

Ensayo para determinar la influencia del mantenimiento de camarones silvestres a 29° C sobre la infección con el virus de la mancha blanca

M. C. Juliana Righetto Moser**
pBiol. Diego Galván Álvarez*
Dr. Francisco Magallón Barajas*
Dr. Jorge Hernández López*

*Centro de Investigaciones Biológicas el Noroeste, Hermosillo, México

**Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

De acuerdo con algunos autores (Rahman et al., 2007; Jiravanichpaisal et al., 2006; Guan et al., 2003; Vidal et al., 2001) la temperatura tiene influencia sobre la replicación del virus de la mancha blanca (WSSV). Las evidencias indican que temperaturas mayores de 32° C impiden que el WSSV se replique y los camarones se mantienen sin signos aparentes de la enfermedad. Sin embargo, investigaciones recientes (Rahman et al., 2007) han encontrado que existen temperaturas que permiten una mayor replicación viral y por lo tanto la dispersión del mismo en los tejidos produciendo graves daños que pueden concluir en la muerte de los camarones infectados, estas temperaturas van de 27 a 30° C. Por otro lado, los organismos mantenidos a temperaturas menores de 27° C parecen comportarse como portadores sanos (Rahman et al., 2007)

En este año el 100% de las granjas de la costa de Hermosillo tuvieron infecciones por WSSV. Después de la cosecha en algunas granjas de la costa de Hermosillo se han detectado camarones en los canales de salida los cuales se encuentran a una temperatura promedio de 20° C, estos camarones han sido analizados para buscar la presencia de WSSV pero los resultados han resultado negativos en todos los casos.



En los últimos 3 años, el Dr. Francisco Magallón, investigador del CIBNOR y miembro activo del proyecto AERI, ha trabajado con el tema de las temperaturas como posible detonante de la infección por WSSV. El Dr. Magallón ha generado datos que indican que los organismos, aparentemente sanos, pero que tienen el virus latente, pueden desarrollar signos de enfermedad cuando se mantienen a temperaturas entre 26 y 30°C. En noviembre del 2010, se observó, mientras se analizaban camarones aparentemente sanos colectados en la zona de cruz de piedra, los cuales serían usados para un ensayo de infección por WSSV, dieron positivo al análisis de WSSV por PCR en tiempo real cuando se mantuvieron a temperaturas de $29 \pm 0.1^\circ\text{C}$ en las instalaciones del CIBNOR campus Hermosillo.

Con base en lo anterior, es necesario probar la idea de que organismos mantenidos a temperaturas menores de 27°C pudieran contener el virus pero este no se manifieste, dificultando el diagnóstico, con lo que se podría estar manteniendo el virus en las poblaciones silvestres con posibilidad de que pueda ingresar al sistema de estanques para el siguiente ciclo o bien que los organismos portadores sanos puedan dispersar el virus a otros organismos del medio ambiente en los que se pudiera mantener y dispersar en los estanques en el proceso de llenado. Para ello, el COSAES solicitó al CIBNOR que se realizara un ensayo donde organismos vivos, aparentemente sanos, capturados en canales de salida de algunas granjas fueran colocados a temperatura de 29°C y determinar si esta condición pudiera hacer patente la infección por WSSV.



Metodología

Se capturaron organismos en los canales de salida de 4 sitios diferentes de la costa de Hermosillo, los cuales mantuvieron una temperatura promedio de 21° C. Los camarones fueron transportados en hieleras hasta las instalaciones de la Unidad Sonora del CIBNOR, campus Hermosillo. Se eligieron al azar 30 organismos y se colocaron en grupos de 10, constituyendo 3 replicas, se colocaron calentadores para mantener la temperatura a 29° C, se mantuvieron durante 3 días y se registró la mortalidad. El resto de los organismos se mantuvo en la hielera de transporte original a 21° C. Antes de iniciar el ensayo, se tomaron muestras de organismos al azar y se midió la presencia de WSSV.

