



Por José Melara C., Ph.D.
Fundación CENIA-MESPO
E-mail: jmelara@cenia-mespo.edu.ec



Estudios en Supresión Viral y 'Vacunación'

Como estrategias para controlar la enfermedad de la mancha blanca (WSD) en *Penaeus vannamei*

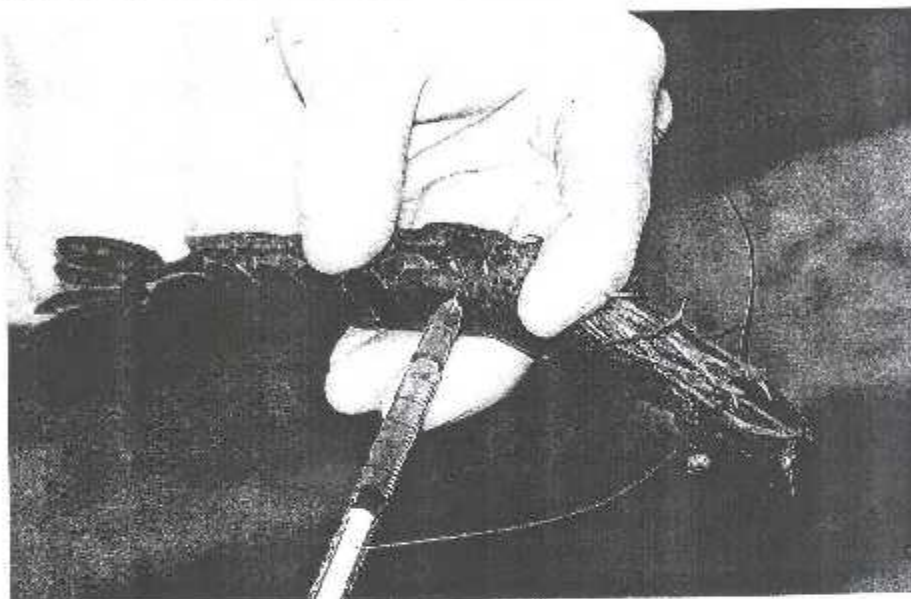
Desde el primer reporte de la presencia de un virus en camarón marino, el cual describió específicamente el hallazgo de un Baculovirus en el hepatopáncreas del camarón *Penaeus duorarum* (Couch, 1974), numerosos estudios han contribuido al campo de la virología de camarones penaeidos.

Actualmente al menos 20 virus han sido descritos en la literatura científica, representando investigaciones que han abarcado desde la evaluación de los postulados de Koch para la verificación de la etiología involucrada, su caracterización ultraestructural y genómica, pasando por el desarrollo de herramientas de diagnóstico, hasta la propuesta de estrategias de control antiviral a nivel del hospedero.

Sin embargo, pese al tiempo transcurrido, las enfermedades virales siguen siendo responsables de causar enormes pérdidas económicas a los sistemas de cultivo de camarón a nivel mundial.

Aparición de patógenos

Particularmente en Ecuador el desarrollo y la subsistencia de la industria nacional 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), el Virus del Síndrome de Taura (TSV) y el Virus del Síndrome de la mancha blanca (WSSV). La necesidad de establecer estrategias para controlar a patógenos como el WSSV ha promovido el desarrollo de ciertas investigaciones enfocadas en el estudio de interacciones virales en *P. stylirostris* (Tang et al., 2003) y la evaluación de una "vacunación" contra WSSV en *P. japonicus* (Namikoshi et al., 2004), *P. monodon* (Witteveldt et al., 2004) y *P. indicus* (Bright Singh et al.,



Se está promoviendo la evaluación de una "vacunación" contra WSSV en *P. japonicus*

2005), encontrándose que es posible conferir protección contra la enfermedad de la mancha blanca (WSD) en camarón a nivel experimental.

En invertebrados las interacciones virales en un mismo hospedero son consecuencia de infecciones virales múltiples, las cuales se deben primordialmente a la ausencia de interferón, proteína antiviral caracterizada en vertebrados que impide que células previamente infectadas con un virus sean subsecuentemente infectadas por otro.

En insectos los primeros reportes científicos sobre la condición de infección viral múltiple han sido descritos mediante microscopía electrónica al menos desde hace cinco décadas, refiriendo principalmente la presencia de dos o tres virus en un mismo individuo e incluso raras infecciones múltiples mostrando hasta cinco virus diferentes en una sola célula (Hess et al., 1978).

