



ALLIANCE™

(<https://gsa.rakadev.com>).



**Responsible
Seafood**
ADVOCATE



Health &
Welfare

Estudio de co-infección de WSSV y Vibrio parahaemolyticus

2 December 2019

By Jee Eun Han, DVM, Ph.D. , Ji-Eun Kim, MS , Hayun Jo, MS , Jong-Su Eun, Ph.D. , Chorong Lee, Ph.D. , Ji Hyung Kim, Ph.D. , Kyeong-Jun Lee, Ph.D. and Jae-Won Kim, Ph.D.

Los resultados muestran un factor de riesgo para AHPND en camarones blancos del Pacífico



Los resultados de este estudio demostraron que los camarones expuestos inicialmente a WSSV permiten que VpAHPND cause una mortalidad más rápida y mayor que en camarones infectados solo con VpAHPND. Foto de Fernando Huerta.

La enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), causada por cepas específicas de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}), se ha reportado en camarones cultivados en el sudeste asiático y América desde 2009. Los signos clínicos de la enfermedad incluyen hepatopáncreas (HP) atrofiado, un tracto gastrointestinal vacío, una apariencia lechosa del estómago y letargo. Esta enfermedad bacteriana ha causado hasta un 100 por ciento de mortalidad en las poblaciones de camarones blancos del Pacífico (*Penaeus vannamei*) y camarón tigre negro (*P. monodon*), y las pérdidas económicas colectivas debido a AHPND y otras enfermedades del camarón se estiman en \$ 23.6 mil millones a nivel mundial, con una pérdida adicional de \$ 7 mil millones en ventas de alimentos.

En algunos casos, se ha informado de Vp_{AHPND} en co-infección con el microsporidio formador de esporas *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). Aunque la EHP no parece causar mortalidad, los animales infectados con EHP serían más vulnerables a la AHPND, lo que puede causar una mortalidad sustancial en los estanques de camarones. Y los camarones infectados con EHP tienen una mayor susceptibilidad a Vp_{AHPND}, lo que sugiere que los camarones debilitados por EHP sucumbirían a patógenos secundarios, como Vp_{AHPND}.

Durante varios años, el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) se ha extendido por todo el mundo en gran parte de Asia, América, Europa, África, Oriente Medio y Australia. En algunos casos, se ha detectado WSSV en animales sanos sin síntomas clínicos o mortalidad, lo que indica que la infección por WSSV no necesariamente resulta en una alta mortalidad, y la infección secundaria por patógenos oportunistas, como *Vibrio* spp., aceleraría el inicio de la enfermedad.

En 2017, se reportaron tasas de mortalidad de *P. vannamei* de hasta el 60 por ciento en Filipinas. Los camarones exhibieron signos clínicos de AHPND, pero la PCR confirmó que eran positivos tanto para Vp_{AHPND} como para WSSV. A partir de este caso, planteamos la hipótesis de que la infección por WSSV

sin síntomas clínicos permitiría que Vp_{AHPND} causara una mortalidad más rápida y mayor en los camarones cultivados en estanques que aquellos infectados solo con Vp_{AHPND} .

Este artículo, adaptado y resumido del original, informa sobre un estudio diseñado para apoyar esta hipótesis simulando la co-infección con WSSV y Vp_{AHPND} en camarones *P. vannamei* juveniles en condiciones de laboratorio. Como resultado, demostramos que los camarones expuestos inicialmente a WSSV fueron fácilmente infectados por Vp_{AHPND} , pero apenas se recuperaron de la enfermedad según el examen de histopatología. Además, utilizando el ensayo qPCR y la inmunohistoquímica [IHC; la aplicación más común de inmunotinción, que implica el proceso de identificación selectiva de antígenos (proteínas) en las células de una sección de tejido usando la unión de anticuerpos específicamente a antígenos en el examen de tejidos biológicos, determinamos que la infección por WSSV podría ser acelerada por la infección secundaria por Vp_{AHPND} .

Este trabajo fue apoyado por la subvención de la Fundación Nacional de Investigación de Corea (NRF) financiada por el gobierno de Corea (MSIT) (número de subvención NRF-2018R1C1B5086350).

Configuración del estudio

Postlarvas de *P. vannamei* se obtuvieron de una granja de camarones local (Provincia de Jeju, Corea del Sur) y se transportaron al Instituto de Ciencias Marinas de la Universidad Nacional de Jeju en Corea del Sur. Los camarones se criaron hasta un peso promedio de 0.5 ± 0.05 gramos en tanques de mantenimiento de 96 litros con agua de mar artificial aireada a una salinidad de 25 a 28 grados-C y 30 ppt. Para el experimento de co-infección, se seleccionaron al azar camarones juveniles (promedio 0.5 gramos, $N = 80$) de los tanques de mantenimiento y se distribuyeron en tanques experimentales. Antes del experimento de co-infección, se seleccionaron al azar camarones representativos y se confirmó por PCR que eran negativos tanto para WSSV como para Vp_{AHPND} .