Después de 3 días de mantenimiento a 29° C, de todos los organismos sobrevivientes se tomó un pleopodo y se analizaron por PCR de punto final, junto con los camarones muertos, buscando la presencia de WSSV, repitiendo el muestreo a los 3 y 6 días. Los organismos donde se detectó WSV se analizaron por PCR cuantitativo (qPCR) para calcular el número de copias del virus en los mismos.

El análisis de PCR en punto final fue realizado utilizando una mezcla reactiva comercial conteniendo Sybr-Safe y primers diseñados para amplificar un fragmento del gen de la proteína VP28 del WSSV. Mientras que para el análisis de qPCR se utilizó el kit comercial de IQREAL.



Resultados

En el cuadro 1 se muestra la ubicación de los sitios de muestreo, indicando en cada caso, las condiciones ambientales.

El análisis de PCR previo al mantenimiento de los camarones a 29° C manifestó ausencia del virus. Sin embargo, tres días después del inicio del ensayo se detectaron organismos positivos a WSSV en los camarones a 29° C (figura 1). Aunque con una carga muy baja (menos de 10 copias/ μ L) (Tabla 2), también en los organismos mantenidos a 21° C se presentaron camarones positivos a WSSV (Figura 2).

Tabla 1: Localidades de muestreo

LOCALIDAD	TINAS	número de camarones/tina	Temperatura promedio
San Nicolás	Tina 1	21	19°
	Tina 2	21	19°
	Tina 3	21	19°
Cardonal	Tina 4	25	19°
	Tina 5	25	19°
	Tina 6	25	19°
Tastiota Dren acuanova	Tina 7	20	19°
	Tina 8	20	19°
	Tina 9 (estero)	9	19°



Cuando se analizaron los organismos positivos con la técnica de qPCR, se pudo comprobar que los camarones presentaron una diferencia significativa en la severidad de la infección entre las localidades analizadas (tabla 2) encontrándose algunas muestras con concentraciones mayores que los controles positivos del kit usado (Figura 3).

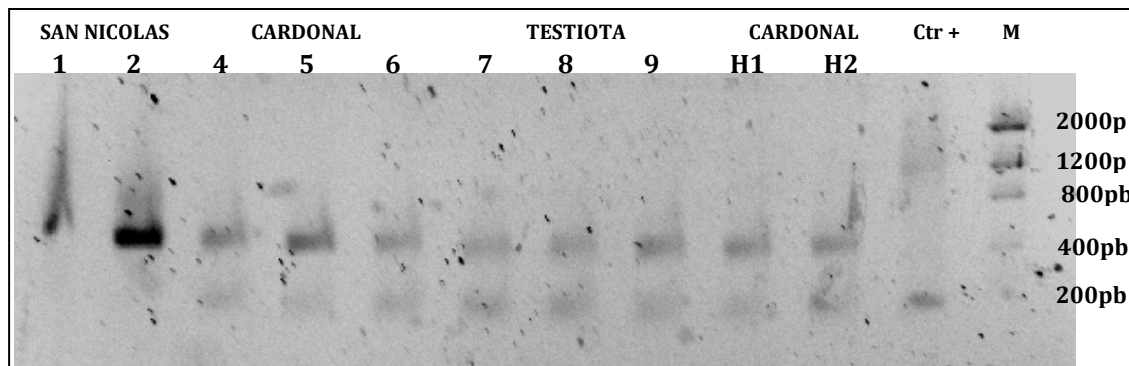


Figura 2: Gel en agarosa 1.2% con productos de las análisis de PCR en tiempo real (ORF94) de las muestras seleccionada en cada una de las tinas (Tiempo2).



Tabla 2: Numero de copias virales en las muestras analizadas de camarones mantenidos a 29°C.

