

# Patología de especies acuícolas cultivadas

**Dolores Castro**

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

Nuestro grupo está constituido básicamente por investigadores del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga y forma parte del Grupo de Investigación consolidado del Plan Andaluz de Investigación denominado “Patología, Genética y Biotecnología de Especies Acuícolas”, Ref. RNM-112, dirigido por el Dr. Juan J. Borrego. Este grupo comenzó el estudio de patologías que afectan a especies acuícolas cultivadas en 1988. En una primera etapa nuestros trabajos se centraron en el estudio de patologías de origen bacteriano, para continuar, desde 1996, con la caracterización de patologías de origen vírico, iniciándose esta andadura con el estudio de las infecciones producidas por el virus de linfo-

cistis (LCDV) en peces marinos cultivados. Desde 2004, hemos ampliado nuestro ámbito de estudio a la caracterización de inmunogenes implicados en la respuesta inmune innata de peces. En resumen, las principales líneas en las que actualmente trabaja el grupo de investigación son: 1) diagnóstico de patologías de origen bacteriano y vírico que afectan a nuevas especies de peces marinos cultivados; 2) caracterización intraespecífica de patógenos bacterianos implicados en brotes epizooticos y estudio de potenciales factores de virulencia; 3) patogénesis y transmisión de las principales patologías víricas detectadas; y 4) estudio del sistema inmune innato del lenguado senegalés frente a infecciones víricas.



Miembros del grupo (de izquierda a derecha, detrás): Alejandro Labella (Investigador contratado), M<sup>a</sup> Carmen Alonso (Prof. Titular), Benjamín López (Becario FPI, IFAPA Centro El Toruño), Patricia Moreno (estudiante POP), Estefanía Jiménez (Investigadora contratada); (delante): Daniel Álvarez (Becario FPI), Dolores Castro (Prof. Titular), Juan José Borrego (Catedrático), Esther García (Prof. Contratada Doctor), Isabel López (estudiante POP).

Las principales especies piscícolas marinas cultivadas en el Sur de España son la dorada, la lubina y el lenguado senegalés. Sin embargo, como consecuencia de la necesidad de diversificación del sector, la Comunidad Autónoma Andaluza ha comenzado a desarrollar el cultivo de otras especies marinas, destacando los espáridos urta, pargo y sargo. El cultivo intensivo de estas especies ha venido acompañado por la aparición de brotes esporádicos de mortalidad que han podido asociarse principalmente a las especies bacterianas *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio harveyi* y *V. splendidus*, si bien en algunos casos se detectaron co-infecciones con los virus de la necrosis nerviosa vírica (VNNV) y de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) (Labella *et al.*, 2006; García-Rosado *et al.*, 2007).

*Photobacterium damsela* subsp. *damsela* se ha aislado repetidamente de brotes de mortalidad ocurridos en instalaciones de cultivo andaluzas en los últimos años, implicando mayoritariamente a la urta, aunque también se ha aislado de otras especies como el sargo, la dorada, la lubina y la corvina. La aplicación de diversas técnicas de tipado molecular, como son la amplificación aleatoria de polimorfismos del DNA (RAPD-PCR) y las técnicas de amplificación de elementos repetitivos REP-PCR y ERIC-PCR, ha confirmado la existencia de una gran variabilidad intraespecífica, lo cual puede ser de utilidad para estudios de trazabilidad de las infecciones por esta bacteria (Labella *et al.*, 2010a). También se ha evaluado la toxicidad de diversas cepas de este patógeno y sus productos extracelulares (ECP). La mayoría de las cepas analizadas pueden considerarse como moderadamente virulentas para la urta, si bien sus ECP son letales, resultando también citotóxicos para diversas líneas celulares de peces y mamíferos. La virulencia de las cepas analizadas no ha podido correlacionarse con la actividad hemolítica ni con la producción de la toxina damselsina (Labella *et al.*, 2010b).

En cuanto a las patologías de origen vírico, se han desarrollado metodologías (tanto inmunológicas como moleculares) para el diagnóstico sensible y específico de distintos patógenos víricos, concretamente del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), LCDV y VNNV, que han resultado adecuadas para la detección de portadores asintomáticos de estos virus (Cano *et al.*, 2006; 2007; Lopez-Jimena

*et al.*, 2010a; b). Asimismo, se han puesto a punto diversas técnicas para la detección *in situ* de estos patógenos, imprescindibles para realizar estudios de patogénesis y transmisión (Alonso *et al.*, 2004; Cano *et al.*, 2009a;b;c).

