

Dinámica de transmisión de virus de la mancha blanca en estanques de cultivo de camarón.

Jorge Hernández-López¹, Daniel Eduardo Coronado Molina¹, Álvaro Santos Romo¹ y Teresa Gollas Galván²

¹Unidad Hermosillo, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Hermosillo, Sonora, México, jhlopez04@cibnor.mx

Resumen: Se realizó una prueba en estanques de camarones infectados con el virus de la mancha blanca (WSSV). Organismos sanos se introdujeron en jaulas y se analizaron con pruebas moleculares. Los camarones del ensayo y el agua se analizaron diariamente, se demostró que cuando el plancton presenta WSSV, este puede transmitir el virus a camarones sanos. Los resultados obtenidos en este trabajo aportaron evidencias para suponer que la vía de dispersión del WSSV es a través del plancton. **Palabras clave:** WSSV, camarón, PCR, plancton.

Abstract: A test was conducted in ponds of shrimp infected with white spot virus (WSSV). Healthy organisms were placed in cages and analyzed with molecular tests. The shrimp in the test and the water were analyzed daily, it was shown that when the plankton presents WSSV, it can transmit the virus to healthy shrimp. The results obtained in this work provided evidence to suppose that the way of dispersion of the WSSV is through the plankton. **Key words:** WSSV, shrimp, PCR, plankton.

que pueden albergar al virus y actuar como reservorios. El agente causal del síndrome de la mancha blanca (WSSV) es un virus que mide entre 70-150 nm y con base en las características morfológicas y su estructura genómica, se ha definido como miembro de la familia Nimaviridae que comprende un solo género llamado Whispovirus. La única forma de prevenir la infección por WSSV es disminuir las posibilidades de transmisión entre los organismos cultivados en la misma granja o en granjas cercanas. Algunas hipótesis de potencial transmisión son: 1) que el virus se encuentre en organismos silvestres cercanos a las granjas y se introduzca en los estanques, 2) que esté en algún organismo, en la porción del plancton, que pueda actuar como portador, o 3) que se encuentre en los organismos que componen el fondo de los estanques y permanezca de un ciclo de cultivo a otro. En este trabajo se demostró la transmisibilidad de WSSV por plancton y se generó una metodología para el monitoreo y la vigilancia epidemiológica de la transmisión del virus en los cultivos de camarón.

Usuarios: El Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), los comités de sanidad acuícola de los estados y la industria acuícola en general.

Área 6: Biotecnología y Ciencias Agropecuarias.

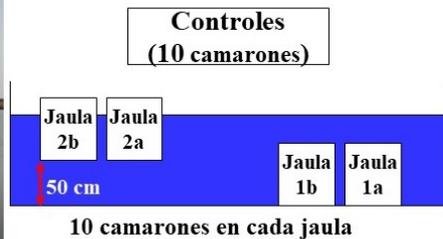


Figura 1: Esquema que muestra la distribución de las jaulas en el bioensayo para definir si los organismos de la columna de agua (plancton) participan en la transmisión del WSSV.