Esta condición patológica ha

suministrado información sobre la naturaleza de las interacciones virales a nivel de un mismo hospedero, siendo particularmente interesantes las interacciones que producen una inhibición entre virus, la cual es conocida como interferencia o supresión viral.

Este fenómeno ocurre cuando una población celular previamente infectada por un virus resiste a una subsecuente infección con otro virus (Fenner et al., 1993).

Casos de supresión viral han sido documentados en varias especies de insectos, manifestándose como una reducción de la mortalidad en la población desafiada, por lo cual este fenómeno ofrece una estrategia para el control biológico del virus.

En camarón, la información disponible concerniente a infecciones virales múltiples es mucho menor en comparación a la existente en insectos, limitándose casi exclusivamente a una sola especie de hospedero (*P. monodon*) con énfasis en la presencia de WSSV.

En forma similar, la evidencia de supresión viral en camarón se remite a un solo estudio conducido en *P. stylirostris* y *L. vannamei*, el cual ha señalado que juveniles *P. stylirostris* previamente infectados con IHHNV resistieron una prueba de desafío con WSSV vía ingestión.

Los resultados sugieren que la infección previa por IHHNV podría inducir una supresión de la replicación de WSSV, reduciendo significativamente la mortalidad de los camarones desafiados (Tang et al., 2003). Aunque este fenómeno fue documentado únicamente en *P. stylirostris*, evidencias anecdóticas obtenidas en granjas camaróneras de Ecuador han señalado que camarones *L. vannamei* supervivientes a un brote con WSSV presentaron deformidad y enanismo, sugiriendo una infección con IHHNV (Tang et al., 2003).

Tales indicios han permitido deducir la existencia de la supresión viral en *L. vannamei* a partir de la interacción IHHNV-WSSV en un mismo hospedero, lo cual probablemente involucre una infección temprana con IHHNV, es decir, durante los primeros estadios de desarrollo larval del camarón. Por tal motivo, nuestra hipótesis de trabajo sostiene que la exposición del camarón en sus primeros estadios larvales podría favorecer la proliferación de IHHNV y la expresión del fenómeno de supresión cuando los animales sean sometidos a una prueba de desafío subsecuente con WSSV.

Por otro lado, recientes investigaciones en invertebrados han reportado que es posible un reconocimiento específico de patógenos a nivel inmunitario, particularmente en insectos (Little et al., 2003) y crustáceos (Kurtz y Franz 2003; Stewart et al., 2004). Invocando el concepto de la vacunación, similares investigaciones han sido conducidas en camarón marino, exponiendo a los animales previamente al WSSV inactivado o a sus proteínas estructurales (Namikoshi et al., 2004; Witteveldt et al., 2004; Bright Singh et al., 2005) antes de desafiarlos con WSSV.

Los resultados reportados afirman que tal exposición puede inducir una respuesta inmunitaria específica que protege al camarón contra WSD. En la búsqueda de más información, nuestra

hipótesis de trabajo propone que la exposición previa del camarón a WSSV inactivado induciría una protección contra un desafío posterior con WSSV. Por los antecedentes mencionados, este estudio consideró el desarrollo de tres cultivos larvales de *L. vannamei*, realizados simultáneamente, los cuales fueron expuestos vía inmersión en diferentes estadios a una infección primaria con IHHNV o a WSSV inactivado, para evaluar su supervivencia y carga viral después de una prueba de desafío con WSSV, pero en el estadio Postlarva 45 (PL45).

Materiales y métodos Camarones experimentales

Este estudio utilizó un lote de nauplios en estadio Nauplio 4 (N4) de *L. vannamei* en condición de salud Specific pathogen free (SPF), el cual fue suministrado por la compañía Shrimp Improvement Systems (FL, USA), para el desarrollo simultáneo de tres cultivos larvales: a) larvas SPF, b) expuesto a WSSV inactivado y c) infectado con IHHNV, respectivamente.

