

Transmisión experimental del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) en *Litopenaeus vannamei*: Influencia de la salinidad en la expresión de la infección

Marynes Montiel de Morales^{1*}, Susan E. Laramore², C. Rolland Laramore²,
Felix Morales¹ y John Scarpa²

¹Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

²Harbor Branch Oceanographic Institution, Inc. Aquaculture Division Fort Pierce, FL 34946, USA

Recibido: 12-09-06 Aceptado: 25-05-07

Resumen

Los portadores asintomáticos, del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), de *Litopenaeus vannamei* pueden ser utilizados para el estudio del virus, obtener camarones resistentes al IHHNV o en la producción de vacunas en contra del virus. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia y transmisibilidad de el virus IHHN de camarones *L. vannamei* positivos así como determinar la influencia de dos concentraciones salinas en la expresión de la enfermedad. Seis grupos de 30 camarones libres del virus IHHN fueron inoculados con un homogeneizado proveniente de camarones asintomáticos, positivos para el virus. Seis grupos de 30 camarones libres del virus se utilizaron como control. El estudio se realizó a 32 y 46 UPS. El bioensayo se realizó durante 5 semanas. Se analizaron muestras de hemolinfa, tejido y homogeneizado del cuerpo para la detección de IHHNV por hibridación con dot blot y PCR. Todos los camarones controles fueron negativos para IHHNV. En los camarones inoculados, el 100% y el 95% de las muestras de hemolinfa fueron positivas por la técnica de "dot blot" y de PCR, respectivamente, a partir de la primera semana. En el caso de las muestras de tejido ninguna mostró resultados positivos por la técnica de dot blot, sin embargo el 75% fue positivo para PCR. Las muestras de homogeneizado presentaron positividad en el 35 y el 91% por las técnicas de "dot blot" y PCR, respectivamente. No se observó efecto de la salinidad en la expresión de los síntomas de la enfermedad. Se propone el uso de la hemolinfa con el método de hibridación en "dot blot", como método más eficiente para la detección de IHHNV. En las muestras de homogeneizado y tejido la detección con PCR resultó ser mas efectiva.

Palabras clave: Camarón; IHHNV; *Litopenaeus*; transmisión; salinidad.

* Autor para la correspondencia. Telf-fax. 0261-7598109. E-mail mamontiel@luz.edu.ve

Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHHN) virus transmission in *Litopenaeus vannamei*: Salinity influence in disease expression

Abstract

Asymptomatic infectious hypodermal and hematopoietic virus (IHHNV) *Litopenaeus vannamei* carriers can be used to study the virus, obtain resistant shrimp for IHHNV, and develop a vaccine against the virus. The principal aim of this study was to verify the presence and transmissibility of IHHNV from positive asymptomatic *L. vannamei* and the salinity influence in the disease's expression. Six groups of 30 IHHNV-free shrimp were inoculated with a cell-free homogenate made from the asymptomatic shrimp. Six other groups of 30 IHHNV-free shrimp were used as a control. The study was run at 32 and 46 PSU for 5 weeks. Hemolymph (H), tissue (T), and total body homogenate (HO) samples were analyzed for IHHNV by dot blot and PCR. All non-injected control shrimp were negative for IHHNV by both methods. In exposed shrimp, 100% and 95% of hemolymph samples were found positive by dot blot and PCR, respectively, starting at week 1. In contrast, none of the tissue samples showed positive results by dot blot hybridization and only 75% were positive by PCR. For homogenate samples 35% were positive using dot blot and 91% with PCR. Salinity had no effect. Neither exposed nor control shrimp exhibited clinical diseases symptoms. The use of hemolymph with dot blot hybridization is proposed as the preferred method for detecting IHHNV; however homogenate samples with PCR detection may be used when hemolymph sampling is not possible.

Key words: IHHNV; *Litopenaeus*; salinity; shrimp, transmission.

Introducción

Uno de los principales problemas en el futuro del cultivo de camarones son las enfermedades, en particular aquellas causadas por los virus. El control y erradicación de los patógenos de la industria camaronera garantiza en gran medida el crecimiento de la misma (1). Tres variables han sido relacionadas con los brotes de enfermedades infecciosas: la presencia del organismo patógeno, un huésped susceptible y una condición ambiental predisponente (2).