LOCALIDAD	TINAS	número de camarones/tina	Resultado PCR para WSSV antes del bioensayo	No. de copias/μL de WSSV en camarones a 29°C/3 días
San Nicolás	Tina 1	21	ND	5.8 x 10 ⁶
	Tina 2	21	ND	1.07 x 10 ⁶
	Tina 3	21	ND	Menos de 10
Cardonal	Tina 4	25	ND	Menos de 10
	Tina 5	25	ND	Menos de 10
	Tina 6	25	ND	Menos de 10
Tastiota Dren acuanova	Tina 7	20	ND	Menos de 10
	Tina 8	20	ND	Menos de 10
	Tina 9 (estero)	9	ND	Menos de 10

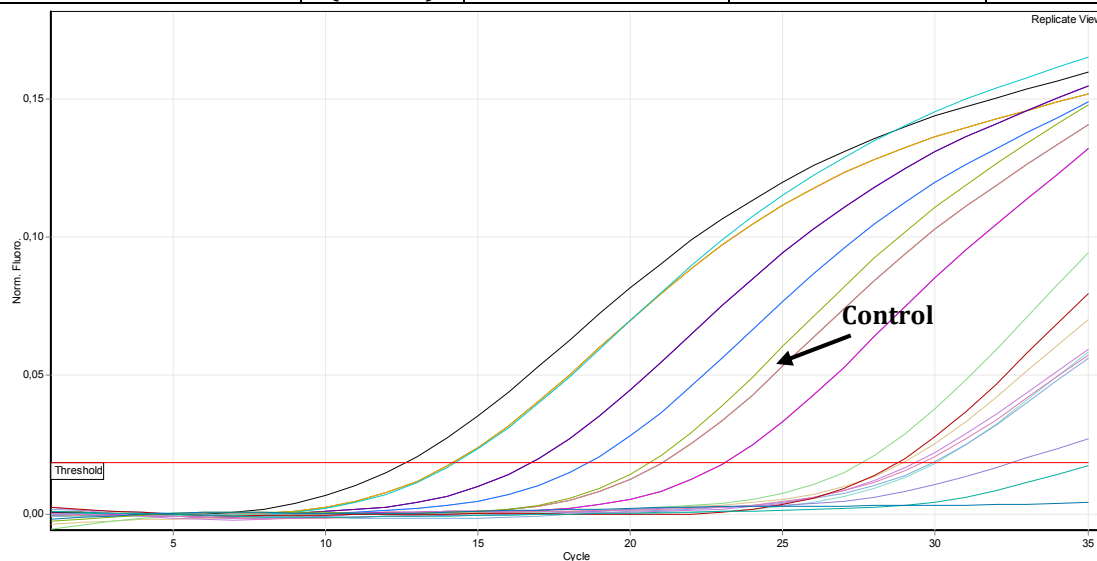


Figura 3: Análisis de PCR en tiempo real de las muestras seleccionada en cada una de las tinas tres días después del primera análisis (Tiempo2). Todos los pools de camarones resultaron positivos al análisis para mancha blanca (WSSV).



El ensayo continuó hasta los 6 días. Los resultados pueden apreciarse en la tabla 3, donde se observa que la infección por WSSV se mantiene en los camarones a 29°C, con una intensidad alta en la localidad de San Nicolás y muy baja en las otras dos localidades. La misma baja intensidad de la infección se puede observar en los camarones mantenidos a 20°C.

En el día 6 del ensayo también se buscó la presencia de WSSV en el agua de las tinas, para lo cual se usó la técnica de filtración a través de filtros de 0.45 µm. Se detectó la presencia de WSSV en el agua donde se mantuvieron los camarones capturados en la localidad de San Nicolás.(tabala3).

Tabla 3: Resultados de qPCR para WSSV de camarones mantenidos a 29°C durante 6 días.

LOCALIDAD	TINAS	día 0	día 3	día 6	Intensidad WSSV en el agua (filtros) (día 6)
San Nicolás	Tina 1	-	+	+	55 copias/ µL
	Tina 2	-	+	n/d*	499 copias/ µL
	Tina 3	-	+	n/d*	83 copias/ µL
Cardonal	Tina 4	-	+	n/d*	-
	Tina 5	-	+	+	-
	Tina 6	-	+	+	-
Testiota	Tina 7	-	+	+	-
	Tina 8	-	+	+	-
	Tina 9 (estero)	-	+	n/d*	-
	hielera 1	-	+	+	-
	hielera 2	-	+	+	-

* Todos los animales de la tina murieron a los 3 días.