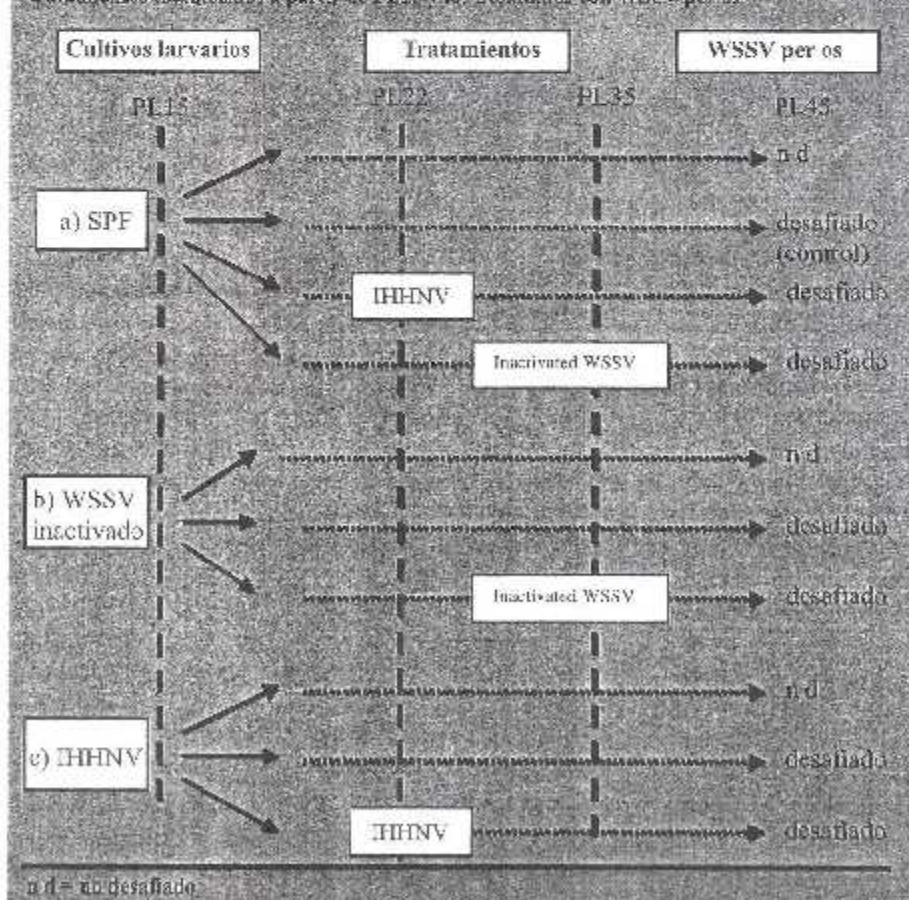
Los cultivos larvales fueron realizados individualmente en tres sets experimentales de la Fundación CENAIM-ESPOL, aislados y provistos de agua de mar filtrada y esterilizada por luz ultravioleta ($300000 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$).

Las suspensiones de WSSV inactivado e IHHNV fueron aplicadas vía inmersión, inoculando en el tanque de cultivo respectivo un volumen de suspensión viral equivalente al 0.1% del volumen de cultivo total. WSSV inactivado fue suministrado en zoea 1 (Z1), zoea 2 (Z2), zoea 3 (Z3) y mysis 1 (M1); mientras que IHHNV en N5 y Z1.

En PL15, los tres cultivos larvales fueron subdivididos en diez tratamientos, de los cuales siete fueron desafiados con WSSV vía ingestión (per os) en PL45. Previo al desafío con WSSV, dos tratamientos fueron infectados con IHHNV vía inmersión en PL22, mientras que otros dos fueron expuestos a WSSV inactivado en PL35 (tabla 1).

En tales estadios las suspensiones virales fueron aplicadas de la forma ya descrita.

Tabla 1. Diseño experimental del ensayo mostrando los cultivos larvales en paralelo, los 10 tratamientos establecidos a partir de PL15 y los desafiados con WSSV per os.



Producción de inóculos virales

El inóculo de WSSV fue preparado utilizando una parte de tejidos infectados (branquias, apéndices y exoesqueleto) y cuatro partes (1:4) de tampón TN (0.02M de Tris-HCl; 0.4M de NaCl, pH 7.4), siendo homogenizado utilizando una licuadora.

Se realizó una centrifugación a 4500 g por 5 min a 4 °C, para remover los restos de tejidos, el sobrenadante fue clarificado a 20000 g por 15 min a 4 °C y finalmente centrifugado a 20000 g por 1 h a 4 °C. El sedimento de WSSV fue resuspendido en 10 mL de tampón TN y almacenado a -80 °C hasta que fuese usado. El inóculo de IHNV fue preparado en forma similar al inóculo de WSSV, excepto que el sedimento viral fue centrifugado finalmente a 40000 g por 45 min a 4 °C.

