

Investigación de la Presencia de Secuencias del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) en el Genoma del Camarón *Penaeus vannamei*

Carlos Sampedro Cruz ⁽¹⁾, Javier Robalino Iturralde ⁽¹⁾
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar ⁽¹⁾
Escuela Superior Politécnica del Litoral ⁽¹⁾

Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral, Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador ⁽¹⁾
csampedr@espol.edu.ec

Resumen

*El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) ha sido asociado con deformidades y crecimiento retardado en *Penaeus vannamei* y otros camarones Peneidos. Sin embargo, en muchas instancias este virus parece co-existir con su huésped, alcanzando prevalencias cercanas al 100% en poblaciones de portadores aparentemente asintomáticos. La alta prevalencias del virus en ausencia de enfermedad podría indicar un estado de latencia, acompañado de integración de secuencias genéticas virales en el huésped.. El presente trabajo se planteó como objetivo determinar la presencia de secuencias genéticas del IHHNV integradas en el genoma de *P. vannamei* utilizando la técnica de Southern blot. Los resultados de esta investigación no revelaron evidencia de integración del IHHNV en la población de *P. vannamei* analizada, a pesar de observar una elevada prevalencia del virus en la población. Estos resultados favorecerían la hipótesis de IHHNV infeccioso como fuente de las altas prevalencias observadas en poblaciones domesticadas en Ecuador, aunque la posibilidad de integración del IHHNV en esta u otras poblaciones de cultivo no puede aun ser descartada en base a estos estudios.*

Palabras claves: IHHNV, camarones *Peneidos*, infección latente, Southern blot.

Abstract

*Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) has been associated with deformities and growth retardation in *Penaeus vannamei* and other Penaeid shrimp. However, in many instances, this virus seems to co-exist with its host, with up to 100% of the members of a population being asymptomatic carriers. High prevalence of virus in the absence of disease may indicate the existence of a state of latency, and the integration of viral sequences in the host could provide a mechanism for IHHNV to establish such latency. The present study was conducted to determine the presence of IHHNV sequences integrated into the genome of *P.vannamei*, using Southern blot for the analysis of genomic DNA samples from adult shrimps. The results of this investigation showed no evidence of integration of IHHNV in the population of *P.vannamei* analyzed, despite observing a high prevalence of virus in the population. These results favor the hypothesis of infectious IHHNV as a source of the high viral prevalence observed in domesticated populations in Ecuador, although the possibility of integration of IHHNV in this and other populations cannot be ruled out on the bases of these studies alone.*

1. Introducción

El virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) es un patógeno prevalente en el cultivo de camarón blanco *Penaeus vannamei* [1]. La presencia del IHHNV ha sido asociada con el Síndrome del Rostrum Deforme (RDS, siglas en inglés), denominado así por las deformidades físicas aparentes en animales infectados [2]. La enfermedad tiene, además de las deformaciones del rostrum, efectos adversos en el crecimiento (*i.e.*, enanismo), lo cual perjudica la comercialización del camarón cultivado [2].

A nivel de diagnóstico, uno de los principales métodos utilizados para detectar IHHNV es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés). Este método, de alta especificidad y sensibilidad, es aceptado en la mayoría de los laboratorios donde se cultiva camarón con el objetivo principal de obtener animales libres de IHHNV [3].

La presencia de IHHNV en el huésped no está necesariamente ligada al desarrollo del RDS. En efecto, hay casos documentados de presencia de IHHNV en animales aparentemente asintomáticos [4, 5]. Esto sugiere que el virus ha adoptado formas alternativas de infección, caracterizadas por la aparente ausencia de sintomatología [6]. Infecciones asintomáticas son comunes en muchos tipos de virus, y pueden estar asociadas con estados de latencia que muchas veces van acompañados de secuencias virales en el genoma del huésped [7, 8]. En el caso del IHHNV, hay estudios cuyos resultados son consistentes con la hipótesis de integración. De hecho, estudios realizados en *P. monodon* determinaron la presencia de secuencias relacionadas al IHHNV integradas en el genoma de esta especie [6]. En el presente trabajo, se intentó demostrar la existencia de secuencias genéticas relacionadas con el IHHNV en el genoma del camarón *P. vannamei*. La posible existencia de eventos de integración del IHHNV en portadores asintomáticos de *P. vannamei* tiene importantes implicaciones para el desarrollo de estrategias de control de RDS. Este conocimiento se vuelve esencial para poder diseñar métodos de diagnóstico más informativos (*i.e.*, que distingan el ADN viral integrado del no integrado), que permitan comprender y controlar la transmisión del virus en poblaciones de cultivo.

