CENAIM INFORMA

Boletín Informativo No 130 Junio 15 del 2005

Por José Melena, M.Sc
Investigador Virología

Estudio de la Co-infección viral IHHNV-WSSV en el camarón blanco *L. vannamei*

Antecedentes

En Ecuador, el desarrollo y subsistencia de la industria dedicada al cultivo del camarón blanco *L. vannamei* han sido amenazados por la aparición de patógenos virales, siendo los de mayor importancia el Virus de la Necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV) y el Virus del Síndrome de la mancha blanca (WSSV). El IHHNV no causa la muerte de *L. vannamei*, sino que produce una enfermedad llamada Runt deformity Syndrome (RDS), caracterizada por deformidad cuticular y reducción del crecimiento, mientras que el WSSV es un virus extremadamente letal que ha causado grandes mortalidades y enormes pérdidas económicas en las camaroneras locales, desde su aparición en 1999.

Recientemente, una forma de interacción patogénica basada en la Co-infección viral, la cual es un estado en el que dos o más virus homólogos (semejantes) o heterólogos (diferentes) están presentes en un mismo hospedero, ha suministrado ciertas evidencias que mostrarían un efecto de antagonismo entre virus en determinados casos. Tal interacción se denomina Interferencia Viral y es un fenómeno caracterizado por la habilidad de un virus para inhibir la proliferación de un virus subsecuente en el mismo individuo. Los mecanismos involucrados en este fenómeno no son conocidos totalmente, pero algunos ejemplos ya han sido descritos en especies utilizadas en Acuicultura. De ellos, el único caso reportado en crustáceos señala una disminución de la mortalidad observada durante un desafío con WSSV en camarones juveniles de *L. stylirostris* pre-infectados con IHHNV, evidenciando la aparición de un efecto protector sobre los camarones desafiados, atribuíble a la infección por el primer virus (1). Adicionalmente, el concepto de Interferencia involucra en su manifestación a la intervención de partículas interferentes defectuosas (DIPs), siendo la inactivación viral una vía importante para su formación (2).

Por lo anteriormente señalado, este estudio propuso evaluar la infección con IHHNV y la exposición a WSSV inactivado en distintas fases larvarias de *L. vannamei,* sobre su supervivencia y carga viral (IHHNV-WSSV) durante una prueba de desafío con WSSV en Pos-larva (PL) 45. Si la Interferencia Viral en *L. vannamei* pudiese ser demostrada experimentalmente, constituiría la evidencia preliminar de la existencia de una competencia o antagonismo entre patógenos virales en esta especie.

Materiales y Métodos

Este estudio consideró particularmente importante la disponibilidad de camarones *L. vannamei* en condición de salud Specific pathogen free (SPF), para efectuar la evaluación experimental de la Co-infección viral. Se importó un lote de nauplios SPF procedentes de la compañía Shrimp Improvement Systems (Florida, USA), el cual fue utilizado para el desarrollo de 3 larviculturas en paralelo: SPF (control), WSSV inactivado (por formaldehido) e IHHNV, respectivamente. Los inóculos aislados de ambos virus y la inactivación de WSSV fueron obtenidos mediante protocolos implantados en CENAIM.

Las larviculturas fueron desarrolladas, siguiendo el protocolo de CENAIM, en sets separados para mantener las condiciones inherentes a cada grupo. WSSV inactivado e IHHNV fueron aplicados vía inmersión, entre los estadíos larvales Nauplio V y Mysis I. En PL15, las 3 larviculturas fueron subdivididas en 10 tratamientos (Tabla 1), de los cuales 7 fueron posteriormente evaluados mediante una prueba de desafío con WSSV vía ingestión en PL45, mientras que los 3 restantes se mantuvieron sin ser desafiados durante la prueba. Previo al desafío con WSSV, 2 de los 7 tratamientos fueron desafiados con IHHNV vía inmersión en PL22 (tratamientos 3 y 10), y 2 fueron expuestos a WSSV inactivado en PL35 (tratamientos 4 y 7). La prueba de desafío se realizó siguiendo un diseño de bloque a razón de 15 animales por réplica y 20 réplicas por tratamiento. El experimento tuvo una duración de 10 días pos-infección.

