攻毒组荧光定量 PCR 检测结果

本研究设计的 EHP 157 特异性引物,经普通 PCR 扩增、胶回收、测序验证、目的产物的克隆、提取质粒等流程,制备重组质粒 DNA。经核酸分析检测仪(DeNovix, Wilmington, DE, USA)测得 DNA 质粒浓度为 $96.628 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,经换算为 $5.5 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。将质粒标准品进行梯度稀释,

得到 $5.5 \sim 5.5 \times 10^7 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 8 个梯度的标准品,建立标准品浓度与对应 Cq 值的标准曲线。然后对保存的攻毒对虾各组织样品进行 qPCR 定量检测。

攻毒组 10 只对虾不同组织器官的 EHP 平均感染载量如图 2 所示,5 种不同的组织器官,EHP 载量也不同,从高到低依次为中肠、游泳足、鳃、肝胰腺、肌肉。在已感染的样品中,EHP 平均载量

最高的组织出现在第 7 只虾的中肠组织,达到 $132.5 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1} \text{ DNA}$, 这表明在 EHP 感染早

期,对虾的不同组织器官之间 EHP 的载量不同,且差异较为明显。

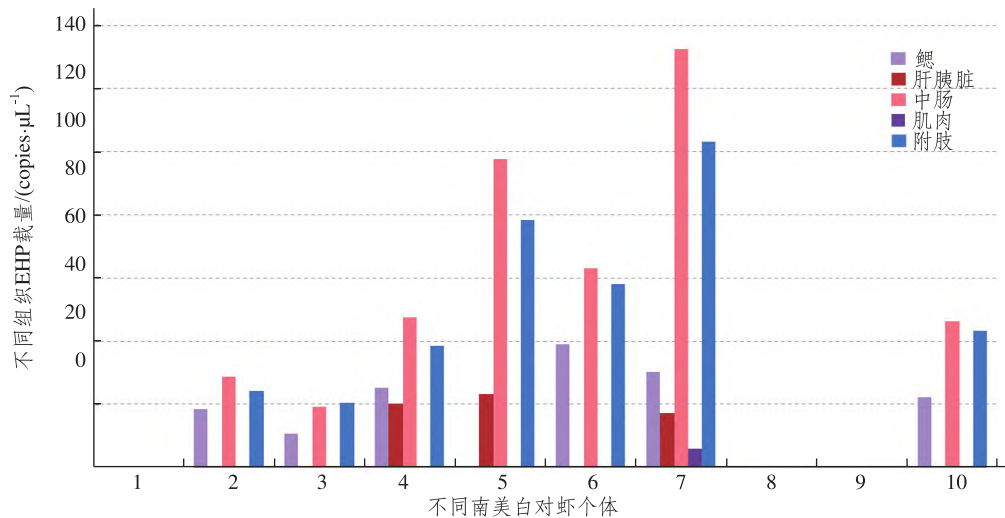


图 2 攻毒组实时荧光定量 PCR 检测结果

Fig.2 Real-time quantitative PCR detection results of different tissues in the challenged shrimp

3 讨论

3.1 不同组织 EHP 载量

肝胰腺是对虾消化吸收、营养储备和免疫的重要器官,是公认的 EHP 主要攻击目标,感染对虾的肝小管细胞中可见不同发育时期的 EHP^[18]。近年来利用 PCR 技术在除肝胰腺以外的其它组织,如鳃、血淋巴、肠、心脏、肌肉等组织均检测到 EHP 阳性^[11,15,19]。但这些研究只利用普通 PCR 定性检测出感染对虾不同组织的 EHP 阳性,均未定量检测不同组织 EHP 载量的差异。仅见程东远等^[16]通过 qPCR 获得了 EHP 在凡纳滨对虾日照群体不同组织的载量差异,肝胰腺载量最高,其次为中肠、血淋巴、鳃、肌肉。在本研究的检测中,EHP 的载量高低顺序为中肠、游泳足、鳃、肝胰腺、肌肉。出现这样的差异可能是由于前者的检测对象为日照养殖 80 天的自然感染个体,感染时间可能较长;本研究中的对虾为投喂攻毒感染 10 d 的对虾,属于 EHP 感染的早期阶段。由于所检测对虾的生长阶段及被感染时间不一样,所以导致 EHP 的载量高低顺序不同。在本研究中,中肠 EHP 载量较高,中肠的 EHP 阳性率也比较高。这种现象说明在经口投喂攻毒时,EHP 最先感染的部位有可能是肠壁组织。另外,本实验