2. Materiales y métodos

2.1 Extracción de ADN

Los camarones *P. vannamei* fueron obtenidos del área de maduración de un laboratorio de larvas de producción comercial (BIOGEMAR S.A). Los reproductores seleccionados, aparentemente saludables, tuvieron un peso promedio de 30 g. Varios protocolos fueron evaluados con el fin de determinar

un procedimiento adecuado para la obtención de ADN en suficiente cantidad y calidad para pruebas de Southern blot (ver Sección 3).

Se utilizó espectrofotometría para evaluar la cantidad de ADN obtenida con cada protocolo y se utilizó el cociente entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm como indicador de la pureza del ADN [9]. El ADN obtenido se analizó con electroforesis en geles de agarosa, para determinar la presencia de ADN de alto peso molecular y ausencia de productos de degradación.

Los protocolos de extracción de ADN ensayados se describen a continuación:

Extracción con CTAB

(hexadecyltrimethylammonium bromide):

En un microtubo estéril de 1.5 ml se adicionó 500 µl de buffer CTAB (20mM EDTA, 100mM TRIS-HCl pH 8.0, 1.4M NaCl, 2% (Masa/Volumen) CTAB, 0,2% (Volumen/Volumen) 2-mercaptoetanol y 20 µl de proteinasa K (20 µg/µl)). Luego se colocó aproximadamente 50 mg de tejido animal finamente fraccionado. La extracción se realizó a 55 °C por 4 horas o más, dependiendo de la disolución del tejido. El extracto se clarificó por centrifugación a 14.000 RPM por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se pasó a un nuevo microtubo y se recuperaron los ácidos nucleicos con extracción orgánica (fenol y cloroformo) utilizando métodos estándar.

Extracción con Isothiocianato de Guanidina

El protocolo es esencialmente el mismo descrito para CTAB, pero utilizando como solución de lisado y homogenización el isothiocianato de Guanidina (4M Tiocianato de guanidina, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5).

Extracción con Pure Link™ kit (Invitrogen)

Se siguió el protocolo del fabricante, con leves modificaciones: Aproximadamente 50 mg de tejido finamente fraccionado se utilizó para su extracción con una mezcla de 180 µl Buffer PureLink™ Genomic Digestion y 20 µl de Proteínasa K (incluido en el Kit) en el tubo. El extracto se incubó a 55 °C durante la noche con agitaciones intermitentes. El extracto se clarificó por centrifugación a 14.000 RPM por 3 min a temperatura ambiente y luego se procedió según el fabricante.

Extracción con Easy DNA™ kit (Invitrogen)

Se siguió el protocolo según el fabricante.

Se ensayaron los protocolos descritos anteriormente en diferentes tejidos obtenidos de reproductores: hepatopáncreas, epitelio, músculo, branquias y hemolinfa. Finalmente se seleccionó el protocolo del kit Easy DNA™ para la extracción de ADN a partir de hemocitos (ver Sección 3). El protocolo final utilizado para obtener muestras para pruebas de Southern blot fue el siguiente: En una jeringuilla de 1 ml conteniendo 300 µl de C₆H₅Na₃O₇ al 10% (anticoagulante) se obtuvo, del seno ventral del reproductor, 700 µl de hemolinfa para luego ser depositada en un tubo estéril de 2 ml. Las muestras se centrifugaron a 800 rcf por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y el pellet

celular se resuspendió en 200 µl de TBS. A continuación se prosiguió con el protocolo del kit.