Para las poblaciones de WSSV, se recolectaron *P. vannamei* moribundos, con manchas blancas en sus cutículas, de una granja anónima de camarones en la Provincia de Chungcheong, ubicada en la costa occidental de Corea. Para las bacterias Vp_{AHPND} , la cepa 13-028/A3 se aisló previamente del estómago de *P. vannamei* moribundos de una granja en Vietnam y que tenían hepatopáncreas (HP) blanquecinos.

Para obtener información detallada sobre los diseños experimentales para la co-infección por WSSV y Vp_{AHPND} ; ensayos de qPCR; examen IHC de los tejidos branquiales; examen histopatológico de los tejidos de HP; y análisis estadísticos, consulte la publicación original.

Resultados y discusión

Estudiamos la co-infección con WSSV y Vp_{AHPND} en camarones *P. vannamei* juveniles en condiciones de laboratorio, y las tasas de mortalidad se compararon con grupos de infección únicos.

Nuestros resultados mostraron que la co-infección aceleró la mortalidad de camarones en comparación con la infección única (Fig. 1). Observamos un 0 por ciento de mortalidad en el Grupo 1 (solo WSSV), y la mortalidad acumulada fue del 50 por ciento en el día 4 después de la infección (p.i.) en el Grupo 2 (solo Vp_{AHPND}). Sin embargo, la tasa de mortalidad aumentó significativamente en el Grupo 3 (WSSV + Vp_{AHPND}) en comparación con los otros grupos ($p < .05$). En el Grupo 3, los camarones comenzaron a mostrar mortalidad en el día 2 p.i., y la mortalidad acumulada alcanzó el 75 por ciento en el día 3 p.i. Durante el período experimental de 10 días, no se observó mortalidad en el control negativo (Grupo 4, no cuestionado).

