

Autor
José Melena C., Ph. D.
Virología



Estudio de la etiología de la necrosis muscular en camarón cultivado *Penaeus vannamei* en Ecuador

Introducción

En 2006, algunas evidencias anecdóticas revelaron la aparición de camarones *Penaeus vannamei* cultivados localmente con presencia de signos clínicos caracterizados por lesiones opacas en la cola, asociadas con necrosis muscular y mortalidades bajas pero persistentes. Estas lesiones y mortalidades inusuales fueron observadas en camarones cultivados en ciertas instalaciones comerciales de la provincia del Guayas, particularmente en zonas cercanas al Golfo de Guayaquil. Signos clínicos similares han sido descritos frecuentemente en camarones marinos cultivados, los cuales han sido atribuidos al efecto de varios factores ambientales generadores de estrés, tales como: hipoxia, hacinamiento o repentinos cambios de temperatura o salinidad (Lightner, 1988). Sin embargo, la expresión de este tipo de necrosis muscular no obedece a una etiología infecciosa.

Por su parte, los signos clínicos externos presentes en muestras de camarón local cultivado y las lesiones observadas mediante análisis histológico, fueron atribuidas preliminarmente a la infección causada por el Virus de la Necrosis Muscular Infecciosa (IMNV por sus siglas en inglés). Este virus y los síntomas asociados con su infección fueron descritos por primera vez en *P. vannamei* cultivado en granjas camaroneras del nordeste de Brasil (Poulos et al., 2006).

Sin embargo, camarones afectados con regiones opacas y/o blanquecinas en su cola han sido analizados en CENAIM entre 2006 y 2007 por la técnica de Reacción de Polimerización en Cadena por Transcripción Reversa (RT-PCR) para la detección de IMNV, y en todos los casos los animales analizados han sido negativos para este virus. Esta evidencia molecular obtenida consistentemente ha conducido

a descartar, al menos en tales muestras, la presencia de este virus a nivel local.

Consecuentemente, los evidentes signos clínicos y las lesiones observadas a nivel de tejidos en camarones sospechosos sugieren que la necrosis muscular reportada localmente podría ser atribuida a un agente, posiblemente infeccioso, distinto de IMNV.

En efecto, al menos otros 2 virus han sido reportados como agentes etiológicos de necrosis muscular en camarón: el *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) en el camarón de agua dulce *M. rosenbergii* (Arcier et al., 1999) y el *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV) en cultivos comerciales de camarón *P. vannamei* en Belice (Tang et al., 2007).

Interesantemente, los signos clínicos y las evidencias histológicas de camarones infectados con PvNV presentan una gran similitud con los síntomas y lesiones en tejido muscular observadas en camarones infectados con IMNV (Tang et al., 2007). Tal semejanza con IMNV en la expresión de su patogenicidad ha conducido al estudio de PvNV a nivel ultraestructural por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y al desarrollo de protocolos basados en técnicas moleculares que permitan detectarlo en forma específica, tales como RT-PCR e Hibridación In situ (ISH) (Tang et al., 2007).

En consideración a los antecedentes mencionados, las evidencias observadas en muestras locales han sugerido que el patógeno involucrado en la expresión de la necrosis muscular podría ser el PvNV o un agente desconocido que afecte al hospedero en forma similar.

En este contexto, CENAIM emprendió una serie de actividades para dilucidar la etiología de la necrosis muscular descrita recientemente en camarones cultivados en Ecuador.