2.2 Electroforesis

Se utilizó agarosa ultrapura (Invitrogen) al 1.2% para observar el producto de PCR diagnóstico del IHNV en los reproductores muestreados, y para analizar las sondas amplificadas. Se utilizó agarosa al 0.8% para observar la presencia y calidad del ADN genómico extraído de camarones, y agarosa al 1% para la migración de ADN digerido con enzimas de restricción para las pruebas de Southern blot. El gel se preparó en solución TAE 1X (40 mM de Tris Acetato y 1 mM de EDTA) con bromuro de etidio. El ADN fue migrado a 90 voltios por una hora, excepto las muestras de ADN digerido con enzimas de restricción, las cuales se migraron a 60 voltios por 7 horas. Luego de cada electroforesis los geles se visualizaron en un transiluminador UV.

2.3 Diagnóstico del IHNV mediante PCR

Las muestras de ADN fueron analizadas, para determinar la presencia del IHNV, mediante PCR utilizando iniciadores 5'-AATTCGACGCTGCCAATGAT -3' y 5'-GCCAATGTTACGTCGGCTTC-3', con un producto esperado de 346 pb. La reacción se realizó en 20 µl con la siguiente composición: 2 µl de Buffer 10X (200mM de Tris-Cl pH 8.4, 500 mM de KCl), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 µM de cada iniciador, 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen), 13.8 µl de agua ultrapura y 1 µl de ADN molde.

El programa de amplificación fue el siguiente: 1 ciclo a 95°C por 3 min, para la desnaturalización inicial; 40 ciclos de un paso de desnaturalización a 95°C por 30 segundos seguidos de un paso de hibridación a 58°C por 30 segundos y un paso de extensión a 72°C por 1 minuto y finalmente 1 ciclo de 72°C por 3 minutos.

2.4 Preparación de sondas nucleicas

Se hicieron por PCR, amplificando tres segmentos diferentes del genoma viral utilizando muestras de animales infectados con IHNV. Los tres segmentos se denominaron Sonda 1, Sonda 2 y Sonda 3 sintetizadas con sus respectivos iniciadores (ver tabla I).

Tabla I. Nombre y secuencia de los iniciadores usados para amplificar las sondas.

Nombre de la Sonda	Nombre del Iniciador	Secuencia del Iniciador (5'-3')
Sonda 1	IHNV-NSFW-13	gaattaaaccctactaaaggagacagtgtctacactgtctacc
	IHNV-NSREV-Xho	gtctgagagggaatcgtatgtctactg
Sonda 2	1FW-1820-IHNV	ccaacacatacagaagagaaga
	4REV-2780-IHNV	tggatcttttctggggctg
Sonda 3	3FW-2501-IHNV	agagtcagaaattatgggaag
	IHNV-6	gccaatgittaogtggcttc

Los productos obtenidos se purificaron de un gel de agarosa con el kit QIAquick (Qiagen) y enviados a secuenciar por un proveedor comercial (Macrogen, Corea del Sur).

El método para marcar sondas con digoxigenina fue mediante PCR convencional en un volumen final de 20 µl por cada sonda. La reacción contenía Buffer 1X (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl₂, dNTPs (3 mM de dATP, dCTP, dGTP, 2 mM de dTTP y 1 mM de DIG - 11- dUTP marca Roche), 0.5 µM de cada iniciador, 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen), 1 µl del producto pre-amplificado y secuenciado. El marcaje se confirmó comparando la migración en un gel de agarosa al 1.2%, entre productos de amplificación con y sin digoxigenina.

2.5 Southern blot

Para digerir el ADN genómico se usaron las enzimas de restricción Eco RI y Pvu II (Promega). Las reacciones de restricción se realizaron individualmente en un volumen final de 400 µl, con 300 U de enzima y 30 µg de ADN. Las reacciones se incubaron a 37° C toda la noche. Los fragmentos, producto de las enzimas de restricción, se precipitaron con etanol, y el pellet obtenido se resuspendió en 20 µl de agua ultrapura.

