

## **Artemia sp. como potencial vector de transmisión del virus de linfocistis (LCDV).**

**I. Cano<sup>1</sup>, J.B. Ortiz-Delgado<sup>1</sup>, E. García-Rosado<sup>2</sup>, B. López-Jimena<sup>2</sup>, M.C. Alonso<sup>2</sup>, D. Castro<sup>2</sup>, C. Sarasquete<sup>1</sup> y J.J. Borrego<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía. CSIC, Campus Universitario Río San Pedro, 11510-Puerto Real, Cádiz, España. e-mail: ireca@uma.es

<sup>2</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias. Campus Universitario Teatinos. Universidad de Málaga, España.

### **Resumen**

En el presente trabajo se han realizado estudios virológicos en distintos lotes de quistes comerciales de artemias utilizados como alimento de larvas de peces marinos en piscifactorías. Mediante nested-PCR se ha detectado genoma del virus de linfocistis (LCDV) en homogeneizados de quistes y nauplios de artemia. La existencia de partículas víricas infectivas en estos homogeneizados se ha demostrado mediante la aparición de efectos citopáticos en cultivos celulares. Los ensayos de hibridación *in situ* han demostrado la existencia del LCDV en artemias infectadas naturalmente, así como en artemias inoculadas mediante baño, sin observarse alteraciones morfológicas.

Las artemias actúan por tanto como bioacumuladores, pudiendo desempeñar un papel importante como reservorios ambientales de patógenos de peces. Estos resultados ponen de manifiesto el riesgo potencial de las artemias como fuente de patógenos víricos en estadios larvarios.

### **Abstract**

Potential risk of *Artemia sp* as a transmission vector of lymphocystis disease virus (LCDV).

Cysts and nauplii of *Artemia sp.* were analysed. Specific nested-PCR revealed lymphocystis disease virus (LCDV) genome. Infective viral particle has been observed by CPE development in inoculated cell cultures. Viral genome was found by *in situ* hybridization in nauplii and adults of natural infected artemia, as in nauplii of bath challenged artemia. No morphological damages have been observed.

*Artemia* is a bio-accumulator of fish pathogens, with a possible role as environmental reservoir of fish pathogens. These results have shown the risk of artemia as a source of viral pathogens to fish larvae.

### **Introducción**

El uso de artemias como alimento de larvas de peces marinos se encuentra ampliamente extendido en las piscifactorías de todo el mundo, debido tanto a sus ventajas nutricionales como a su fácil manejo y cultivo. Las mortalidades importantes de larvas y alevines de peces marinos cultivados se deben frecuentemente a infecciones de origen viral, como las causadas por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), el virus de la necrosis nerviosa vírica (VNNV o nodavirus) o el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV). La dorada (*Sparus aurata*, L.) es una de las especies más importantes dentro de la acuicultura mediterránea, siendo el virus de linfocistis (LCDV) una infección recurrente de etiología viral documentada (Borrego *et al.*, 2001).

Existen un gran número de incógnitas a cerca de las vías de transmisión de estos virus. Comps *et al.* (1991) apuntó que muchas infecciones virales se producen al comenzar la alimentación a base de zooplancton. Sin embargo aunque tradicionalmente se ha considerado a la artemia como posible vector de un gran número de enfermedades víricas, existen pocas referencias que lo verifiquen.

Este trabajo constituye un estudio preliminar del papel que desempeña la artemia como reservorio

y fuente de infecciones virales en peces marinos cultivados.

### Material y Métodos

Se han analizado muestras de 6 lotes diferentes de quistes comerciales de artemia, 4 de ellas procedentes de piscifactorías de doradas con historial de linfocistis.

Los quistes y sus correspondientes nauplios se homogeneizaron en medio L-15 (60 mg quistes/ml). De cada muestra se han analizado 5 réplicas. Los homogeneizados se inocularon en la línea celular SAF-1 (Bejar *et al.*, 1997) y los cultivos se mantuvieron hasta la aparición de efectos citopáticos (CPE) hasta un máximo de 14 días post-inoculación (p.i.).

La PCR descrita por Cano *et al.* (2007) se utilizó para la detección de LCDV en quistes y nauplios de artemia, seguida de una segunda amplificación (nested-PCR) utilizando 2 µl de la PCR. Los cebadores utilizados para la nested-PCR (n1: 5'-ATAACAGAAGTGTGAGAG-3 y n2: 5'-GACTACGTAGAATAGAGC-3) generan un amplicón de 157 pb dentro de la proteína mayoritaria de la cápside. La extracción de ADN se realizó con DNAzol (Invitrogen) siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

Para la detección *in situ* de genoma de LCDV se utilizó como sonda el producto de la PCR marcado con digoxigenina (Cano *et al.*, 2007). Para los ensayos de hibridación *in situ* (HIS) se eclosionaron aproximadamente 50-100 mg de quistes por litro en agua de mar estéril a 25°C (salinidad a 35‰). El cultivo se incubó bajo aireación e iluminación continua. Se utilizaron tres grupos de quistes: el primero formado por artemias positivas por PCR; el segundo formado por quistes con resultado negativo de la PCR (control negativo de la HIS); y el tercero formado por nauplios procedentes del segundo grupo inoculados por baño a las 24 h post-eclosión con el aislado LCDV-12 (control positivo de la HIS). La infección experimental de estos nauplios se realizó en agua de mar con un título de  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/L (Cano, 2005).