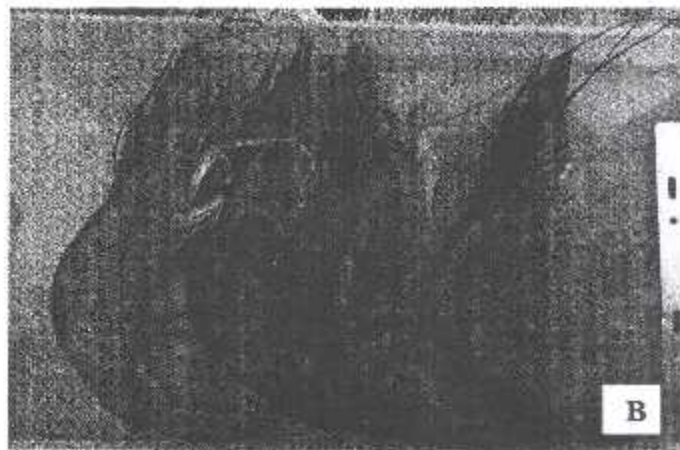
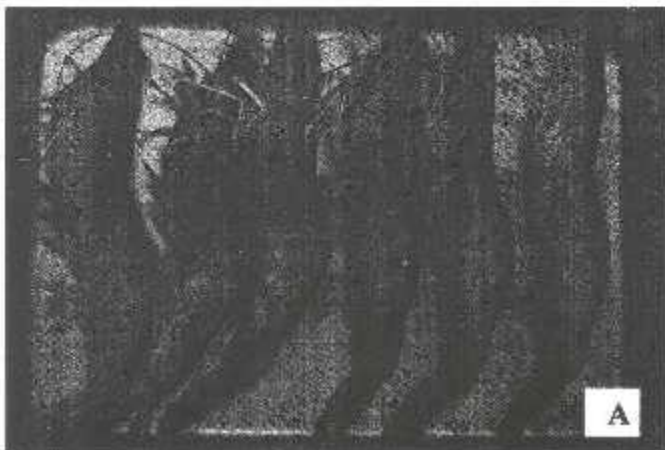


Foto 1.- Camarones adultos *L. vannamei* presentando opacidad en los segmentos abdominales (A y B).

Estudios realizados en CENAIM

En febrero de este año, la Fundación CENAIM-ESPOL inició varias actividades científicas destinadas a caracterizar al agente etiológico de la necrosis muscular observada en muestras de camarón cultivado en el Ecuador. Entre las actividades desarrolladas se encuentran:

1. Visitas a granjas camaroneras (provincia del Guayas) para recolección de muestras sospechosas.
2. Estudio de muestras provenientes de camarones sospechosos mediante análisis de MET.
3. Pruebas de desafío suministrando material con necrosis muscular a camarones *P. vannamei* libres de patógenos específicos, para reproducir la enfermedad y confirmar la naturaleza del agente etiológico involucrado.
4. Implantación de protocolos para la detección del PvNV por RT-PCR y por ISIL.

Visitas a granjas camaroneras

Investigadores del CENAIM han visitado entre febrero y junio del presente año 12 instalaciones comerciales ubicadas en la provincia del Guayas, a fin de recolectar muestras de camarones (músculo y pleópodos) con necrosis muscular. La revisión de muestras de camarón en campo determinó la presencia de animales con signos clínicos asociados a necrosis muscular en al menos 3 camaroneras.

En particular, el CENAIM recibió a inicios de febrero de 2007 un lote de 9 muestras de camarones, procedentes de una camaronera de Guayas, con necrosis del tejido muscular (cola) semejante externamente a referencias bibliográficas de camarones infectados con IMNV. Se analizaron 5 camarones por RT-PCR para el IMNV y 4 camarones por Histología. Todas las muestras examinadas resultaron ser negativas para IMNV por RT-PCR mediante el Kit IQ2000. Sin embargo, las 4 muestras analizadas por Histología mostraron necrosis muscular.

Debido a la particularidad de las lesiones observadas, el CENAIM realizó a fines de febrero un muestreo en la misma camaronera. Las muestras fueron conformadas por camarones adultos individuales con un peso promedio individual de 16 g (Fotos 1A y 1B) tomados durante la cosecha de 2 piscinas de engorde.

Un total de 10 camarones individuales fueron examinados mediante RT-PCR para IMNV, utilizando branquias como tejido objetivo. Por otro lado, 19 camarones individuales fueron examinados mediante Histología. Al igual que en el caso anterior, todos los animales fueron negativos para IMNV por RT-PCR, mientras que el 42% (8/19) de los camarones presentaron necrosis muscular por Histología. En aquellos animales con necrosis muscular confirmada por Histología, los daños sobre el tejido muscular eran evidentes a simple vista (Foto 2).

Para corroborar la naturaleza del agente infeccioso involucrado en la aparición de la necrosis muscular identificada en camarones cultivados localmente, 3 muestras ciegas individuales correspondientes a branquias de 3 camarones adultos de diferente origen fueron enviadas en marzo al Laboratorio de Patología Acuática de la Universidad de Arizona, Estados Unidos de Norteamérica, para su análisis por RT-PCR para los siguientes virus: IMNV, Yellow head



Foto 2.- Corte sagital de camarón adulto *P. vannamei* con necrosis muscular.