Para comprobar que el agua de las tinas donde se encontró evidencias de WSSV era infectiva, se colocaron 5 organismos sin signos y negativos a WSSV, en la tina 2 de San Nicolás y se mantuvieron durante 2 días. Después del ensayo, se analizaron las branquias y los pleópodos de los organismos, detectando una carga de 138 copias / μL en branquias pero no se encontró evidencias de WSSV en pleópodos.

Finalmente, los organismos sobrevivientes durante 6 días a 29°C y positivos a WSSV se mantuvieron durante 0, 3 y 6 días adicionales a 20°C. Los resultados indican una reversión de la replicación viral de tal intensidad que a los 6 días en ninguno de los organismos se pudo demostrar la presencia de WSSV.(tabla 4).

Tabla 4: Resultados de qPCR para WSSV de camarones mantenidos a 20°C durante 6 días adicionales después del ensayo a 29°C.

LOCALIDAD	TINAS	día 3	día 6	día 8	Intensidad WSSV (día 3)
San Nicolas	Tina 1	+	n/d*	n/d*	1.16×10^4 copias/ μL
Cardonal	Tina 5	+	-	-	3.9×10^5 copias/ μL
	Tina 6	+	-	-	3.7×10^5 copias/ μL
Testiota	Tina 7	+	-	-	7,8 copias/ μL
	Tina 8	-	-	-	

* Todos los animales de la tina murieron a los 3 días.

Un lote adicional de organismos que incluyó Camarón y Jaiba, fue analizado con esta misma metodología, mantenido a 29°C durante 6 días. Los resultados en todos los casos fueron Negativos para WSSV usando qPCR.



Discusión

La infección por WSSV depende de variables inherentes al patógeno como concentración y virulencia de la variedad genética del virus (Zwart et al., 2010), sin embargo, parece ser que la severidad del proceso infeccioso se debe a factores ambientales que pueden, por una parte aumentar la susceptibilidad del hospedero y por otra el proceso de replicación viral (Rahman et al., 2007), uno de estos factores es la temperatura.

Así, se ha detectado que existen intervalos de temperaturas que pueden mantener al virus en estado “latente” (15 a 22° C) (Rahman et al., 2007), mientras que temperaturas mayores de 31° C mantienen un bajo índice de replicación viral (Rahman et al., 2007). Por otro lado, temperaturas entre 22 y 30° C permiten la replicación del WSSV de manera alarmante en los camarones infectados y mantenidos a estas temperaturas (Jiravanichpaisal et al., 2006) con lo que se presentan mortalidades elevadas en los estanques de cultivo.



En el Estado de Sonora, los cultivos de camarón sufren cambios de temperatura a lo largo del ciclo de cultivo, los cuales pasan por los intervalos de temperatura citados con anterioridad. Durante el presente año (2010) se presentaron casos de WSSV en los cultivos de camarón y la totalidad de las granjas realizó sus cosechas con casos activos de WSSV. Los resultados negativos para la presencia de WSSV en los organismos analizados, indica o que el virus no se detectó o que realmente los organismos no se encuentran infectados. La duda de si el virus se encontraba en forma “latente” fue resuelta en este trabajo mediante el mantenimiento de organismos silvestres, detectados como negativos a temperatura de 20° C pero positivas a WSSV cuando se mantuvieron durante 3 días a 29° C.

Aunque este resultado implica la probabilidad de que los organismos silvestres presentan el virus pero este no se manifiesta debido a que la temperatura baja no permite una replicación adecuada del mismo, es necesario realizar otro tipo de ensayos para definir si efectivamente la temperatura influye en la velocidad de replicación de WSSV o lo que hace es mantener en mejores condiciones el sistema inmune del camarón de tal suerte que el mismo hospedero mantiene al virus sin que este pueda prosperar.