A nivel mundial, ha sido reportado un número considerable de enfermedades de naturaleza infecciosa asociadas a virus y bacterias; encontrándose las de etiología viral como las de mayor incidencia en el continente asiático (3) y siendo también reportadas en regiones del continente americano (4).

Dentro de los virus identificados como agentes patógenos de camarones peneidos, el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) es una de las principales causas de enfermedad en el cultivo de este grupo de camarones (4,5). IHHNV es un parvovirus, con forma icosaédrica, el cual contiene en su genoma ADN de cadena sencilla, de aproximadamente 4,1 Kb (6). Este virus infecta el cultivo de *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*, así como otras poblaciones de peneidos en el pacífico (7, 8).

En *L. vannamei*, IHHNV causa una infección crónica no-lethal (9), siendo asociado, bajo ciertas condiciones ambientales, como agente etiológico del síndrome de deformidad del rostro (SDR) en esta especie (10). Igualmente, es posible encontrar *L. vannamei* infectado con IHHNV sin desarrollar nin-

gún síntoma de la enfermedad (11) convirtiéndolo en un portador asintomático. La llegada y diseminación del IHNV a países donde se está desarrollando la industria camaronera, a través de portadores asintomáticos, y la habilidad de IHNV de infectar diferentes especies de camarones peneidos han contribuido al desarrollo de la enfermedad (11, 12). El virus ha sido asociado a diferentes portadores incluyendo la aves (13). En Estados Unidos, se ha impuesto la detección del IHNV como una medida de erradicación del virus en ese país y con el propósito de desarrollar un programa de cultivo de camarón libre de patógenos (1) por lo que su transmisibilidad es importante a fin de erradicar o controlar este microorganismo.

Diferentes técnicas han sido utilizadas con el fin de detectar el virus en camarones incluyendo técnicas tradicionales y convencionales, así como de biología molecular, tales como hibridación y PCR con el uso de sondas genéticas, las cuales proveen resultados rápidos y seguros (14). Actualmente, algunas otras técnicas como la PCR de tiempo real se están desarrollando con el propósito de incrementar la sensibilidad y especificidad en la detección del IHNV (15, 16)

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la transmisibilidad del virus IHNV en camarones *L. vannamei* positivos para el virus, a camarones sanos utilizando diferentes técnicas de detección y variabilidad en las concentración salina utilizada para el cultivo del camarón.

Materiales y Métodos

Preparación de los acuarios. Se utilizaron 12 acuarios de vidrio de 90 litros cada uno. Seis de los acuarios fueron llenados con agua a salinidad 32 UPS y los otros seis con salinidad de 46 UPS. Todos los acuarios fueron equipados con piedras de aireación y mantenidos a temperatura ambiente. En cada acuario se colocaron 30 animales con un peso promedio de $3,55 \text{ g} \pm 1,2 \text{ g}$ los cuales, utilizando las técnicas de dot blot y PCR,

arrojaron resultados negativos para la presencia de IHNV. Los animales se alimentaron dos veces al día con una dosis de 4% del peso seco por día, con alimento estándar para camarones.

Extractos del virus. El inóculo viral se preparó a partir de carcasas frescas de camarones de *L. vannamei*, los cuales habían dado resultados positivos para el IHNV, según las técnicas de hibridación in situ, dot blot y PCR. El homogeneizado fue obtenido licuando el cuerpo del camarón en solución salina al 0,75% (1:1 p/v), posteriormente se centrifugó a 2300 xg durante 20 min. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de $0,22 \mu\text{m}$ y se guardó a -70°C para estudios posteriores (17).

Inoculación. Los camarones de tres de los acuarios de los dos tratamientos de salinidad, fueron inyectados intramuscularmente, en el segundo o tercer segmento abdominal, con el extracto del virus, utilizando una inyectadora de 1 mL. Cada animal recibió aproximadamente 0,03 mL de inóculo. Una vez inoculados, los animales fueron regresados al acuario y no se realizaron inyecciones posteriores; de esta manera, cada animal recibió una sola inyección. Los animales de los otros tres acuarios, de cada tratamiento, fueron utilizados como control.