Virus (YHV), Taura Syndrome Virus (TSV) y PvNV. Los resultados de los análisis practicados a las 3 muestras determinaron que 2 de ellas fueron negativas a todos los virus examinados, mientras que la muestra restante, la cual pertenece al lote de animales obtenidos a fines de febrero de la camaronera referida, fue positiva a PvNV. El camarón del cual provino la muestra analizada presentó necrosis muscular (Foto 3).

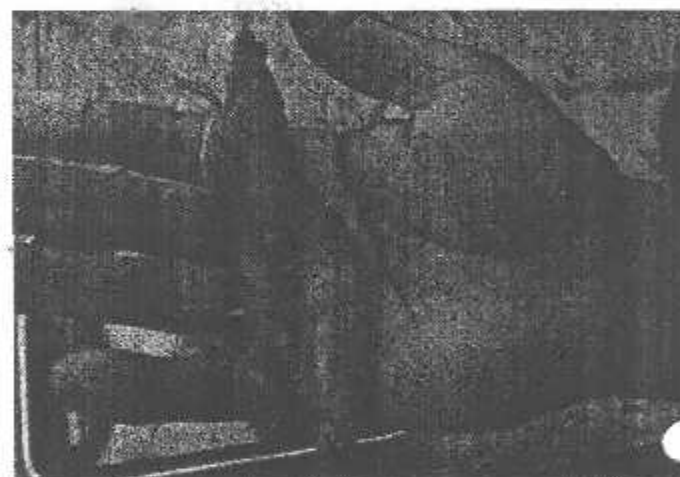


Foto 3.- Camarón adulto *P. vannamei* con necrosis muscular. La muestra de branquias de este camarón resultó preliminarmente positiva para PvNV.

Posteriormente, CENAIM solicitó al Laboratorio de la Universidad de Arizona que proceda al análisis per RT-PCR de un nuevo lote de muestras de camarones cultivados, conformado por 13 muestras de diversos tejidos provenientes de camarones individuales, particularmente branquias. Este material fue enviado a Arizona a fines del mes de abril. Como parte del grupo de muestras sometidas al análisis, se incluyó una muestra testigo conformado por una porción diferente de branquias del mismo camarón que fue reportado como positivo anteriormente por el mismo laboratorio. Esta muestra testigo fue enviado como una muestra regular al Laboratorio de Patología Acuática de la Universidad de Arizona. En este segundo análisis, todas las muestras resultaron ser negativas, incluyendo el testigo.

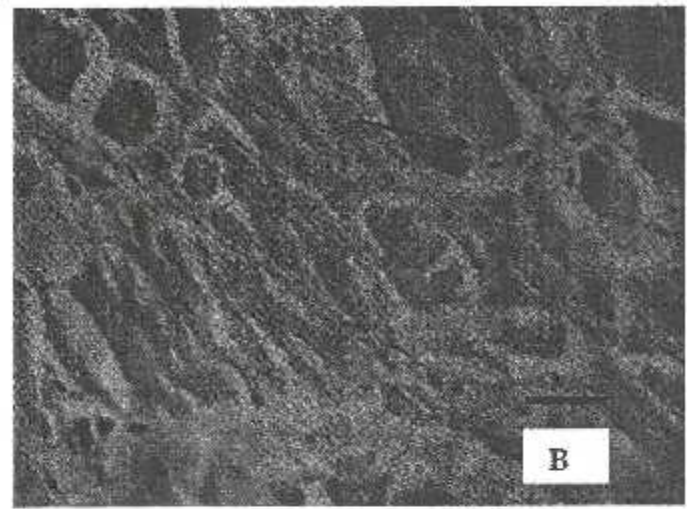
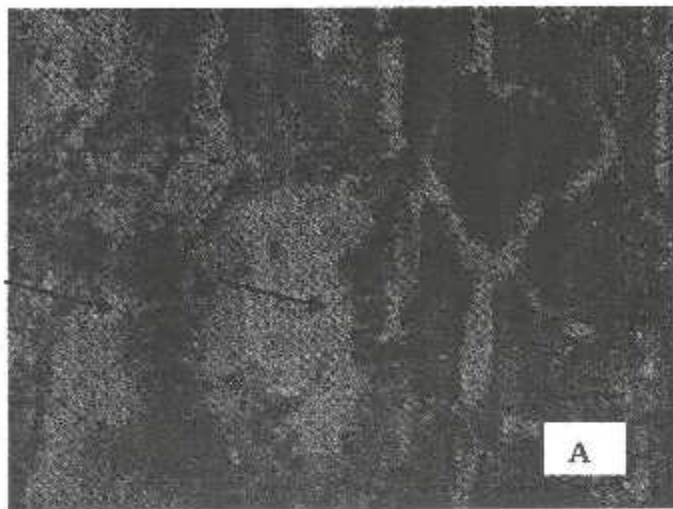