Tabla 1. Esquema de larviculturas y tratamientos evaluados

Larvicultura	Código	Tratamiento	Desafío(PL45)
SPF	T1	-	-
SPF	T2	-	Desafío
SPF	T3	IHHNV (PL22)	Desafío
SPF	T4	WSV inact. (PL35)	Desafío
WSSV inact	T5	-	-
WSSV inact	T6	-	Desafío
WSSV inact	T7	WSV inact. (PL35)	Desafío
IHHNV	T8	-	-
IHHNV	T9	-	Desafío
IHHNV	T10	IHHNV (PL22)	Desafío

Durante la prueba de desafío se tomaron muestras, fijadas en etanol al 95%, de animales moribundos y supervivientes, según el caso, a partir de todos los tratamientos, incluyendo aquellos no desafiados, para la detección de WSSV, IHHNV y Virus del Sindrome de Taura (TSV) mediante la técnica de Reacción de Polimerización en cadena (PCR) (IQ2000™ System Kit, Farming Intelligene Technology Corporation Inc., Taiwan). Complementariamente, se evaluó la carga viral de WSSV e IHHNV en 5 animales individuales moribundos y supervivientes, de los tratamientos con mayor supervivencia al final del desafío y de los no desafiados, mediante el uso de la técnica de PCR en tiempo real (Aquaculture Pathology Laboratory, UAZ, USA).

Resultados

Al décimo día pos-infección sólo los tratamientos 4 (4.7%) y 10 (4%) registraron animales supervivientes, a diferencia de los tratamientos desafiados restantes (0%) (Fig. 1).

La evaluación por PCR de 30 animales moribundos (72 horas pos-infección) de cada uno de los tratamientos desafiados confirmó el estado de la infección de WSSV, particularmente severo. La infección de IHHNV fue evaluada en 30 animales moribundos de cada uno de los tratamientos 3, 4 y 10 (T3, T4 y T10) exclusivamente, mostrando que sólo hubo animales infectados (5/30) en T10.

Complementariamente, muestras de animales de todos los tratamientos fueron analizadas por PCR de la Reversa Transcriptasa (RT-PCR) para la detección de TSV. Todas

CENAIM INFORMA

Boletín Informativo No 130 Junio 15 del 2005

Por José Melena, M.Sc
Investigador Virología

Las muestras de tratamientos 1, 5 y 8 (T1, T5 Y T8) resultaron ser negativas a la infección por WSSV y TSV. La infección por IHHNV no fue evaluada.

La carga viral de animales moribundos y supervivientes (según el caso) de T3, T4, y T10, y de animales de los tratamientos no desafiados 1, 5 y 8, analizada por la técnica de PCR en tiempo real, mostró que los animales supervivientes de T10 presentaron dos estados patológicos notoriamente distintos, haciendo necesario separarlos en 2 subgrupos para facilitar su análisis. El primer subgrupo tenía una carga viral promedio elevada para IHHNV (6.59×10^8 copias/µg ADN) e inexistente para WSSV (0 copias/µg ADN), mientras que el segundo subgrupo tuvo cargas bajas para IHHNV (90 copias/µg ADN) y WSSV (440 copias/µg ADN). La carga viral de los supervivientes de T4 reveló un comportamiento similar al observado en el segundo subgrupo de supervivientes de T10. Por el contrario, los moribundos presentaron una carga viral promedio elevada para WSSV ($2.16 – 2.72 \times 10^9$ copias/µg ADN) y baja para IHHNV (9.95×10^3 - 1.45×10^4 copias/µg ADN). Finalmente, muestras de animales de T1, T5 y T8 registraron cargas bajas para ambos virus (Tabla 2).