Los productos de restricción se resolvieron en un gel de agarosa al 1%, a 60 V por 7 h. Para transferir, se sumergió el gel en una solución de HCl (0.25M) por 10 minutos para depurar el ADN, seguido de dos incubaciones en solución 1 (0.2 N de NaOH y 0.5 M de NaCl) por 10 minutos para desnaturalizar las cadenas de ADN. Después se realizó dos incubaciones en solución 2 (1 M de NaCl y 0.5 M de Tris-Cl, pH 8.0) por 10 minutos para neutralizar el pH del gel, y una incubación final en solución de transferencia SSC 20X (0.75 M de NaCl y 75 mM de citrato de sodio). El gel fue ensamblado colocando sobre éste un papel absorbente, luego la membrana de nylon y sobre la membrana de nylon una columna de papel absorbente. El tiempo de transferencia fue de 72 horas. Luego se secó la membrana en un horno a 120°C por 30 minutos para fijar el ADN. Para la fase de pre-hibridación se humedeció la membrana en una solución SSC 2X, después se colocó la membrana dentro de una funda plástica con 45 ml de solución de hibridación Church Gilber (1 mM de EDTA, 0.5 M de NaHPO₄, 7% de SDS, pH final 7.2) precalentada a 65 °C. El conjunto se incubó a 65 °C por 3 horas. Para la fase de hibridación, las sondas 1, 2 y 3 se calentaron a 95 °C por 5 minutos antes de agregarlas a 45 ml de solución de hibridación fresca, precalentada a 65 °C. Esta solución se agregó a la membrana y se incubó a 65 °C toda la noche. En la fase de post-hibridación se lavó la membrana en solución SSC 2X por 10 minutos, seguida por 6 lavados de 10 minutos cada uno con solución A (SSC 0.2X+SDS 0.1%) y, de igual manera,

con solución B (SSC 0.1X+SDS 0.1%). Después se lavó la membrana dos veces con solución SSC 0.1X por 5 minutos. La membrana se equilibró en una solución TBS (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 2.7 mM de KCl y 137 mM de NaCl), antes de bloquearla en TBS con 5% de leche por 45 min., a temperatura ambiente. Se enjuagó brevemente la membrana en TBS, y se incubó con 150 U de anticuerpo anti-Digoxigenin marcado con fosfatasa alcalina (Fab fragments, Roche), en TBS con 5% de leche por 45 min a temperatura ambiente. Luego se lavó la membrana varias veces en TBS, seguida de buffer B (50 mM de Tris-Cl pH 9.0, 1 mM de MgCl₂ y 100 mM de NaCl). Finalmente se añadió la solución de revelado con sustrato de fosfatasa alcalina precipitante (BM Purple precipitating alkaline phosphatase substrate, Roche) sobre la membrana por 3 horas, sin agitación. Para detener la reacción se agregó 50 ml de solución TBS con 1mM de EDTA.

3. Resultados

3.1 Implementación de protocolos para extracción de ADN genómico de *P. vannamei*

Para el presente estudio fue necesario ensayar algunos protocolos de extracción de ADN en diferentes tejidos del camarón como hepatopáncreas, epitelio, músculo, branquias y hemolinfa. El objetivo de estas pruebas fue implementar un protocolo que permita, a partir de tejidos de animales individuales, la obtención de ADN genómico de cantidad (*i.e.*, >30 µg) y calidad adecuada (*i.e.*, cociente A_{260/280}>1.7 y sin fragmentación en geles de agarosa) para pruebas de Southern blot.

De todos los procedimientos evaluados (ver Tabla III), el protocolo que cumplió con los requerimientos arriba mencionados fue el Kit Easy DNATM (Invitrogen), a partir de hemolinfa de reproductores. Tal como se indica en la Tabla III, el Kit comercial utilizado resultó en un ADN de alta pureza, con un cociente A_{260/280}>1.8, y un promedio de 51 µg de ADN por muestra (con rango de 36-89 µg). El ADN obtenido con el Kit Easy DNATM, al ser analizado en geles de agarosa, mostró predominantemente una banda de alto peso molecular indicando la presencia de ADN genómico (resultados no mostrados).