Duración del bioensayo. El experimento fue realizado durante cinco semanas. En las semanas 1, 2 y 3 se colectaron seis animales al azar de cada acuario. Posteriormente, los animales restantes de cada tratamiento fueron colocados todos juntos en uno de los tanques de cada tratamiento, tomando las muestras finales a la quinta semana.

Preparación de muestras. La hemolinfa (H) se obtuvo a partir del seno ventral de los camarones utilizando una jeringa de tuberculina recubierta en su interior con solución de citrato de sodio al 1%, para prevenir la coagulación. El homogeneizado (HO) se preparó de igual forma que el extracto del virus. La muestra de tejido (T) se realizó macerando el cuerpo completo de los animales.

Detección del virus IHHN

Hibridación. Las muestras fueron analizadas para la detección del IHHNV según el kit dot blot ShrimProbe-IHHNV (DiagXotics, Wilton, CT, USA). Se utilizó 1 μ L de la muestra, la cual fue fijada colocando las membranas en un microondas durante 5 min. Posteriormente, la membrana fue tratada como se especifica en el kit.

Extracción de ADN y PCR. El ADN fue extraído utilizando el kit para aislamiento de ácidos nucleicos para PCR y Southern blotting (Boehringer, Pensilvania, USA), seguido por la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el kit Ready to goTM PCR beads (Amershan Pharmacia Biotech). El producto del PCR fue analizado utilizando 10 μ L en geles de agarosa al 1% con buffer TAE. Las muestras se consideraron positivas al mostrar una banda de 1,6 Kbp (18).

Resultados y Discusión

Se analizaron muestras de hemolinfa (40), tejido (40) y homogeneizado (40) de camarones *L. vannamei*, con el objetivo de determinar la transmisión del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV). En cada caso, 20 muestras correspondieron a camarones no inoculados (controles) y 20 a camarones inoculados con IHHNV. Los camarones utilizados como fuente de virus fueron confirmados como positivos para IHHNV utilizando las técnicas de dot blot y PCR.

La Tabla 1 muestra los resultados de la detección del virus IHHN. El total de las muestras fueron analizadas para la presencia de IHHNV utilizando la técnica de hibridación en dot blot encontrando positivas el 100%, 0% y 35% de las muestras de hemolinfa, tejido y homogeneizado, respectivamente. Las muestras controles resultaron negativas para el virus cuando se realizaron las pruebas histológicas (datos no mostrados), la hibridación con dot blot y la PCR.

En el caso de los camarones inoculados se encontró positividad a partir de la prime-

ra semana en las muestras de hemolinfa tanto en los camarones cultivados a 46 UPS como a 32 UPS (Tabla 2). En las muestras de tejido y de homogeneizado analizadas por la técnica de dot blot, la detección de positividad fue difícil de definir, en la primera semana, debido al color de las muestras al momento de prepararlas (Figura 1). Para la segunda semana las muestras de homogeneizado positivas comenzaron a mostrar una mayor intensidad en la reacción lográndose definir su resultado como positivas.

Cincuenta y un (51) muestras provenientes de los camarones inoculados (20 de hemolinfa, 20 de tejido y 11 de homogeneizado) y 36 de camarones control, fueron analizadas por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a fin de establecer la relación entre la hibridación en dot blot y la PCR (Tablas 1 y 2). Las muestras fueron evaluadas como positivas si al realizar el análisis electroforético del producto de la PCR se observaba una banda de 1,6 Kb (Figura 2). De las muestras de hemolinfa, tejido y homogeneizado analizadas por la PCR el 95% (19/20), 75% (15/20) y 91% (10/11) respectivamente, resultaron positivas (Tabla 1).

Se observó un incremento visual en la señal producida, a medida que transcurrió el tiempo, en las muestras de hemolinfa tanto por la técnica de hibridación como la PCR (Tabla 2, Figura 2).

