

Extractos del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 protegen frente a la infección por RGNNV en cultivo celular

Patricia Moreno (Universidad de Málaga), M. Carmen Balebona (Universidad de Málaga), Miguel Ángel Moriñigo (Universidad de Málaga), M. Carmen Alonso (Universidad de Málaga), Julia Béjar (Universidad de Málaga), Esther García-Rosado (Universidad de Málaga)

Abstract

Nervous necrosis virus (NNV) is the aetiological agent of the viral encephalopathy and retinopathy (VER). Even this disease may provoke high mortality levels in different fish species, there are not effective treatments and/or preventive procedures. The development of functional feeds has become an innovative strategy to prevent diseases of infectious aetiology in aquaculture. The aim of this work is to evaluate the ability of extracts of the probiotic bacteria *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11), isolated from sea bream, to immunostimulate and induce an antiviral state *in vitro* against NNV infection. Specifically, the transcription of several genes, implied in the antiviral immune responses, has been quantified after treatment with the postbiotic. Furthermore, the interference of the postbiotic in different phases of viral infection has been evaluated through the quantification of cellular survival and viral multiplication. Results showed that SpPdp11 extracts generate an antiviral state that protect the cells from NNV infection. Thus, this postbiotic could be considered a good candidate to be included in fish feeds of susceptible species as anti-RGNNV strategy.

Resumen

El agente etiológico de la retinopatía y encefalitis viral (VER) es el virus de la necrosis nerviosa (VNN). Aunque esta enfermedad puede causar una elevada mortalidad en numerosas especies de peces, no existen métodos efectivos para su tratamiento o prevención. La utilización de piensos funcionales es una estrategia novedosa para prevenir enfermedades de etiología infecciosa en acuicultura. El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar *in vitro* la capacidad inmunoestimulante y antivírica frente a un aislado VNN de un extracto de la bacteria probiótica *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11), aislada de dorada. En concreto, se ha cuantificado la transcripción de diferentes genes implicados en la respuesta inmune antiviral en células tratadas con este postbiótico, y se ha analizado su interferencia sobre distintas fases del proceso de infección vírica, analizándose tanto la supervivencia celular, como la multiplicación vírica. Los resultados muestran que el extracto de SpPdp11 es capaz de generar un estado antiviral en las células que las protege frente a la infección por VNN, por lo que este postbiótico es un buen candidato para incluir en los piensos de las especies susceptibles como estrategia de lucha frente a VNN.

Introducción

El virus de la necrosis nerviosa (VNN) es el agente etiológico de la retinopatía y encefalitis viral (VER), que produce elevadas mortalidades en especies de relevada importancia en acuicultura (Bandín y Souto, 2020). VNN pertenece al género *Betanodavirus*, dentro de la familia *Nodaviridae*. Los betanodavirus se clasifican en cuatro especies, siendo las especies *striped jack nervous necrosis virus* (SJNNV) y *red-spotted grouper nervous necrosis virus* (RGNNV) las más abundantes en la Península Ibérica (Bandín y Souto, 2020).

Debido al impacto de VER en la acuicultura, una de las principales preocupaciones de la industria es el desarrollo de procedimientos que permitan prevenir y/o tratar dicha enfermedad. En este sentido, el desarrollo de alimentos funcionales está adquiriendo una gran relevancia, en concreto, los probióticos o algunos de sus derivados pueden actuar como inmunoestimulantes y proporcionar resistencia frente a las infecciones por patógenos. En concreto, *Shewanella putrefaciens* Pdp11, conocida como SpPdp11, es una bacteria aislada de dorada sana que es considerada como un probiótico (Cámara-Ruiz *et al.*, 2020). Esta bacteria protege frente a las infecciones por varios patógenos bacterianos en diferentes especies de peces (revisado en Cámara-Ruiz *et al.*, 2020), pero se desconoce su capacidad para prevenir infecciones virales.

En el presente trabajo se ha evaluado la capacidad de extractos de SpPdp11 obtenidos mediante sonicación de modular la respuesta inmune *in vitro*, y de establecer un estado antiviral que proteja frente a las infecciones por RGNNV a través de diferentes mecanismos.