Tabla III: Cuadro comparativo entre los diferentes protocolos de extracción de ADN genómico en diferentes tejidos. La tabla muestra que el protocolo del kit Easy DNA de Invitrogen genera mayor cantidad y mejor calidad de ADN usando hemolinfa como muestra biológica. La presencia de productos de degradación fu evaluada por electroforesis en agarosa

Método	Tejido	Muestras evaluadas	Concentración de ADN promedio (ng/µl)	Cociente Absorbancia 260/280 Promedio	Degradación
CTAB	Hemolinfa	8	101.02	1.75	SI
	Branquias	8	117.32	1.05	SI
	Músculo	15	168.75	1.23	SI
	Hepatopáncreas	8	171.88	1.25	SI
	Epitelio	8	92.34	1.02	SI
Isolación de guanidina	Hemolinfa	8	91.33	1.05	SI
	Branquias	8	102.55	1.23	SI
	Músculo	15	118.75	1.31	SI
	Hepatopáncreas	8	141.51	1.24	SI
	Epitelio	8	102.74	1.14	SI
Kit Pure Link TM	Hemolinfa	8	97.0	1.33	SI
	Branquias	8	122.85	1.18	SI
	Músculo	15	127.85	1.12	SI
	Hepatopáncreas	8	112.15	1.17	SI
	Epitelio	8	30.14	1.05	SI
Kit Easy DNA TM	Hemolinfa	25	505.9	1.95	NO
	Branquias	8	125.80	1.78	SI
	Músculo	8	235.32	1.35	SI
	Epitelio	8	107.97	1.10	SI

En base a estos resultados, se decidió utilizar para las pruebas subsecuentes ADN genómico aislado con el kit Easy DNATM de Invitrogen, a partir de hemolinfa de reproductores.

3.2 Diseño de sondas para Southern blot

Las sondas fueron generadas por PCR en presencia de 11-DIG dUTP, utilizando como sustrato ADN obtenido de animales infectados con el virus. Un esquema general de las regiones reconocidas por las 3 sondas utilizadas se muestra en la Figura 1.

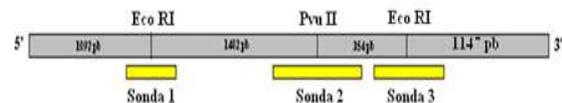


Figura 1. Esquema general de la hibridación de las sondas sobre el genoma del IHHNV y los sitios de restricción Eco RI y Pvu II en el genoma del virus.

3.3 Patrones de hibridación asociados con IHHNV: southern blot

Para obtener muestras de ADN genómico de *P. vannamei* portadores de IHHNV se monitorearon un total de 25 individuos (la mayoría hembras en edad reproductiva). La prueba de diagnóstico se basó en un ensayo de PCR para la amplificación de un fragmento de 346 pb del genoma de IHHNV. En total, de los 25 animales analizados con el protocolo descrito en Métodos, 23 fueron positivos para el virus. Todos los animales analizados carecieron de signos aparentes de enfermedad. Estos resultados son consistentes con estudios anteriores, que han encontrado prevalencias extremadamente altas de portadores asintomáticos en poblaciones domesticadas de *P. vannamei* en Ecuador [10, 11]

Para análisis por Southern blot se utilizaron las muestras positivas con mayor cantidad de ADN genómico disponible. Las muestras escogidas fueron sometidas a tres reacciones de digestión con endonucleasas de restricción: i) digestión simple con

Eco RI, ii) digestión simple con Pvu II, y iii) doble digestión con Eco RI y Pvu II. A manera de control, se sometió una muestra de ADN a una digestión con la enzima Bam HI, con el fin de evaluar la especificidad de los patrones de hibridación obtenidos en las reacciones con Eco RI y Pvu II (el sitio de restricción para Bam HI no está presente en el genoma del IHNV publicado).