Las muestras de hemolinfa resultaron ser las más adecuadas para la detección del virus. Se encontró 100 y 95% de positividad, en las muestras de hemolinfa, utilizando las técnicas de hibridación y PCR, comparado con 0 y 75% para tejidos y 35 y 91% para las muestras de homogeneizado, respectivamente para las dos técnicas utilizadas. El mayor porcentaje de positividad en las muestras de hemolinfa pudiese estar relacionado con una mayor concentración del virus en la hemolinfa al inicio de la infección o, debido a interferencia por parte de algún compuesto del tejido o del homogeneizado. Estudios previos han demostrado una alta

Tabla 1

Detección por las técnicas de dot blot (DB) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa en *Litopenaeus vannamei* inoculados.

Muestra	n	DB (%)	PCR (%)
Hemolinfa	20	20/20 (100)	19/20 (95)
Tejido	20	0/20 (0)	15/20 (75)
Homogeneizado	20	7/20 (100)	10/11 (91)

n: numero de muestras inoculadas.

Tabla 2

Detección del virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa durante el período de estudio en camarones *Litopenaeus vannamei*, inoculados y controles, a salinidades de 32 y 46 UPS.

Muestras	Semana								
	Sal	1		2		3		5	
		DB	PCR	DB	PCR	DB	PCR	DB	PCR
H (C)	46	-	-	-	-	-	-	-	-
H (I)	46	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++
H (C)	32	-	-	-	-	-	-	-	-
H (I)	32	+	+	++	+++	+++	++++	+++	++++
T (C)	46	-	-	-	-	-	-	-	-
T (I)	46	-	+	-	+++	-	++++	-	+++
T (C)	32	-	-	-	-	-	-	-	-
T (I)	32	-	+++	-	+	-	+++	-	+++
HO (C)	46	-	-	-	-	-	-	-	-
HO (I)	46	-	++++	+	++++	+	++++	+	++++
HO (C)	32	-	-	-	-	-	-	-	-
HO (I)	32	-	+++	+	+++	++	++++	++	++++

Sal: salinidad (UPS); DB: dot blot; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; H: hemolinfa; T: Tejido; HO: homogeneizado; (C): control; (I): inoculados; +: positivo (el numero de + determina un incremento en la señal de la reacción); -: negativo.

sensibilidad y especificidad en las muestras de hemolinfa utilizando la técnica de dot blot para la detección de IHHNV (18). Las muestras controles analizadas mostraron resultados negativos en todos los casos.

En el caso de las muestras de tejido y homogeneizado, la PCR arrojó mejores resultados con un 75 y 91% de positividad, respectivamente. Esto pudiera estar asociado a la dificultad de la lectura del dot blot debido a la coloración presentada por la muestra. Aun-

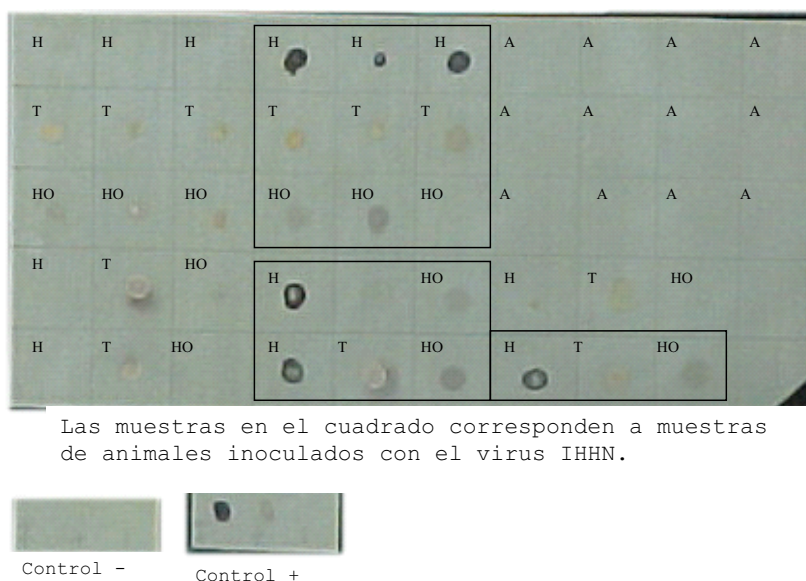
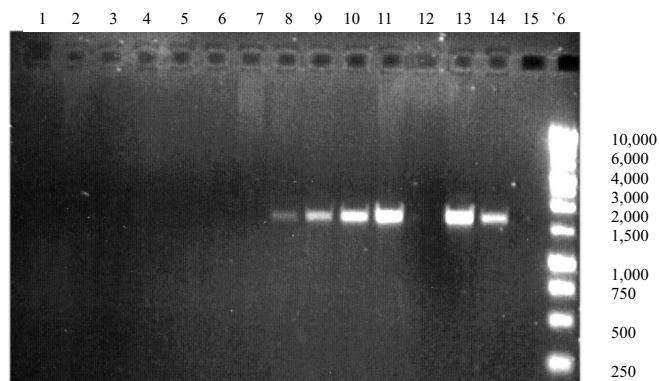