Foto 4.- Infiltración hemocítica y destrucción del tejido muscular (cola) en camarón cultivado (4A). Signos clínicos similares son observados en tejido muscular de un camarón infectado con PvNV (material adquirido al Lab. de Arizona) utilizado como control positivo (4B). Tinción por Hematoxilina y Eosina (H&E). Barra= 10 µm.

Ante esta inconsistencia de resultados, el Laboratorio de Patología Acuática de la Universidad de Arizona volvió a analizar el tejido de la muestra inicial diagnosticada como positiva y almacenada desde marzo resultando esta vez ser negativo para PvNV. El Laboratorio de Patología Acuática de la Universidad de Arizona sugiere 3 posibles explicaciones a la discrepancia observada entre los resultados obtenidos:

- Bajo nivel de infección del PvNV en la muestra analizada.
- El PvNV no estuvo presente en la branquia analizada.
- El primer resultado diagnosticado como positivo para PvNV fue causado por una contaminación durante la prueba efectuada en marzo.

Complementariamente, el Dr. D. V. Lightner, Director del Laboratorio de Patología Acuática de la Universidad de Arizona, ha señalado que las branquias para el análisis de RT-PCR probablemente no sean el tejido más adecuado para la detección de virus que afectan el músculo.

A pesar de la inconsistencia del resultado obtenido por RT-PCR, la presencia de los signos clínicos asociados con la necrosis muscular fueron corroborados en aquella muestra por análisis histológico al compararla con un control positivo apropiado (Fotos 4A y 4B).

Estudio de muestras provenientes de material sospechoso mediante análisis por MET, material consistente en tejido muscular tomado en campo a partir de camarones con necrosis muscular fue fijado en glutaraldehído al 2% y procesado posteriormente para su análisis por MET.

Los resultados del análisis han determinado que las muestras presentaron virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) entre las fibras de músculo esquelético y ausencia de partículas virales semejantes a PvNV (Foto 5).

Pruebas de desafío utilizando material con necrosis muscular en camarones *P. vannamei*

El CENAIM realizó un bioensayo tipo prueba de desafío para intentar reproducir la necrosis muscular bajo condiciones experimentales. Para tal efecto, dos grupos, cada uno de 8

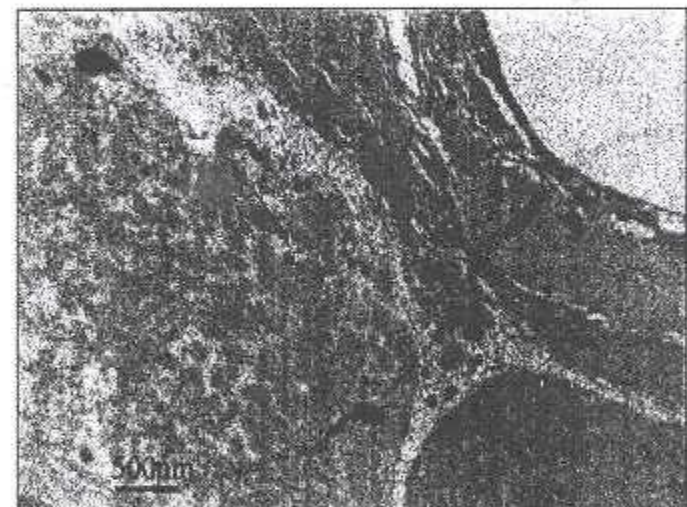


Foto 5.- Tejido muscular necrosado con presencia de viriones de WSSV, vistos transversalmente, analizado por MET con tinción negativa.

camarones Specific Pathogen-Free (SPFs), levantados en CENAIM y libres de patógenos virales, fueron infectados experimentalmente por dos vías: inyección e ingestión, con material proveniente de camarones con necrosis muscular recolectados en campo.