Los nauplios se fijaron a las 48 h de la eclosión en formalina neutra tamponada (NBF) a 4°C durante 12 h. Posteriormente se conservaron en metanol a -20°C hasta su utilización. Del primer grupo se analizaron también artemias adultas a los 15 días post-eclosión.

La HIS se realizó sobre animales completos siguiendo el protocolo de hibridación *in toto* descrito por Murciano *et al.* (2002). La temperatura de hibridación fue de 42°C. La actividad fosfatasa del anticuerpo anti-digoxigenina se reveló con NBT/BCIP. Finalmente las muestras se fijaron 2 h en NBF a temperatura ambiente y se guardaron en tampón PBS con azida sódica 0,1%. Los animales completos se dispusieron en portaobjetos, montándose con una gota de glicerol estéril.

### Resultados

Los estudios virológicos realizados en los homogeneizados de quistes y nauplios de artemia han revelado la existencia de genoma del LCDV mediante nested-PCR en todos los lotes procedentes de las piscifactorías con episodios de linfocistis.

Los cultivos celulares inoculados con estos homogeneizados desarrollaron CPE típicos entre 2 y 6 días post-inoculación en un primer pase en los homogeneizados de nauplios, y en un segundo pase en los homogeneizados de quistes. Este segundo pase se realizó por observación de efectos citotóxicos en algunos cultivos.

En el presente estudio se ha utilizado la técnica de hibridación *in situ in toto* para la detección específica del genoma de LCDV en nauplios y adultos de artemia. La señal de hibridación se localiza principalmente en el tracto digestivo tanto de nauplios de artemia infectados naturalmente como en los inoculados por baño. En artemias adultas infectadas naturalmente y recogidas a los 15 días post-eclosión, la señal de hibridación se reparte por todo el cuerpo del animal. A pesar de la fuerte señal de hibridación detectada no se han observado alteraciones morfológicas (Figura 1).

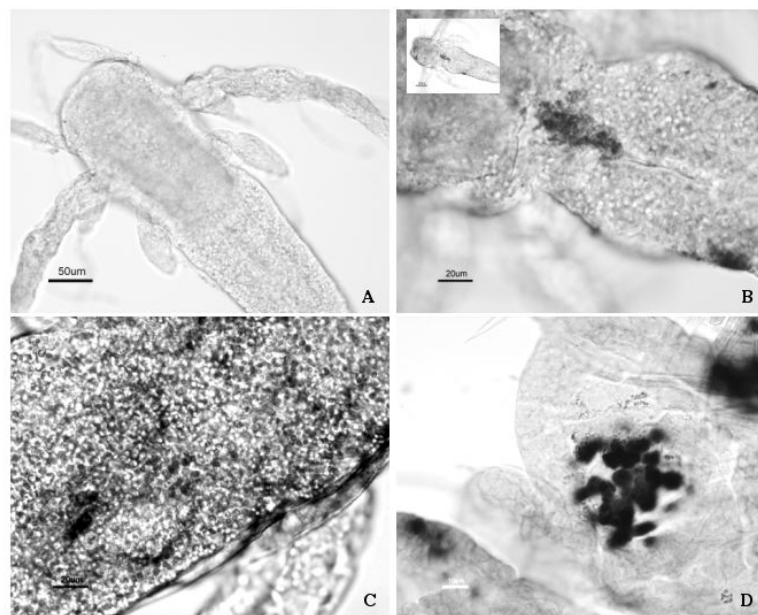


Figura 1. Detección del genoma de LCDV mediante HIS en artemia. Figura A: control negativo; Figura B: vista general (inserto) y detalle de nauplio de artemia a las 24 h de la inoculación por baño con LCDV (control positivo); Figura C: nauplio de artemia infectada naturalmente; Figura D: detalle de un exopodito de artemia adulta infectada naturalmente.

## Discusión

La *Artemia* sp. es mundialmente utilizada en las piscifactorías, sin embargo apenas existen estudios acerca de los microorganismos patógenos asociados a este crustáceo. En el presente estudio se ha detectado, mediante nested-PCR, genoma del LCDV en quistes y nauplios de artemias comercializadas para uso en piscifactorías. En artemias utilizadas para alimentar larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) se ha detectado IPNV, siendo el único virus de peces descrito hasta el momento en artemia (Mortensen *et al.*, 1993).