Figura 1. Fotografía de los resultados de la técnica de hibridación en dot blot en muestras de hemolinfa (H), tejido (T) y homogeneizado (HO) de *Litopenaeus vannamei* inoculados y control y muestras de agua (A).



Líneas 1-7 camarones control; líneas 8 -11 muestras de hemolinfa en camarones inoculados en los diferentes tiempos 1, 2, 3 y 5 semanas, respectivamente; línea 12 muestra de agua; línea 13 muestra de tejido de camarones inoculados; línea 14 control +; línea 15 control -; línea 16 marcador de peso molecular proveniente del kit para PCR.

Figura 2. Electroforesis en geles de agarosa de muestras de extracto de ADN amplificado de IHHNV provenientes de camarones y agua.

que la técnica de hibridación con dot blot es sencilla y menos costosa que la PCR se hace necesario utilizar ambas al momento de mo-

nitorear los animales, especialmente en el programa de animales libres de patógenos (SPF). Igualmente en el caso de no existir

muestra de hemolinfa, como en el caso de los camarones muertos o congelados, la técnica de elección para las muestras de tejido sería la PCR (14). Karunasagar and Karunasagar, 1998 (19) han propuesto el uso de la PCR, para la detección de IHNV, como un método no letal útil en la detección del IHNV en reproductores de camarón. En el presente estudio se propone homogeneizar la muestra congelada, lo cual se evidenció que incrementa el porcentaje de positividad.

Se evidenció la presencia y transmisibilidad del virus IHNV en los camarones expuestos comenzando en la semana 1, lo cual se hizo persistente hasta la semana 5, observándose un incremento en la señal a medida que transcurrió el tiempo. Esto pudiese estar relacionado con la replicación del virus, cuya tasa de duplicación se ha estimado en alrededor de 22 h (12) y el aumento de la concentración de ADN viral (20).

La sobrevivencia de los animales fue alta (100%) en los dos tratamientos de salinidad (32 UPS y 46 UPS) sin presentarse diferencia significativa entre los mismos ($p < 0.01$). Estudios previos a salinidades de 25 UPS y 49 UPS mostraron resultados similares (21). No se evidenció síntomas de la enfermedad en ninguno de los tratamientos de salinidad utilizados en este estudio, lo cual indica la posibilidad de que las concentraciones utilizadas no introdujeron estrés, que pudiera contribuir en el desarrollo y severidad de la infección en los animales, como ha sido reportado previamente en otras concentraciones salinas (22, 23). Otro factor que pudiera influir es la capacidad genética de resistencia a IHNV de *L. vannamei* tal como ha sido reportado por Bell and Lightner (1984) (17). Experimentos realizados por Kalagayan, et al. (1991) (10) demostraron que más del 70% de los camarones con crecimiento normal eran positivos para el IHNV, presentando crecimiento aceptable y siendo asintomáticos para el síndrome de deformación del rostro, demostrando que la infección con IHNV no explica por sí sola la presencia de la deformación de rostro sino

que son necesarios otros cofactores. Estudios previos han demostrado que bajo condiciones naturales, la enfermedad con IHNV no es una causa significativa de mortalidad de larvas y juveniles de *L. vannamei* (Kalagayan, et al., 1991) (10). Sin embargo la detección del virus es importante ya que transmisores resistentes, podrían ser residentes del virus el cual pudiera mutar en una cepa patógena (1). Por lo tanto es evidente que la transmisibilidad y detección del IHNV es importante a fin de controlar la diseminación del mismo.