Adicionalmente, los resultados de la cuantificación viral en los organismos analizados indican una velocidad de replicación diferencial de acuerdo a la zona de procedencia. Esto puede deberse a que en cada zona se encuentren organismos infectados por diferentes variedad de WSSV o que los organismos en cada una de estas zonas presentan diferente grado de resistencia o susceptibilidad al virus.

De la misma forma que para lo analizado en el párrafo anterior, este resultado no permite concluir definitivamente cuál de estas hipótesis es la correcta, pero una de las más cercanas es la relacionada con la presencia de variedades de WSSV, de acuerdo a lo reportado por Galaviz-Silva et al., (2004). Las muestras de los organismos positivos a WSSV serán analizados utilizando el fragmento del ORF94 con lo que se definirá si esta hipótesis es verdadera, sin que esto elimine la posibilidad de que varias de estas hipótesis sean validas y el efecto observado sea la suma de todas ellas.

Uno de los resultados más sorprendentes fue el hecho de que no se haya detectado el WSSV en los organismos, previamente positivos, después de 3 días adicionales mantenidos a 20°C. Esto comprueba la hipótesis de que la temperatura juega un papel importante en el nivel de replicación viral.

La prueba contundente de que la infección por WSSV se hace evidente a 29°C fue el hecho de que camarones sanos, colocados en el acuario donde se mantuvieron los camarones positivos y donde el análisis del filtrado de agua fue positivo, pudieron infectarse en 2 días



Protocolo para el análisis de WSSV en organismos vivos mantenidos a 29°C

De la experiencia obtenida en los ensayos discutidos en este documento, se diseñó un protocolo que permitirá aumentar la seguridad en el análisis de organismos “aparentemente sanos” (sin signos de enfermedad y negativos a WSSV por PCR) para el diagnóstico de la presencia del WSSV.

1. Los organismos deberán capturarse y enviarse vivos al laboratorio de prueba.
2. Al momento de ingresar al laboratorio Se distribuirán al azar, en 3 grupos de 10 organismos (si el número de muestra es menor a 30, dividir en 3 cantidades iguales de organismos)
3. Antes de elevar la temperatura, tomar muestra, de hemolinfa de manera individual, de los organismos pero se analizará en grupos de 5 para determinar la presencia o ausencia de WSSV (tiempo 0).
4. Mantener los organismos a 29°C durante 3 días y después volver a tomar una muestra de hemolinfa de la misma forma que en el inciso anterior.
5. Si alguno de los grupos genera resultado positivo para WSSV, se analizará de manera individual para determinar el porcentaje de infección. Si el análisis de PCR se realiza utilizando PCR de tiempo real (qPCR) entonces se puede analizar el nivel de infección y calcular la carga viral en cada organismo.



Referencias.

1. Galaviz-Silva, L., Molina-Garza, Z. J., Alcocer-Gonzalez, J. M., Rosales-Encinas, J. L., Ibarra-Gamez, C. 2004. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. *Aquaculture* 242:53–68.
2. Guan, Y., Yu, Z., Li, C. 2003. The effects of temperature on white spot syndrome virus infections in *Marsupenaeus japonicus*. *J. Invertebr. Pathol.* 83:257–260.
3. Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, K., Söderhäll, I. 2006. Characterization of white spot syndrome virus replication in in vitro-cultured haematopoietic stem cells of freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *J. Gen. Virol.* 87:847–854.
4. Rahman, M. N., Corteel, M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Pensaert, M. B., Sorgeloos, P., Nauwynck, H.J. 2007. The effect of raising water temperature to 33 °C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 272:240–245.
5. Vidal, O. M., Granja, C. B., Aranguren, F., Brock, J. A., Salazar, M. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquacult. Soc.* 32:364–372.
6. Zwart, M. P., Dieu, B. T. M., Hemerik, L., Vlak, J. M. 2010. Evolutionary trajectory of white spot syndrome virus (WSSV) genome shrinkage during spread in Asia. *PLoS ONE* 5:e13400.