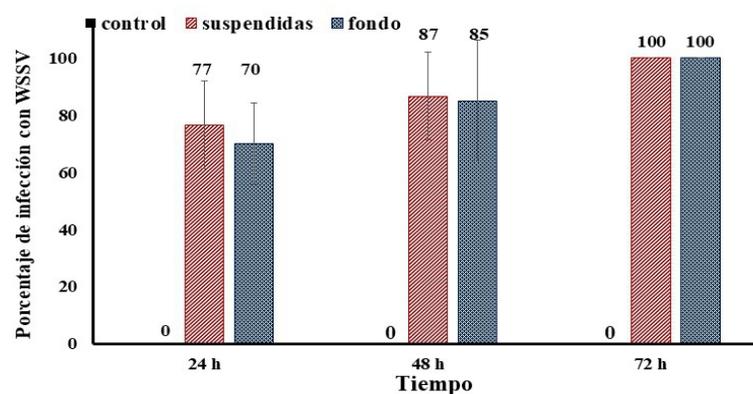
Introducción: La aparición de enfermedades en los cultivos acuícolas depende del desequilibrio entre el ambiente, el hospedero y el patógeno; la prevención es la mejor alternativa, donde se busca eliminar el patógeno del sistema de producción o evitar los efectos de la infección reduciendo la transmisión entre los individuos del estanque. Sin embargo, cuando la prevención falla, las medidas correctivas requieren del conocimiento sobre la dinámica de la infección presente. El principal problema que enfrenta el cultivo de camarón es la aparición de enfermedades. Una de las causas de mortalidad más agresivas es la enfermedad de las manchas blancas que causa pérdidas económicas millonarias en la industria a nivel mundial, por lo que es prioritario encontrar estrategias para disminuir estas pérdidas. La enfermedad de las manchas blancas en camarón parece ser una infección viral que aprovecha una situación de estrés para infectar camarones y se manifiesta con letargia, coloración rojiza, anorexia, nado en la superficie del agua y muerte en horas o en pocos días. La mortalidad puede alcanzar hasta el 100% de los organismos infectados. Además de su virulencia, el WSSV se caracteriza por ser poco específico en cuanto a la capacidad de invadir y dañar diversos tejidos (Chang, Lo, Wang & Kou 1996) y tiene un amplio espectro de hospedadores,

Objetivos: Definir la participación del plancton en la transmisibilidad del WSSV e implementar una técnica para la detección del virus en el agua de cultivo.

Materiales y Métodos. Se colocaron, en un estanque con infección activa por WSSV, jaulas de 1 m³ con malla de 300 µ donde no era posible la entrada de camarones del estanque. Para mantener la misma densidad de organismos que en el estanque, en cada jaula se colocaron 10 camarones de 8g, previamente analizados por PCR para asegurar la ausencia de WSSV. Se utilizaron seis jaulas, 3 colocadas en suspensión a 50 cm del fondo y 3 fijadas al fondo de tal manera que se tuviera contacto con el sedimento (figura 1). Se colocó un grupo de 10 organismos de un acuario conteniendo agua de un estanque sin presencia de WSSV como control. El 100% de los organismos de las jaulas y del control se analizaron diariamente, de manera individual. Se obtuvieron muestras de 0.2 ml de hemolinfa, con una jeringa de 1 mL conteniendo 400 µL de EDTA (10 mM) disuelto en solución salina (450 mM) de acuerdo a la metodología de Vargas-Albores y col. La hemolinfa se centrifugó y se usaron las células recuperadas para el análisis de PCR. De manera simultánea, se tomaron muestras de agua dentro de

cada jaula y fuera de ellas. Las muestras de agua se filtraron en malla de 100 micras y 20 ml del filtrado se pasaron a través de filtros con 0.45 micras de tamaño de poro para analizar la fracción más pequeña del plancton (entre 0.45 y 100 µ). Todos los filtros se fijaron en alcohol 96%, para su conservación. Los filtros fueron procesados para la extracción de ADN y se analizaron por PCR para buscar la presencia del WSSV. Todas las pruebas moleculares se realizaron en el laboratorio de la misma granja, reduciendo el tiempo de obtención de resultados a 8 horas después de tomada la muestra. Las muestras de plancton positivas a WSSV se comprobaron por secuenciación de los fragmentos amplificados. Para la secuenciación, las muestras se enviaron al laboratorio de la Universidad de Arizona, USA.

mayor a 100 micras, ni en los camarones. Es importante señalar que la cantidad de plancton se disminuyó significativamente en el estanque así como la densidad de camarones lo que permitió hipotetizar que la transmisibilidad del WSSV disminuyó de tal manera que los camarones sobrevivientes no se infectaron debido a la ausencia de plancton con virus. Sin embargo, debido a la necesidad de conocer si el virus se encontraba en tan baja concentración que no fuera posible detectarlo con las técnicas de muestreo usadas, pero que pudiera transmitirse a organismos sanos, se realizó un ensayo colocando nuevamente el sistema de jaulas con camarones sanos en el estanque. A los organismos introducidos se les tomaron muestras de hemolinfa diariamente durante 6 días, para detectar la presencia de WSSV.