En caso de existir integración, el ADN del virus sería de doble cadena, permitiendo así que las enzimas de restricción corten el genoma viral y puedan ser analizados por Southern blot. Cabe notar que el ADN de IHNV en estado libre es de simple cadena, y por tanto resistente a digestión con enzimas de restricción. La Figura 2 muestra un esquema de los resultados de Southern blot esperados en caso de existir (o de no existir) ADN viral integrado.

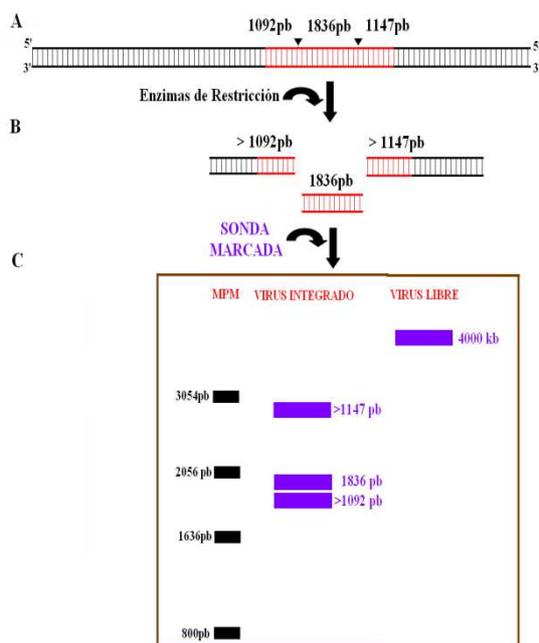


Figura 2. Esquema general de integración viral, digestión con Eco RI y Southern blot **A.** En este esquema se muestra los sitios de restricción **B.**

Acción de una enzima en ambos sitios de restricción en el ADN viral integrado. Esta digestión genera tres fragmentos, de los cuales los extremos tienen nucleótidos adicionales debido a la integración con el genoma del camarón **C.**

Esquema del Southern blot con 3 carriles: MPM=Marcador de Peso Molecular, ADN viral Integrado y ADN viral no integrado (libre).. En el ADN viral no integrado solo se espera ver una banda correspondiente al virus libre ~4000 nt.

ADN genómico proveniente de la misma muestra (*i.e.* del mismo animal) tanto con Eco RI como con Pvu II y/o con digestión simultánea con ambas enzimas. Sin embargo, en muchas ocasiones esto no fue posible, debido a que era necesario obtener al menos 30 µg de ADN total a partir de la hemolinfa de un solo animal, y para muchas muestras la cantidad de ADN obtenida estuvo por debajo de este requerimiento. Se decidió considerar un patrón de hibridación como confiable, cuando la misma muestra diera un patrón diferente al ser digerida con una endonucleasa diferente. La Figura 3 muestra el patrón de hibridación único que se observó al cabo de analizar el ADN de 6 animales, ya sea con Eco RI, Pvu II, o con ambas enzimas. El ADN de la mayoría de animales no reveló patrón alguno de hibridación, a pesar de que los animales fueron positivos para IHNV, en el diagnóstico por PCR. Este bajo poder de detección enfatiza la necesidad de incrementar la sensibilidad del protocolo de Southern blot en estudios futuros de integración de IHNV. El resultado más revelador fue que el patrón de hibridación mostrado en la Figura 3 se observó en muestras de ADN de diferentes individuos, independientemente de la enzima usada para digerir el ADN previo a la electroforesis. Esto sugiere que los diferentes fragmentos de ADN viral detectados no corresponden a ADN de doble cadena digerido con las enzimas de restricción utilizadas. La interpretación más simple de este resultado es que el ADN libre de IHNV simple cadena, al migrar en un gel de agarosa bajo condiciones no desnaturizantes, forma estructuras secundarias que migran en un patrón que no corresponde al esperado para ADN lineal de 4 Kb. Consistente con esta explicación, el ADN de IHNV tiene el potencial de formar estructuras secundarias extensas (análisis con RNAfold, <http://rna.tbi.univie.ac.at>), en parte debido a las múltiples regiones con secuencia repetitiva, incluidos los elementos terminales repetitivos que son importantes para la replicación del ADN viral (12). Futuros experimentos podrían utilizar condiciones desnaturizantes durante el Southern blot para corroborar esta hipótesis.