Este bioensayo tuvo una duración de 5 semanas y al final de este periodo secciones de tejido muscular y pleópodos de los animales desafiados fueron examinados por RT-PCR para PvNV y por Histología.

En el grupo de los animales desafiados vía ingestión, 2 de 8 camarones (25%) desarrollaron la enfermedad, mientras que en el grupo de los animales inyectados, se reportó 1 camarón enfermo (13%). Los signos clínicos externos fueron evidentes al igual que las lesiones observadas en el análisis histológico (Fotos 6 y 7). Es necesario señalar que los 2 camarones desafiados por ingestión que presentaron necrosis muscular se encontraban moribundos al ser muestreados.



Foto 6.- Camarón *P. vannamei* desafiado via ingestión con material sospechoso (trozos de camarón con necrosis muscular) presentando opacidad en la cola.



Foto 7.- Infiltración hemocítica y destrucción del tejido muscular de la cola del camarón *P. vannamei* desafiado via ingestión. Tinción por Hematoxilina y Eosina (H&E). Barra= 5 µm.

Este trabajo preliminar ha permitido establecer que el agente involucrado en la expresión de la necrosis muscular en *P. vannamei* es de origen infeccioso.

Implantación de protocolos para la detección del PvNV por RT-PCR y por ISH

Por su parte, el Laboratorio de Biología Molecular del CENAIM ha implantado el protocolo de RT-PCR para la detección de PvNV sugeridos por Tang et al. (2007). Un aspecto importante ha sido la disponibilidad de controles positivos confiables para evaluar la especificidad del protocolo.

Como parte del proceso de validación del protocolo implantado, varias muestras de camarones con necrosis muscular fueron analizadas. Para el caso de RT-PCR las muestras utilizadas fueron p.cópodos de 5 camarones con necrosis muscular (3 colectados en campo, incluyendo e

camarón diagnosticado como positivo para PvNV en marzo, y 2 desafiados por ingestión). Para el análisis por ISH, se utilizaron los cortes histológicos provenientes de los camarones moribundos desafiados por ingestión y del camarón colectado en campo. Ninguna de las muestras locales analizadas por RT-PCR ó por ISH fue diagnosticada como positiva para PvNV.

Conclusiones

- Las lesiones observadas por Histología en los animales afectados son muy similares a las causadas por el PvNV. Sin embargo, ninguna de las muestras analizadas por RT-PCR o por ISH han mostrado la presencia de este virus hasta el momento. El análisis por MET de tejido muscular necrosado confirmaría su ausencia predominantemente.
- El único resultado positivo de un tejido de camarón cultivado en Ecuador para PvNV reportado por el Laboratorio de Patología Acuática de la Universidad de Arizona resultó negativo en un segundo análisis del mismo laboratorio.
- Pruebas de desafío realizadas en el CENAIM permitieron reproducir la necrosis muscular en algunos de los camarones desafiados. Basados en esta experiencia, presumimos que la necrosis muscular observada es probablemente de origen infeccioso.
- El CENAIM dispone de protocolos RT-PCR e ISH para la detección específica de PvNV.
- Análisis por MET del tejido muscular con necrosis evidenciaron únicamente virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) entre las fibras de músculo esquelético y ausencia de partículas virales de PvNV. Es probable que el tejido muscular afectado no es el tejido más apto para proliferación del virus bajo sospecha. Un tejido alterno de animales con necrosis muscular será considerado para próximos análisis de MET.

Referencias bibliográficas

- Archer, J. M., Herman, F., Lightner, D. V., Redman, R. M., Man, J. & Bonami, J. R. 1999. A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms* 38: 177-181.
- Lightner, D. V. 1988. Muscle necrosis of penaeid shrimp. In: Sindermann, C. J., Lightner, D. V. (eds). *Disease diagnosis and control in north America marine aquaculture. Developments in aquaculture and fisheries science*. Vol. 17. Elsevier Press, New York, p. 122-124.
- Poulos, B. T., Tang, K. F., Partoja, C. R., Bonami, J. R. & Lightner, D. V. 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology* 87: 987-996.
- Tang, K. F., Partoja, C. R., Redman, R. M. & Lightner, D. V. 2007. Development of in situ hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 75:183-190.