El sedimento de IHNV fue resuspendido en 10 mL de tampón TN y almacenado a -80 °C hasta que fuese usado. En ambos casos, las suspensiones virales fueron diluidas (1:9) en tampón TN antes de suministrarlas a los tanques de cultivo.

El proceso fue realizado continuamente hasta obtener los volúmenes requeridos para cada inoculación.

La inactivación de WSSV se realizó en base al protocolo descrito por Namikoshi et al. (2004). Brevemente, se adicionó formalina (0.5% v/v) a la solución viral por 10 min a 25 °C. La formalina fue removida mediante dos centrifugaciones a 30000 g por 1 h a 4 °C. Finalmente, el sedimento de WSSV inactivado fue resuspendido en tampón TN.

Detección viral por PCR

Durante la fase de cultivo previa al desafío con WSSV, muestras de larvas en grupo fueron tomadas regularmente de cada tratamiento y fijadas con una solución de etanol al 95% para analizarlas por la técnica de Reacción de Polimerización en Cadena (PCR). Adicionalmente, la técnica de PCR en tiempo real (Aquaculture Pathology Laboratory, UAZ, USA) fue utilizada para la cuantificación de las cargas de WSSV e IHNV de 5 camarones moribundos y 5 supervivientes en forma individual, de 3 tratamientos: IHNV en PL22, WSSV inactivado en PL35 e IHNV en N5, Z1 y PL22.

Prueba de desafío con WSSV per os

En PL 44, 300 pos-larvas (peso promedio individual: 0.11 ± 0.1 g) de cada tratamiento fueron transferidas a un set experimental provisto de 20 bandejas de fibra de vidrio.

Cada bandeja dispuso de 10 botellas de vidrio, con 1.5L de agua de mar esterilizada (35 ppt y 27 °C) por botella. Cada bandeja contuvo una réplica por cada tratamiento y 15 pos-larvas por réplica.

Las pos-larvas fueron aclimatadas sin alimentar por un día. El desafío se realizó suministrando papilla de camarón infectado en dos raciones por 1 día, cada una equivalente al 6% del peso de la biomasa total promedio por réplica. Posteriormente se suministro alimento balanceado 2 veces al día. El tratamiento de camarones desafiado con WSSV, pero sin exposición previa a IHNV o WSSV inactivado fue considerado como tratamiento control. El experimento tuvo una duración de 10 días pos-infección y concluyó cuando las mortalidades se detuvieron.

Resultados

Al décimo día pos-infección, sólo los tratamientos expuestos a WSSV inactivado en PL35 y a IHNV en N5, Z1 y PL22, registraron animales supervivientes, 4.7% y 4%, respectivamente. Por el contrario, el control y los restantes tratamientos registraron 0% de supervivencia en el octavo día pos-infección.

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. Muestras de los tratamientos no desafiados, tomadas al final del experimento, resultaron ser negativas a la infección por WSSV.

La carga de IHNV y WSSV presentes en animales moribundos y supervivientes (según el caso), de los tratamientos IHNV-PL22, WSSVinact-PL35 e IHNV-N5/Z1/PL22, fueron cuantificadas por PCR en tiempo real.

Los camarones supervivientes previamente desafiados con IHNV en N5, Z1 y PL22 ó expuestos a WSSV inactivado en PL35 presentaron bajas cargas de WSSV: 0-1 103 copias/ μ g ADN para el tratamiento con IHNV y

0-2 103 copias/ μ g ADN para el tratamiento con WSSV inactivado.

Por el contrario, los camarones moribundos de ambos tratamientos y los precedentes del tratamiento IHNV-PL22 presentaron una carga elevada para WSSV (2.2 - 2.7 109 copias/ μ g ADN) y una carga baja para IHNV (4.2 103 - 1.5 104 copias/ μ g ADN).

Discusión

En años recientes, una relación de interferencia entre virus, conocida como Supresión viral ha sido descrita en algunas especies animales.

Por otro lado, la vacunación como método de control de enfermedades ha sido usada suministrando WSSV inactivado o proteínas recombinantes del mismo virus para conferir resistencia contra su enfermedad en *P. japonicus* (Namikoshi et al., 2004), en *P. monodon* (Witteveldt et al., 2004) y en *P. indicus* (Bright Singh et al., 2005). Sin embargo, la ausencia de anticuerpos y linfocitos en los invertebrados hacen que el término "vacunación" en este artículo sea mantenido exclusivamente por la similitud de los resultados obtenidos con aquel concepto de inmunización plenamente descrito en vertebrados superiores.