Material y métodos

La capacidad inmunomoduladora del extracto de SpPdp11 se determinó sobre células E11 mediante la cuantificación, por PCR cuantitativa relativa (PCRq), de la transcripción de los genes *mx*, *tlr3*, *e3*, *tnfa* y *hsp70*) a las 6, 24, 48, y 72 h post-tratamiento (p.t.).

Para determinar la actividad antiviral del extracto bacteriano, se evaluó la inhibición del desarrollo de efectos citopáticos (ECP) en células E11 infectadas por RGNNV. Se utilizaron diferentes condiciones experimentales: (i) ensayo de neutralización, que consistió en la pre-incubación del virus con el postbiótico durante 1 h, para posteriormente tratar la monocapa celular con dicha suspensión durante 1 h.; (ii) pre-tratamiento de las células con el postbiótico durante 6 h, para posteriormente ser lavadas e inoculadas con el virus e (iii) inoculación de las células con el virus y posterior tratamiento con el postbiótico. En todos los casos la concentración del postbiótico empleada fue 8×10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y las células fueron inoculadas con 10^3 TCID₅₀/ml. Las células se mantuvieron hasta la aparición de los ECP, momento en el cual se determinó la supervivencia celular mediante el ensayo de reducción de MTT.

El porcentaje de inhibición vírica se calculó para las condiciones en las que se observó inhibición de la aparición de ECP. Para ello, se cuantificó el genoma viral mediante PCRq absoluta (Moreno *et al.*, 2019) a las 24, 48, y 72 h post-inoculación (p.i.) y el título de partículas víricas infectivas a las 48 h p.i.

Resultados y discusión

Con respecto a la inmunomodulación, el tratamiento con el postbiótico indujo una importante transcripción del gen *mx*, que alcanzó los niveles de transcripción más altos a las 6 y 24 h p.t. Este gen, junto con *hsp70*, se induce de forma muy temprana (6 h p.t.), mientras que la transcripción del resto de los genes fue más tardía: a las 48 h p.t. para *tnfa* y desde 24 a las 72 h p.t. para los genes *e3* y *tlr3*.

Con respecto a la actividad antiviral, sólo se observó inhibición de ECP cuando las células fueron pre-tratadas durante 6 h con el postbiótico y cuando fueron tratadas con posterioridad a la infección vírica, alcanzándose niveles de inhibición del 55% y 54%, respectivamente. Por tanto, estas fueron las únicas condiciones en las que se cuantificó la inhibición de la replicación vírica y de la producción de partículas víricas infectivas. El pre-tratamiento de las células con el postbiótico produjo una baja inhibición de la replicación vírica (3% nivel máximo de inhibición a las 48 h p.i.), mientras que, la inhibición de título viral alcanzó niveles del 33,2%. Cuando las células se trataron con el postbiótico tras la infección, la inhibición de la replicación vírica alcanzó niveles máximos a las 72 h p.i. (11,9%) y la inhibición del título de partículas víricas infectivas fue del 46%.

En conclusión, los extractos de SpPdp11 inducen una respuesta inmune antivírica que está implicada en el establecimiento de un estado antiviral en las células E11, que las protege frente a la infección por el betanodavirus RGNNV. Esta protección solo se consigue cuando las células están tratadas al menos durante 6 horas con el postbiótico.

Bibliografía

Bandín, I. y S. Souto. 2020. Betanodavirus and VER Disease: A 30-year Research Review. *Pathogens*. 9: 106.

Cámara-Ruiz, M., M.C. Balebona, M.A. Moriñigo y M.A. Esteban. 2020. Probiotic *Shewanella putrefaciens* (SpPdp11) as a fish health modulator: a review. *Microorganisms*. 8: 1990.

Moreno, P., S. Souto, R. Leiva-Rebollo, I. Bandín y M.C. Alonso. 2019. Capsid aminoacids at positions 247 and 270 are involved in the virulence of betanodavirus to European sea bass. *Scientific Reports*. 9: 14068.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de la Junta de Andalucía P18-RT-1067 y del Ministerio de Ciencia e Innovación PID2020-113637RB-C22.