Uno de los potenciales problemas en la interpretación de patrones de hibridación en Southern blot es la evaluación de la especificidad de dichos patrones. En los estudios aquí presentados se intentó facilitar esta interpretación analizando, en la medida de lo posible,

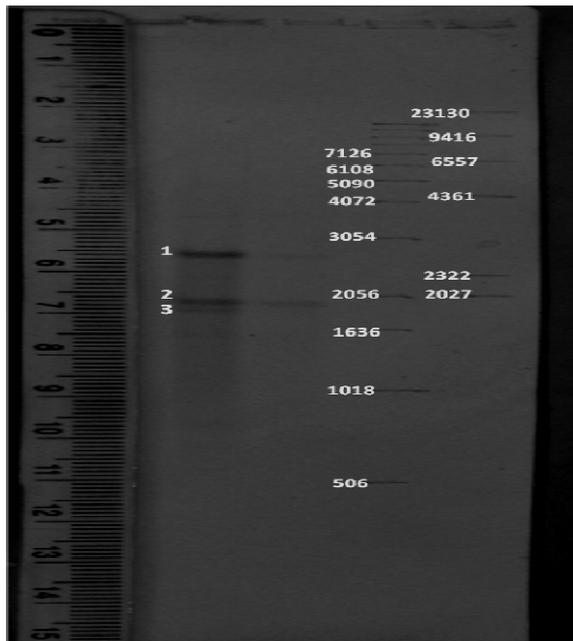


Figura 3. Patrón de hibridación único observado en ADN de animales portadores de IHHNV. Los carriles 1 y 2 corresponden a ADN genómico de dos individuos digerido con Eco RI. A la derecha de los patrones de hibridación se muestran las posiciones de las bandas correspondientes a los dos marcadores de peso molecular utilizados. Una mezcla de las 3 sondas descritas en la sección 3.2 fue utilizada en esta prueba.

4. Discusión

En la producción de camarón se han implementado métodos para la mitigación de enfermedades que afectan negativamente la producción. Una de las estrategias propuestas ha sido la generación de animales libres de patógenos específicos, tales como el IHHNV, que bajo ciertas condiciones ha sido asociado con el síndrome de la deformidad y el enanismo. Al momento el método más usado para el diagnóstico del IHHNV es por PCR, técnica que por su sensibilidad y relativo bajo costo ha sido aceptada a nivel comercial. Prevalencias cercanas al 100% (en base a PCR) pueden ser observadas en poblaciones domesticadas sin signos aparentes de enfermedad [29]. Esto indica la existencia de animales portadores asintomáticos, y la importancia de condiciones ambientales en el desarrollo de patologías asociadas con el IHHNV. Una posible explicación para estas observaciones sería la capacidad del IHHNV para co-existir con el hospedero, posiblemente promoviendo estados de latencia. Un mecanismo que podría estar asociado con latencia es la integración del genoma viral en el genoma del hospedero. En *P. monodon* la existencia de ADN de IHHNV integrado ha sido documentada [6]. Considerando estos antecedentes, se planteó la hipótesis de un fenómeno similar (integración viral) en *P. vannamei*, lo cual podría explicar la alta prevalencia