Conclusiones

Utilizando la técnica de inyección fue posible la transmisión del virus IHNV de camarones portadores a camarones sanos.

Las muestras de hemolinfa mostraron los porcentajes de positividad más altos al utilizar tanto la técnica de hibridación con dot blot y PCR, mientras que las muestras de homogeneizado fueron más específicas utilizando la PCR. No se detectó influencia de la salinidad en la expresión de la enfermedad.

Se propone el uso de la hemolinfa con el método de hibridación en "dot blot", como método más eficiente para la detección de IHNV. En las muestras de homogeneizado y tejido la detección con PCR resultó ser más efectiva.

Agradecimiento

El presente trabajo fue financiado por Harbor Branch Oceanographic Institution (HBOI).

Referencias Bibliográficas

1. LOTZ J.M. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 405-412, 1997.
2. LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. *Aquaculture* 164: 201-220, 1998.
3. ALVAREZ J.D., AGURTO C., OBREGÓN J., PEROZA L. *Revista Científica, FCV-LUZ*, XIII: 255-262, 2003.

4. MELENA J. **Cenaim informa** 130(15): 1-2, 2005.
5. TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., LIGHTNER D.V. **Aquaculture** 190: 203-210, 2000.
6. BONAMI J-R., TRUMPER B., MARY J., BERLÍN M., LIGHTNER D.V., **Journal of General Virology** 71: 2657-2664, 1990.
7. ALCIVAR-WARREN A., OVERSTREET R.M., DHAR A.K., ASTROFSKY K., CARR W.H., SWEENEY J., LOTZ J.M. **Journal of Invertebrate Pathology** 70: 190-197, 1997.
8. BONNICHON V., LIGHTNER D.V., BONAMI J-R., **Disease Aquatic Organisms** 72: 179-184, 2006.
9. LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., BELL T.A. **Journal of Invertebrate Pathology** 42: 62-70, 1983.
10. KALAGAYAN H., GODIN D., KANNA R., HAGINO G., SWEENEY J., WYBAN J. **Journal of the World Aquaculture Society** 22: 235-243, 1991.
11. BELL T.A., LIGHTNER D.V., BROCK J. **Journal of Aquatic Animal Health** 2: 151-153, 1990.
12. TANG K. F.J., LIGHTNER D.V. **Diseases of Aquatic Organisms** 44: 79-85, 2001.
13. VANPATTEN K.A., NUNAN L., M.; LIGHTNER D.V. **Aquaculture** 241: 31-46, 2004.
14. LIGHTNER D.V. (Ed.). **A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp**. World aquaculture society, Baton Rouge, LA (USA), pp. 305, 1996.
15. YUE Z-Q., LIU H., WANG W-J., LEI Z.W., LI-ANG C-Z., JIAN Y-L. **Journal of AOAC international** 89: 240-244, 2006.
16. TANG K., NAVARRO S., LIGHTNER D. **Disease of Aquatic Organisms** 74: 165-170, 2007.
17. BELL T.A., LIGHTNER D.V. **Aquaculture** 38: 185-194, 1984.
18. CARR W.H., SWEENEY J.N., NUNAN L., LIGHTNER D.V., HIRSCH H.H., REDDINGTON J.J. **Aquaculture** 147: 1-8, 1996.
19. KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I. **The ICLARM Quartely** 21: 26-30, 1998.
20. TANG K.T.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., PANTOJA C., LIGHTNER D.V. **Aquaculture** 190: 203-210, 2000.
21. BRAY W.A., LAWRENCE A.L., LEUNG-TRUJILLO J.R. **Aquaculture** 122: 133-146, 1994.
22. BROWDY C.L., HOLLOWAY J.D., KING C.O., STOKES A.D., HOPKINS J.S., SANDIFER P.A. **Journal of Crustacean Biology** 13: 87-94, 1993.
23. BELL T.A., LIGHTNER D.V. **Journal of Fish Disease** 10: 165-170, 1987.