	Camarones Analizados	1 Día	2 Días	3 Días	4 Días	5 Días	6 Días
Controles	10	0	0	0	0	0	0
Jaulas flotando	30	0	0	0	0	0	0
Jaulas fondo	30	0	0	0	0	0	0

Figura 2: Porcentaje de camarones infectados en las jaulas experimentales. A: durante la fase aguda de la infección en el estanque. B: Durante la fase de recuperación del mismo estanque.

Resultados y Discusión: Durante una investigación realizada en una granja de camarón con presencia de mortalidad por WSSV, se analizó la posibilidad de que el plancton fuera la causa de la transmisión. Se encontró la presencia de este patógeno en el sedimento y en la fracción del plancton mayor a 100 µ. Los resultados demostraron que los camarones, que no estaban en contacto directo con otros camarones infectados, pueden adquirir el WSSV presumiblemente a través de los organismos del plancton y del bentos en periodos tan cortos como 24 horas después de la exposición. Los resultados de PCR mostraron un 70-75% de infección en los camarones de las jaulas a las 24 h y 100% de infección a las 72 h post introducción, sin diferencias significativas (P<0.01) entre las jaulas que tenían contacto con el fondo de los estanques y las jaulas flotantes. Los controles experimentales, permanecieron negativos a WSSV al ser analizados por PCR durante el ensayo. El análisis de PCR del plancton dentro y fuera de las jaulas mostró la presencia del virus tanto en las fracciones mayores a 100 micras como en las mas pequeñas (0.45 a 100 micras), así mismo, se detectó que la fracción del zooplancton no solo mantiene al WSSV de manera pasiva sino que puede replicarlo aumentando la carga viral en la transmisión. Después de la tercer semana de muestreo el WSSV pudo ser detectado en las muestras filtradas por 0.45 µ pero no en la fracción mayor de 100 µ, ni en los organismos de cultivo. Posterior a la cuarta semana de muestreo, sorpresivamente el virus no se encontró ni en las fracciones pequeñas del plancton (entre 0.45 micras y 100 micras), ni tampoco en la fracción

Ningún organismo de las jaulas ni de los controles presentaron signos de enfermedad y los análisis de PCR resultaron negativos a WSSV. Las muestras de plancton, positivas por PCR a WSSV mostraron un 100% de identidad con la secuencia reportada para WSSV (numero de acceso: AF332093.1). Los resultados obtenidos en este trabajo aportan evidencias de que la vía de transmisión y dispersión de WSSV es a través de los microorganismos del plancton. En el desarrollo de este trabajo se generó una tecnología que permite analizar la presencia de WSSV en agua, filtrando a través de membranas de 0.45 micras, así como la posibilidad de comprobar la infectividad del agua de cultivo de un estanque mediante el empleo de jaulas conteniendo camarones libres del virus, mediante la obtención de una muestra de hemolinfa, sin la necesidad de sacrificar los camarones analizados.

Impacto socioeconómico: Los resultados de este estudio aportan elementos de apoyo al sector productivo en la toma de decisiones para el manejo sanitario de sus unidades de producción. El conocer la presencia de WSSV en plancton, aun antes de que se presenten signos de la enfermedad, permitirá tomar medidas preventivas para evitar la dispersión del virus en el cultivo particular y entre las granjas de una zona de cultivo, lo que permitirá reducir las pérdidas económicas por mortalidades causadas por WSSV en las granjas de camarón.