Nuestra línea de investigación más reciente pretende abordar el estudio de la respuesta inmune del lenguado senegalés frente a las infecciones víricas, y se lleva a cabo en colaboración con investigadores del área de Genética del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología Animal de la Universidad de Málaga, integrados en el grupo RNM-112. La proteína Mx es una de las proteínas antivíricas inducidas por interferon más extensamente estudiada en peces (García-Rosado *et al.*, 2010). Nuestro grupo de investigación ha clonado el gen que codifica la proteína Mx del lenguado senegalés (SsMx) (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2006) y ha estudiado su cinética de expresión en lenguados inoculados con poli I:C o aquabirnavirus (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2006; Fernandez-Trujillo *et al.*, 2008a). El efecto antiviral de SsMx ha sido demostrado tanto *in vivo*, mediante inducción de lenguados con poli I:C y posterior inoculación con aquabirnavirus (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2008a), como *in vitro*, mediante la sobreexpresión de SsMx recombinante en células embrionarias de salmón y posterior inoculación con IPNV y VHSV (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2008b; Alvarez-Torres *et al.*, 2010).

## LA ENFERMEDAD DE LINFOCISTIS EN DORADA

La enfermedad de linfocistis (LCD) es la única patología de origen viral descrita en doradas cultivadas en España (Borrego *et al.*, 2001). El agente etiológico de esta enfermedad es el LCDV, miembro del género *Lymphocystivirus*, familia *Iridoviridae*. Estudios filogenéticos recientes, basados en la secuencia del gen que codifica la proteína principal de la cápside (MCP), han permitido establecer la existencia de una gran variabilidad genética en este género, estableciéndose al menos 8 genotipos que se relacionan con el rango de hospedador, constituyendo las cepas aisladas a partir de doradas cultivadas un genotipo diferenciado (Cano *et al.*, 2010).

Los estudios sobre la patogénesis del LCDV son relativamente escasos, limitados en la mayoría de los casos a estudios histopatológicos. En el caso de las infecciones en dorada se

ha establecido la distribución del virus en diversos tejidos mediante aislamiento de partículas infectivas en cultivos celulares, detección del genoma viral por PCR, así como por técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Los resultados de estos estudios sugieren que la infección por LCDV en ejemplares juveniles de dorada presenta un carácter sistémico, tanto cuando esta cursa de forma clínica como asintomática, y que la multiplicación del virus parece ocurrir en fibroblastos, hepatocitos y macrófagos. Por otra parte, se ha comprobado que el virus persiste en el hospedador tras la desaparición de los síntomas, detectándose antígenos y genomas víricos en riñón y bazo, dermis e hígado (Cano *et al.*, 2009a).

Al igual que ocurre en otras infecciones virales de peces, no existen medidas profilácticas adecuadas para el control de la enfermedad de linfocistis en doradas, sino que la prevención debe pasar por evitar la introducción del virus en las piscifactorías y por establecer medidas higiénico-sanitarias que permitan su eliminación. Para ello es esencial conocer cuáles son los reservorios del virus en las piscifactorías, así como su implicación en la transmisión vírica. Se han identificado portadores del LCDV en distintas etapas del cultivo de la dorada (reproductores, huevos, larvas, postlarvas y juveniles), habiéndose detectado también el virus en cultivos de rotíferos y artemias utilizados para el alimento de las larvas (Cano *et al.*, 2009b;c). La detección de quistes de *Artemia* portadores de LCDV de origen natural, así como la persistencia del virus a lo largo del ciclo de vida del crustáceo, sugieren que *Artemia* puede ser un reservorio de LCDV, y que sus quistes deben ser considerados como un elemento crítico de introducción del virus en las instalaciones de cultivo larvario (Cano *et al.*, 2009c). El significado de los posibles reservorios del LCDV en su transmisión a larvas de dorada debe ser estudiado más exhaustivamente, si bien estudios preliminares han permitido reconocer una transmisión horizontal vía agua y alimento (Cano *et al.*, 2009b).