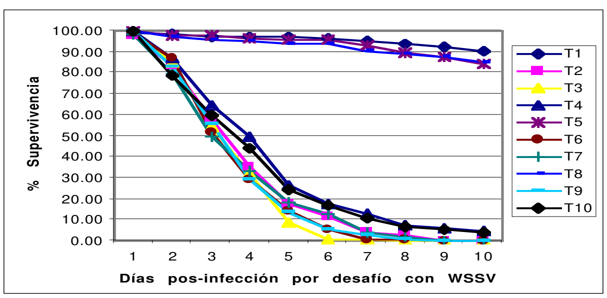

Fig. 1.- Supervivencia de Pos-larvas *L. vannamei*, distribuídas en tratamientos evaluados durante una prueba de desafío con WSSV.

Tabla 2.- Cuantificación de la carga viral de IHHNV y WSSV por PCR en tiempo real en muestras de ADN extraído a partir de PLs moribundos y supervivientes colectados durante la prueba de desafío con WSSV

Trat	Estado del animal (N)	Media IHHNV (copias/µg ADN)	Media WSSV (copias/µg ADN)
10	Supervivientes (3)	6.59×10^8	0
	Supervivientes (5)	90	440
	Moribundos (5)	1.45×10^4	2.16×10^9
4	Supervivientes (5)	582	440
	Moribundos (6)	9.95×10^3	2.72×10^9
1	Supervivientes (5)	60	280
5	Supervivientes (5)	5.4×10^4	380
8	Supervivientes (5)	140	420

N=numero de camarones analizados

Discusión

Los resultados de la carga viral de las muestras correspondientes a un subgrupo de camarones supervivientes del tratamiento doblemente infectado con IHHNV (T10) reflejan un comportamiento similar al descrito en *L. stylirostris* (1), es decir, una alta carga de IHHNV y ausencia de WSSV, lo que permitiría aseverar que, al menos bajo las condiciones experimentales de este estudio, ha sido posible encontrar una evidencia preliminar sobre la existencia de Interferencia Viral en pos-larvas de *L. vannamei* mediante una pre-infección asintomática con IHHNV.

Este resultado podría explicar la evidencia anecdótica reportada por camaroneros ecuatorianos, particularmente difundida durante el año 2000 en un foro de internet (Shrimp group) sobre cultivo de camarón, respecto a que los camarones *L. vannamei* que sobrevivieron a una infección con WSSV en sus piscinas, tenían RDS
http://groups.yahoo.com/group/shrimp/messenge/998
http://groups.yahoo.com/group/shrimp/messenge/1005

También resulta interesante que un subgrupo de supervivientes de T10 hayan presentado una carga baja para ambos virus. Ante una posible ausencia del fenómeno de Interferencia, este comportamiento sería consecuencia de algún tipo de respuesta inmunitaria innata anti-viral del hospedero. Algunos genes asociados con este mecanismo están siendo actualmente estudiados.

Por su parte, la existencia de supervivientes en el tratamiento expuesto a WSSV inactivado en PL35 (T4) sugeriría un posible efecto protector de DIPs sobre los animales desafiados.

Finalmente, las cargas virales de WSSV reportadas en los tratamientos sin desafío (T1, T5 y T8) no fueron detectadas por el análisis convencional de PCR, confirmando la mayor sensibilidad del PCR en tiempo real.

Bibliografía

1. Tang, K. F. J., Durand, S., White, B., Redman, R., Mohney, L. & Lightner, D. V. 2003. Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus - a preliminary study. *Aquaculture* 216, 19-29.

2. McLaren, L. & Holland, J. 1974. Defective interfering particles from poliovirus vaccine and vaccine reference strains. *Virology* 60, 579-583. In Fundamental Virology. Third edition, pp. 115-116. Edited by B. Fields, D. Knipe & P. Howley. Lippincott – Raven Publishers. 1996.