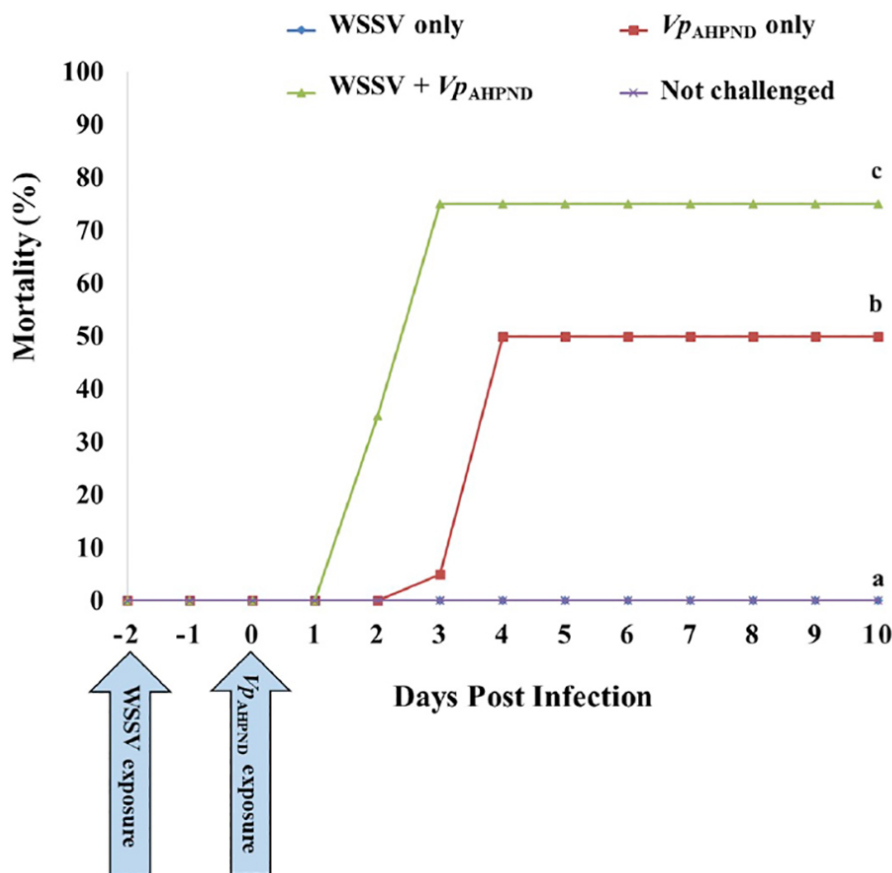


Fig.1: Mortalidad acumulada de *P. vannamei* después del desafío con WSSV y *Vp*_{AHPND} (Grupo 1: solo WSSV; Grupo 2: solo *Vp*_{AHPND}; Grupo 3: WSSV + *Vp*_{AHPND}; Grupo 4: no desafiado). La tasa de mortalidad aumentó significativamente en el grupo de co-infección (Grupo 3) en comparación con los grupos de infección única (Grupos 1 y 2). Diferentes letras indican diferencias significativas en la supervivencia al día de finalización (día 10) ($P < .05$).

Nuestros resultados también mostraron que la co-infección aumentó el nivel de infección por WSSV, que se confirmó mediante qPCR e IHC, y los niveles de infección por WSSV fueron notablemente diferentes entre el Grupo 1 (solo WSSV) y el Grupo 3 (WSSV + *Vp*_{AHPND}) en la terminación día (día 10). Según el análisis de qPCR, se detectó WSSV en camarones en el Grupo 3 (WSSV + *Vp*_{AHPND}) pero WSSV fue negativo en camarones expuestos únicamente a WSSV (Grupo 1). Además, mediante el examen IHC, la coloración marrón contra el citoplasma rosado y los núcleos morados, se observaron reacciones indicativas positivas para WSSV en los camarones del Grupo 3 (WSSV + *Vp*_{AHPND}) (Fig. 2D) similar a la muestra positiva para WSSV preparada previamente en el estudio preliminar (Fig. 2B). Sin embargo, estas reacciones positivas al WSSV no se observaron en los camarones expuestos al WSSV solo (Grupo 1; Fig. 2A) y el control negativo (Grupo 4, no desafiado; Fig. 2C).

La co-infección disminuyó la recuperación de la infección por *Vp*_{AHPND}. Todos los camarones experimentales mostraron síntomas clínicos típicos de AHPND, incluyendo HP pálido e intestino vacío, dentro de los tres o cuatro días posteriores a la infección en el Grupo 2 (solo *Vp*_{AHPND}) y el Grupo 3

(WSSV + Vp_{AHPND}), y la infección por Vp_{AHPND} fue confirmada por qPCR y el examen histopatológico. Del análisis qPCR, se detectó Vp_{AHPND} en camarones muertos recolectados tanto del Grupo 2 (solo Vp_{AHPND}) como del Grupo 3 (WSSV + Vp_{AHPND}) en los días 3 y 4.

Mediante un examen histopatológico, los camarones representativos tanto del Grupo 2 (solo Vp_{AHPND}) como del Grupo 3 (WSSV + Vp_{AHPND}) mostraron una fase terminal típica, caracterizada por infección bacteriana masiva y desprendimiento de células epiteliales del túbulo hepatopancreático a nivel de G3-4 (grado 4 es el más severo) en el día 3.

Fig. 2: Examen de inmunohistoquímica (IHC) de camarones infectados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). (A) Control negativo (Grupo 4): no hay células infectadas con WSSV en las branquias de *P. vannamei*. (B) Control positivo: células positivas para WSSV en branquias de *P. vannamei* infectados con tejido WSSV por el método de alimentación. (C) Control de WSSV (Grupo 1): no hay células infectadas con WSSV en las branquias de *P. vannamei* infectados con WSSV por el método de inmersión. (D) Infección por WSSV y Vp_{AHPND} (Grupo 3): células positivas para WSSV en branquias de *P. vannamei* pre-infectados con WSSV y sometidos a un desafío posterior con el patógeno secundario, Vp_{AHPND}. Contratinción de hematoxilina. Barra de escala: 40 µm.

Sin embargo, en el día de finalización (día 10), se observó una diferencia notable en la histopatología de HP del camarón sobreviviente entre el grupo 2 (solo Vp_{AHPND}) y el Grupo 3 (WSSV + Vp_{AHPND}). Los signos de histopatología de los sobrevivientes del grupo 2 (solo Vp_{AHPND}) tenían un HP de apariencia y funciones normales de las células B y R (Fig. 3B), lo mismo que el control negativo (Grupo 4, Fig. 3A).

Por el contrario, los sobrevivientes del Grupo 3 (WSSV + Vp_{AHPND}) mostraron signos típicos de histopatología AHPND en el HP, con infección bacteriana masiva y desprendimiento de células epiteliales del túbulo hepatopancreático de gravedad G4 (Fig. 3C).