室研究还发现,感染 EHP 的对虾肠道显微结构受损,并且一些肠道关键免疫基因的表达显著增强(结果待发表)。由于中肠是对虾的主要消化吸收器官,一旦中肠受损将严重影响对虾的生长发育。游泳足和鳃的 EHP 载量也高于肝胰腺,这是由于二者均是与水环境直接相接触的,在投喂过程中扩散于水中的 EHP 孢子可能会首选附着于其上,然后再感染相应的组织。在本研究中,感染 10 d 的对虾肝胰腺 EHP 载量较低,并且取肝胰腺进行检测需将对虾处死,因此对于一些昂贵的进口对虾亲本,最好采取对对虾损伤性较小的组织如附肢来代替肝胰腺。

3.2 攻毒方法与不同组织 EHP 阳性的出现时间

目前实验室设计的攻毒方法主要有与感染对虾共养、浸浴感染对虾的组织液、投喂感染对虾组织、反向灌胃、肌肉注射等^[20]。不同实验室设计的攻毒方法不同,对虾不同组织常规 PCR 检测 EHP 阳性条带出现的时间及信号的强弱也不同。Karthikeyan 等^[21]将健康仔虾(PL-9)浸浴入浓度为 0.2% 的感染 EHP 对虾组织匀浆的水缸中 48 h,在攻毒后第 120 天,多个组织器官,包括肝胰腺、心脏、肌肉、肠、神经、附肢、眼柄等,均可检测到 EHP 阳性。Santhoshkumar 等^[11]将 10~12 g 的凡纳滨对虾禁食 1 d,第二天投喂 3 次病虾肝胰腺,第三天开始投喂正常饲料。在攻毒后第 5 天在对虾肝

胰腺中即可检测出强的阳性信号,在肠和心脏中检测出较强的阳性信号,鳃在第 10 天出现阳性信号,肌肉直到第 30 天才出现微弱的阳性条带。Tangprasittipap 等^[22]连续 7 d 对 6~8 g 的凡纳滨对虾每天投喂 1 次病虾肝胰脏,在攻毒后的第 2 天,利用 PCR 方法即可检测出肝胰腺中微弱的阳性信号。在本研究设计的投喂 EHP 感染对虾组织中,在攻毒试验的第 10 天,5 种组织可检测到 EHP 阳性信号,阳性率高低顺序为(中肠与游泳足相等)、鳃、肝胰腺、肌肉。可见不同的攻毒方式,均可导致对虾不同组织的感染,但不同组织的易感性不同。

3.3 病料保存方法与攻毒效果

EHP 阳性条带出现的早晚可能也与攻毒病料孢子的质量有关,病料中孢子的活力影响 EHP 在目标组织中的繁殖速度。Mai 等^[20]的研究表明,用冷冻(-80 ℃和-20 ℃)的孢子提取物或感染 EHP 的对虾肝胰腺进行攻毒时,均无法使 SPF 对虾感染 EHP。因此认为冷冻可导致孢子丧失活力,无法启动感染。而宁梓健^[18]的研究结果表明,-80 ℃保存不会使 EHP 孢子失活,用保存于-80 ℃的感染 EHP 的对虾肝胰腺投喂健康对虾,仍可以使健康对虾感染 EHP,可以在肝胰腺细胞中观察到不同发育期的 EHP。本研究所用的 EHP 对虾病料也是保存在-80 ℃条件下,实验结果证明-80 ℃可以保存孢子的活力。不少研究证实了-20 ℃冻存可以使虾肝肠胞虫侵染性降低或丧失^[23-24],因此在投喂饲料、活体饵料前,为了避免 EHP 的感染,最好将它们贮存于-20 ℃环境。在实验室内设计攻毒试验时最好使用新鲜的病料,或将感染组织保存于-80 ℃条件下。

4 结论

本研究利用常规 PCR 和 qPCR,证实了在早期感染阶段,EHP 可以随机侵染对虾的多种组织器官,相对其他组织,中肠对 EHP 更为敏感,EHP 载量也最高。可见在攻毒的第 10 天,健康对虾即可成为 EHP 携带者,从而引起 EHP 孢子在养殖水体中的扩散,这为 EHP 的早期预防提供一定的理论参考。

参考文献:

- [1] TOURTIP S, WONGTRIPOP S, STENTIFORD G D, et al. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (decapoda: Penaeidae): fine structure and phylogenetic relationships [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 102(1): 21-29.
- [2] CHAYABURAKUL K, NASH G, PRATANPIPAT P, et al. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(2): 89-96.
- [3] TANG K F J, PANTOJA C R, REDMAN R M, et al. Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 130: 37-41.
- [4] THITAMADEE S, PRACHUMWAT A, SRISALA J, et al. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia [J]. *Aquaculture*, 2016, 452: 69-87.
- [5] 胡吉卉. 三种植物提取物抑制虾肝肠胞虫感染的研究 [D]. 连云港: 江苏海洋大学, 2022: 9-20.
- [6] 刘宝彬, 杨冰, 吕秀旺, 等. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHHNV) 及虾肝肠胞虫 (EHP) 的荧光定量 PCR 检测 [C] // 中国水产学会学术年会论文摘要集, 2015: 4.
- [7] 施慧, 许文军, 谢建军, 等. 舟山地区大棚凡纳滨对虾生长缓慢病因的调查分析 [J]. *中国水产科学*, 2017, 24(2): 387-394.
- [8] 许杰, 霍文慧, 邓威, 等. 2015—2017 年天津市虾肝肠胞虫流行情况调查 [J]. *中国动物检疫*, 2018, 35(8): 13-16.
- [9] SHEN H, QIAO Y, WAN X H, et al. Prevalence of shrimp microsporidian parasite *Enterocytozoon hepatopenaei* in Jiangsu Province, China [J]. *Aquaculture International*, 2019, 27(2): 675-683.
- [10] HOU Z H, YU J Y, WANG J J, et al. Development of a PCR assay for the effective detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and investigation of EHP prevalence in Shandong Province, China [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2021, 184(5): 107653.
- [11] SANTHOSHKUMAR S, SIVAKUMAR S, VIMAL S, et al. Biochemical changes and tissue distribution of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in naturally and experimentally EHP-infected whiteleg shrimp,

- Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), in India [J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(4): 529–539.
- [12] CHAIJARASPHONG T, MUNKONGWONGSIRI N, STENTIFORD G D, et al. The shrimp microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP): biology, pathology, diagnostics and control [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2021, 186: 107458.
- [13] 谢艳辉, 李家侨, 斯泽恩, 等. 湛江地区凡纳滨对虾肝肠胞虫检出实例分析[J]. 水产养殖, 2021, 9: 1–5.
- [14] HAN J E, TANG K F J, PANTOJA C R, et al. Detection of a new microsporidium *Perezia* sp. in shrimps *Penaeus monodon* and *P. indicus* by histopathology, in situ-hybridization and PCR [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2016, 120(2): 165–171.
- [15] 骆云慧, 石坚, 方磊, 等. 虾肝肠胞虫 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(7): 847–852.
- [16] 程东远, 邱亮, 宋增磊, 等. 凡纳滨对虾感染虾肝肠胞虫的群体及组织间差异性分析[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 83–92.
- [17] LIU Y M, QIU L, SHENG A Z, et al. Quantitative detection method of *Enterocytozoon hepatopenaei* using Taq Man probe real-time PCR [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2018, 151: 191–196.
- [18] 宁梓健. 虾肝肠胞虫生活史及孢壁蛋白 EhSWP7 的多克隆抗体制备研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020: 13–22.
- [19] SALACHAN P V, JAROENLAK P, THITAMADEE S, et al. Laboratory cohabitation challenge model for shrimp hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) [J]. BMC Veterinary Research, 2016, 13(1): 1–7.
- [20] MAI H N, CRUZ-FLORES R, CARO L F A, et al. A comparative study of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) challenge methods in *Penaeus vannamei* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2020, 171: 107336.
- [21] KARTHIKEYAN K, SUDHAKARAN R. Experimental horizontal transmission of *Enterocytozoon hepatopenaei* in post-larvae of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fish Diseases, 2019, 42(3): 397–404.
- [22] TANGPRASITIPAP A, SRISALA J, CHOUWDEE S, et al. The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [J]. BMC Veterinary Research, 2013, 9(1): 139.
- [23] ALDAMA-CANO D J, SANGUANRUT P, MUNKONGWONGSIRI N, et al. Bioassay for spore polar tube extrusion of shrimp *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) [J]. Aquaculture, 2018, 490: 156–161.
- [24] 丁慧昕, 施慧, 谢建军, 等. 虾肝肠胞虫 (EHP) 在凡纳滨对虾养殖水环境中的分布情况及传播途径初步研究 [J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2018, 37(1): 14–19.

The Infection Differences of EHP in Different Tissues of *Litopenaeus vannamei*

CHANG Linrui, ZHANG Zhaoxin, HE Chuanyu, CAO Zheng, SI Lingjun, YAN Dongchun

(School of Fisheries, Ludong University, Yantai 264039, China)

Abstract: In recent years, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) has a high epidemic risk in shrimp farming areas in China, and has become the main pathogen affecting the healthy development of shrimp aquaculture. To understand the early infection mechanism of EHP, this study employed conventional PCR and qPCR techniques to assess EHP in five tissues from *Litopenaeus vannamei*, which were orally challenged for 10 days. The results showed that the positive rates of EHP in different tissues from high to low were the same in midgut and swimming leg, gill, hepatopancreas and muscle, with rates of 70%, 70%, 60%, 30%, and 10%, respectively; The EHP load was highest in the midgut, followed by the swimming leg, gill, hepatopancreas, and then muscle. This result indicates that in the early stages of EHP infection in juvenile shrimp, multiple tissues can be infected, with the midgut being the most sensitive tissue.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP); different tissues; early infection