Lo más novedoso de este trabajo es la detección de artemias portadoras de virus de origen natural. Los ensayos de HIS en artemias adultas infectadas naturalmente con LCDV revelan una fuerte intensidad de la señal, indicando la persistencia del virus a lo largo de la vida del crustáceo, lo que hace sospechar que debe existir también transmisión vertical del virus. Únicamente existe un trabajo reciente de Sudhakaran *et al.* (2007) donde detectaron mediante nested-PCR nodavirus en la descendencia de artemias inoculadas en el laboratorio, sin observar síntomas clínicos de la enfermedad. La ausencia de alteraciones morfológicas en los nauplios, podría sugerir que este crustáceo eurialino no soporta la replicación de virus. Mediante microscopía electrónica de transmisión, Skliris y Richards (1998) estudiaron artemias inoculadas con un aislado de nodavirus, no observando cambios patológicos o evidencias de replicación viral. Además, los efectos citopáticos en células sólo se obtuvieron en artemias analizadas a las 24 h post-exposición al virus, indicando que la infección no persiste.

La detección del LCDV mediante HIS en nauplios de artemias infectadas por baño, revela que éstas actúan como bioacumuladores de patógenos desde el agua de cultivo. Thiery *et al.* (1997) demostraron bajo condiciones de laboratorio la transmisión horizontal de nodavirus en artemias.

Si las artemias actúan como reservorios ambientales del LCDV es posible que se genere una transmisión del virus a lavas de peces. En este sentido Sudhakaran *et al.* (2006) observaron

mortalidades del 100% en larvas de camarón de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii*) alimentadas con artemias inoculadas por baño con nodavirus.

### Conclusiones

En el presente estudio se ha demostrado la acumulación de viriones de LCDV en nauplios de artemias inoculadas por baño, lo que implicaría la existencia de una transmisión horizontal del virus desde el agua a la cadena trófica y el posible papel de las artemias como un vector implicado en la transmisión del virus a larvas de peces.

Además, la detección del virus en los quistes y posteriormente en sus respectivos nauplios y adultos podría indicar que existe una transmisión vertical de este virus en las artemias. Sin embargo estos resultados no son suficientes para dilucidar si el artrópodo además de vector mecánico actúa como hospedador del virus.

Este trabajo constituye una primera aproximación al estudio de las artemias como reservorios ambientales de patógenos víricos y vectores de transmisión de los mismos en las piscifactorías.

### Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Manuel Manchado del CICEM CIFPA “El Toruño” su colaboración e interés en este trabajo. Irene Cano es contratada postdoctoral en el ICMAN-CSIC dentro del Fondo social europeo- I3P-CSIC, en el marco del proyecto AGL2006-17777-C03-02/ACU (IP: Carmen Sarasquete).

### Bibliografía

- Bejar J., J.J Borrego y M.C. Alvarez. 1997. A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture* 150: 143-153.
- Borrego J.J., D. Castro, M.C. Balebona, E. Garcia-Rosado y L. Lopez-Cortes. 2001. Patologías que Afectan al Cultivo de la Dorada (*Sparus aurata*, L.) en la Comunidad Autónoma Andaluza. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Cano, I (2005). Diagnóstico de infecciones producidas por el virus de linfocistis en peces marinos cultivados. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga. ISBN 84-689-2357-7.
- Cano, I., P. Ferro, M.C. Alonso, S. M. Bergmann, A. Römer-Oberdörfer, E. García-Rosado, D. Castro y J.J. Borrego. 2007. Development of molecular techniques for detection of lymphocystis disease virus in different marine fish species. *Journal of Applied Microbiology* 102: 32-40.
- Comps M., B. Menu, G. Breuil y J.R. Bonami. 1991. Viral infection associated with rotifer mortalities in mass culture. *Aquaculture* 93: 1-7.
- Mortensen, S., O. Evensen, O. Rodseth y B. Hjeltnes. 1993. The relevance if infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed Norwegian turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 115: 243-252.
- Murciano, C., T.D. Fernandez, I. Duran, D. Maseda, J. Ruiz-Sanchez, J. Becerra, M.A. Akimenko y M. Mari-Beffa. 2002. Ray-interray interactions during fin regeneration of *Danio rerio*. *Dev. Biol.* 252 (2): 214-224.
- Skliris, G.P. y R.H. Richards. 1998. Assesment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infections. *Aquaculture* 169: 133-141.
- Sudhakaran, R., K. Yoganadhan, V.P. Ishaq Ahmed y A.S. Sahul Hameed. 2006. *Artemia* as a possible vector for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus transmission (XSV) to *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. *Diseases of Aquatic Organism* 70: 161-166.
- Sudhakaran, R., V.P. Ishaq Ahmed, P. Haribadu, S.C. Mukherjee, J. Sri Widada, J.R. Bonami y A.S. Sahul Hameed. 2007. Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *Journal of Fish Diseases* 30: 27-35.
- Thiery, R., J. Peducasse, J. Castric, A. Le Ven, J. Jeffroy y F. Baudin-Laurencin. 1997. Experimental transmission of viral encephalopathy to juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Bulletin of European Association of fish Pahtologists* 17 (3-4): 118-122.