de ADN viral en ausencia de enfermedad. Para demostrar la presencia o ausencia de secuencias del virus integrado en el genoma de *P. vannamei* se utilizó la técnica de Southern blot. Se observó un único patrón de hibridación (tres bandas) en todas las muestras positivas en pruebas de Southern blot (el primero mayor a 2322 pb, el segundo se aproxima a 2000 pb y el tercero mayor a 1636 pb, Figura 3). En principio, este patrón de restricción podría ser indicativo de ADN viral integrado. Sin embargo, dicho patrón no varió en relación con las enzimas de restricción utilizadas, lo cual sugiere que se trata de ADN resistente a estas endonucleasas (e.g. ADN monocatenario). La explicación más sencilla para estos resultados es que corresponden a diferentes estructuras secundarias de la cadena de ADN del virus. En base a estos resultados, durante esta investigación no se encontró evidencia de integración de ADN viral en la población de *P. vannamei* evaluada. Futuras investigaciones serán necesarias para confirmar estas conclusiones. En particular, muchos más individuos y poblaciones deberán ser evaluados, y otras técnicas más sensibles deberán ser implementadas. Un método promisorio en este sentido es la PCR inversa [13]

Es importante determinar si existe integración de ADN de IHHNV en *P. vannamei* para comprender mejor varios aspectos de su ciclo de vida, su epidemiología, y para el desarrollo de métodos de diagnóstico más informativos.

Un ejemplo concreto sería la modificación del diagnóstico para el IHHNV basado en PCR, mediante el diseño de iniciadores capaces de discriminar el ADN viral libre del ADN viral integrado. Además en caso de integración sería importante saber en qué locus del genoma del hospedero se encuentran las secuencias del virus, con el fin de investigar las posibles consecuencias de la integración sobre la fisiología del mismo. Desde el punto de vista epidemiológico, la integración viral podría contribuir a explicar los resultados de distribución y aparente transmisión vertical del virus.

5. Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento de International Foundation for Science (IFS)., Agradecemos a la empresa BIOGEMAR S.A. por co-financiamiento y por proporcionar el laboratorio y los animales utilizados para la investigación.

6. Referencias

- [1] Lightner, D., Redman, R., Bell, T., Brock, J. (1983a). Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J World Maric Soc*, **14**: 221-225.
- [2] Kalagayan, H., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweeney, J., Wyban, J., and Brock, J. (1991). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis

virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquacult. Soc.* 22, 235-243.

[3] Nunan, L., Poulos, B., Lightner, D. (2000). Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in Penaeid Shrimp. *Marine Biotechnology*, 2: 319-328.

[4] Sun Zhao-Feng, Hu Chao-Qun, Ren Chun-Hua, Shen Qi, 2006. Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 131, 41-46.

[5] Braz, Regina de Fátima Cimária Porfírio Rodrigues de Oliveira da Silva, Lígia Garcia Reis, Pedro Carlos Cunha Martins, Mauricio Pereira de Sales, Rosely Vasconcelos Meissner (2008). Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus vanamei* cultured in northeastern Brazil. *Aquaculture* 288: 143-146

[6] Tang, K. and Lightner, D. (2006) Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Research*, 118: 185-191.

[7] Saigo, K., Yoshida K, Ikeda R, Sacamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Ken mocha T, Inoue I. (2008). Integration of hepatitis B virus DNA

into the myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL4) gene and rearrangements of MLL4 in human hepatocellular carcinoma. *Hum Mutat* 29(5): 703-708.

[8] Varela, M., Spencer TE, Palmarine M, Arnaud F. (2009) Friendly viruses: the special relationship between endogenous retroviruses and their host. *Ann N Y Acad Sci.* 1178, 157-72.

[9] Yeates, C., Gillings M., Davison, A., Altavilla, N., Veal, D. (1998) Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biol Proced Online* 14;1: 40-47.

[10] Motte E., Yugcha E., Luzardo J., Castro F., Leclercq G., Rodríguez J., Miranda P., Borja O., Serrano J., Terreros M., Montalvo K., Narváez A., Tenorio N., Cedeño V., Mialhe E., Boulo V., 2003. Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 219, 57-70.

[11] Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

[12] Shike, H., Dhar A.K., Burns J., Shimizu C., Jousset F., Klimpel K., and Bergoin M., (2000). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito Brevdensoviruses. *Virology* 277: 167-177.

[13] Ochman, H., Gerber, A. S., and Hartl, D. L. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120, 621-623