Fig. 3: Examen de histopatología utilizando secciones de tejido fijadas con AFA de Davidson de camarones infectados con Vp_{AHPND}, en el día de terminación (Día 10). (A) Control negativo (Grupo 4): aspecto normal del hepatopáncreas. (B) Control AHPND (Grupo 2): aspecto normal del hepatopáncreas con función normal de las células B y R. (C) co-infección por WSSV y Vp_{AHPND} (Grupo 3): la fase aguda típica con necrosis progresiva y desprendimiento masivo de células epiteliales del túbulo hepatopancreático. Tinción de hematoxilina/eosina-floxina (H&E) de Mayer-Bennett. Barra de escala: 180 µm.

Las infecciones con múltiples patógenos (co-infección) son comunes en cultivos prácticos de camarones. Se han reportado varios casos de vibriosis de camarones con infección por WSSV en varias especies de peneidos en diferentes países. No ha habido un análisis detallado previo sobre el papel de estos patógenos en camarones co-infectados con WSSV y *Vibrio*. En las granjas de camarones, la infección por WSSV sin síntomas o mortalidad probablemente causa el debilitamiento de los camarones y podría desencadenar la infección por Vp_{AHPND}.

También observamos disminuciones en las enzimas anti-oxidantes y anti-peroxidativas en camarones infectados con Vp_{AHPND}, similar al WSSV en nuestro estudio en curso, y sospechamos que la infección por Vp_{AHPND} también puede haber comprometido a los animales, aumentando su susceptibilidad a otros patógenos en los estanques.

Las rutas intramusculares (IM) se han utilizado ampliamente para la infección experimental de camarones con WSSV. Sin embargo, la inyección IM no se ha considerado como una ruta de infección de Vp_{AHPND}. Además, la alimentación per os puede producir infección por WSSV y Vp_{AHPND}, pero este no es un método práctico para los experimentos de doble infección porque se suponía que los camarones experimentales se infectarían dos veces en intervalos cortos. Por lo tanto, para el bioensayo actual, seleccionamos el método de inmersión (a base de agua) para co-infectar los camarones con WSSV y Vp_{AHPND}. Los efectos sinérgicos influenciados por las mismas rutas de infección ya se han confirmado entre WSSV y *Vibrio* spp.

Perspectivas

Hasta donde sabemos, nuestro estudio es el primero en examinar la co-infección de WSSV y Vp_{AHPND} en condiciones de laboratorio. En los estanques, los camarones infectados con WSSV (u otros patógenos) no siempre mostraron signos clínicos o mortalidad. En esos casos, incluso los camarones

positivos al WSSV sin ningún síntoma clínico pueden causar una mortalidad más alta y rápida que sus contrapartes libres de enfermedad, y los camarones difícilmente se recuperarían de la enfermedad después de una infección secundaria, como Vp_{AHPND}.

Además, la infección secundaria provocaría la infección por WSSV o la replicación del virus, como se confirma en el presente estudio. Por lo tanto, los productores de camarones deben prestar atención al manejo de múltiples infecciones (WSSV u otros patógenos) en sus estanques para evitar mayores pérdidas en la producción de camarones.

Referencias disponibles en la publicación original.

Authors



JEE EUN HAN, DVM, PH.D.

Laboratory of Aquatic Biomedicine
College of Veterinary Medicine
Kyungpook National University
Daegu 41566, Korea

hanje1223@gmail.com (<mailto:hanje1223@gmail.com>).



JI-EUN KIM, MS

Institute of Integrated Technology
CJ CheilJedang, CJ Blossom Park
Suwon 16495, Republic of Korea



HAYUN JO, MS

Institute of Integrated Technology
CJ CheilJedang, CJ Blossom Park
Suwon 16495, Republic of Korea

**JONG-SU EUN, PH.D.**

Institute of Integrated Technology
CJ CheilJedang, CJ Blossom Park
Suwon 16495, Republic of Korea

**CHORONG LEE, PH.D.**

Department of Marine Life Sciences
Jeju National University
Jeju 63243, Republic of Korea

**JI HYUNG KIM, PH.D.**

Infectious Disease Research Center
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
Daejeon 34141, Republic of Korea

**KYEONG-JUN LEE, PH.D.**

Department of Marine Life Sciences
Jeju National University
Jeju 63243, Republic of Korea

**JAE-WON KIM, PH.D.**

Institute of Integrated Technology
CJ CheilJedang, CJ Blossom Park
Suwon 16495, Republic of Korea

Copyright © 2023 Global Seafood Alliance

All rights reserved.