En base a los resultados de las cargas virales, los supervivientes de *P. vannamei* del tratamiento IHNV-N5/Z1/PL22 sugieren una supresión o interferencia de IHNV sobre la infección por WSSV, tal como ha sido descrito en *P. stylirostris* (Tang et al., 2003).

Tal condición podría ser factible tomando en consideración que el virus supresor no necesariamente tiene que replicarse para inducir interferencia y que la habilidad de replicación del virus subsecuente puede ser parcial o totalmente inhibida (Fenner et al., 1993).

Por otro lado, la baja carga de WSSV en los camarones supervivientes del tratamiento WSSVinact-PL35 revelaría una posible inducción de la protección a la infección por WSSV mediada por las partículas inactivadas de WSSV, similar a lo observado después de la "vacunación" en *P. monodon* (Witteveldt et al., 2004), *P. japonicus* (Namikoshi et al., 2004) y *P. indicus* (Bright Singh et al., 2005).

La presente investigación ha revelado que una infección primaria con IHNV en N5, Z1 y PL22, o la exposición a WSSV inactivado en PL35 pueden proveer un efecto protector en post-larvas de *P. vannamei*, contra un desafío por WSSV per os, inducido por la supresión de IHNV sobre la proliferación de WSSV, con IHNV como virus supresor, o por una "vacunación" con WSSV inactivado. Estas evidencias preliminares contribuyen a la comprensión de la interacción entre IHNV y WSSV, y aportan información sobre un mecanismo que podría inducir la respuesta inmune antiviral específica del camarón.

Referencias

- Couch, J. A. 1974. Free and occluded virus similar to Hachovirus in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature* (5438): 229-231.
- Bright Singh, I. S., M. Manjusha, S. Somrath Pai, and R. Philip. 2005. Fenneropenaeus indicus is protected from white spot disease by oral administration of inactivated white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 66: 265-270.
- Fenner, F., E. P. Gibbs, F. A. Murphy, R. Rott, M. Studdert, and D. White. 1993. *Veterinary Virology*. Second edition. Academic Press, Inc., San Diego, California, USA.
- Hess, R., M. D. Summers and L. A. Falcon. 1978. A mixed virus infection in midgut cells of *Autographa californica* and *Trichoplusia ni*. *Journal of Ultrastructure Research* 65: 235-265.
- Kurtz J. and K. Franz. 2003. Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* 425: 37-38.
- Little T. J., B. O'Connor, N. Colegrave, K. Watt and A. F. Read. 2003. Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Current Biology* 13: 489-492.
- Namikoshi, A., J. L. Wu, T. Yamashita, T. Nishizawa, T. Nishioka, M. Arimoto, and K. Muroga. 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 229: 25-35.
- Stewart J. E., B. Aric and L. J. Marks. 2004. Induced resistance to infection of lobsters *Homarus americanus* by *Aerococcus viridans* (var.) *homari*, the bacterium causing gaffkemia. *Diseases of Aquatic Organisms* 62: 197-204.
- Tang, K. F., S. Durand, B. White, R. Redman, L. Mohrey, and D. Lightner. 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.
- Witteveldt, J., C. Cifuentes, J. Viak, and M. van Hulten. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *Journal of Virology* 78: 2057-2061.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por una beca para estudios de post-gradó (Ph. D.) de la Unión Europea (Acuerdo ECU/B7-311/96/214). Financiamiento adicional fue proporcionado por la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS) mediante el fondo A/3642-1. Al Dr. Edward Scura (Shrimp Improvement Systems) por donar el lote de nauplios SPF y al personal de CENAIM involucrado en este estudio, particularmente al Dr. Stanislaus Sonnenholzner (Coordinador científico) y a Rubén Román, Rafael Alvarez y Andrés Pedrazzoli, Jefes de Larvicultura, Bioensayos y Operaciones, respectivamente; porque sin su colaboración no habría sido posible realizarlo.

La completa solución para la nutrición de sus larvas

artemia biomasa

MACKAY
BRIVE SHRIMP CO.
MARINE

ZEIGLER
A World of Sound Nutrition

Poliquetos Marinos

TOPSY BAIT

Prilabsa

www.prilabsa.com

POSSAMON
C/Albán Borja, piso 2,
of. 114 Guayaquil
PAX (593-4) 220-1549
FAX 220-3667
prilabsa@gye.satnet.net