## REFERENCIAS

- Alonso, M.C., I. Cano, D. Castro, S.I. Perez-Prieto & J.J. Borrego. 2004. Development of an *in situ* hybridisation procedure for the detection of sole aquabirnavirus in infected cell cultures. *J. Virol. Methods*, 116: 133-138.
- Alvarez-Torres, D., E. García-Rosado, M.A. Fernández-Trujillo, D. Castro, J. Béjar, J.J. Borrego & M.C. Alonso. 2010. Actividad antiviral de la proteína Mx de lenguado senegalés. VIII Reunión del Grupo de Microbiología del Medio Acuático, SEM. Vigo. p. 107-108.
- Borrego, J.J., D. Castro, M.C. Balebona, E. García-Rosado & L. López-Cortés. 2001. Patologías que afectan al cultivo de dorada (*Sparus aurata*) en la Comunidad andaluza. Servicio de Publicaciones y Divulgación, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Cano, I., M.C. Alonso, E. García-Rosado, S. Rodríguez Saint-Jean, D. Castro & J.J. Borrego. 2006. Detection of lymphocystis disease virus (LCDV) in asymptomatic cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L.) using an immunoblot technique. *Vet. Microbiol.*, 113: 137-141.
- Cano, I., P. Ferro, M.C. Alonso, S.M. Bergmann, A. Römer-Oberdörfer, E. García-Rosado, D. Castro & J.J. Borrego. 2007. Development of molecular techniques for detection of lymphocystis disease virus in different marine fish species. *J. Appl. Microbiol.*, 102: 32-40.
- Cano, I., P. Ferro, M.C. Alonso, C. Sarasquete, E. García-Rosado, J.J. Borrego & D. Castro. 2009a. Application of *in situ* detection techniques to determine the systemic condition of lymphocystis disease virus infection in cultured gilt-head seabream, *Sparus aurata* L. *J. Fish Dis.*, 32: 143-150.
- Cano, I., E. García-Rosado, M.C. Alonso, B. Lopez-Jimena, J.B. Ortiz-Delgado, J.J. Borrego, D. Castro & C. Sarasquete. 2009b. Transmission of lymphocystis disease virus (LCDV) in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*). 14th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", EAFF. Praga (República Checa). p. 196.
- Cano, I., B. Lopez-Jimena, E. García-Rosado, J.B. Ortiz-Delgado, M.C. Alonso, J.J. Borrego, C. Sarasquete & D. Castro. 2009c. Detection and persistence of Lymphocystis disease virus (LCDV) in *Artemia* sp. *Aquaculture*, 291: 230-236.
- Cano, I., E.J. Valverde, B. Lopez-Jimena, M.C. Alonso, E. García-Rosado, C. Sarasquete, J.J. Borrego & D. Castro. 2010. A new genotype of *Lymphocystivirus* isolated from cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *J. Fish Dis.*, 33: 695-700.
- Fernandez-Trujillo, M.A., J. Porta, J.J. Borrego, M.C. Alonso, M.C. Alvarez & J. Bejar. 2006. Cloning and expression analysis of Mx cDNA from Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol.*, 21:577-582.
- Fernandez-Trujillo, A., P. Ferro, E. García-Rosado, C. Infante, M.C. Alonso, J. Bejar, J.J. Borrego & M. Manchado. 2008a. Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Fish Shellfish Immunol.*, 24: 279-285.
- Fernandez-Trujillo, M.A., E. García-Rosado, M.C. Alonso, J.J. Borrego, M.C. Alvarez & J. Bejar. 2008b. *In vitro* inhibition of sole aquabirnavirus by Senegalese sole Mx. *Fish Shellfish Immunol.*, 24:187-193.
- García-Rosado, E., I. Cano, B. Martín-Antonio, A. Labella, M. Manchado, M.C. Alonso, D. Castro & J.J. Borrego. 2007. Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *Int. Microbiol.*, 10: 193-199.
- García-Rosado, E., M.C. Alonso, M.A. Fernández-Trujillo, M. Manchado & J. Bejar. 2010. Characterization of flatfish Mx proteins. En: *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Neumann, L. & S. Meier (eds.). Nova Science Publishers, Inc. New York, p. 99-128.
- Labella, A., M. Vida, M.C. Alonso, C. Infante, S. Cardenas, S. Lopez-Romalde, M. Manchado & J.J. Borrego. 2006. First isolation of *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* from cultured redbanded seabream, *Pagrus auriga* Valenciennes, in Spain. *J. Fish Dis.*, 29: 175-179.
- Labella, A., M. Manchado, M.C. Alonso, D. Castro, J.L. Romalde & J.J. Borrego. 2010a. Molecular intraspecific characterisation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains affecting cultured marine fish. *J. Appl Microbiol.*, 108: 2122-2132.
- Labella, A., N. Sanchez-Montes, C. Berbel, M. Aparicio, D. Castro, M. Manchado & J.J. Borrego. 2010b. Toxicity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains isolated from new cultured marine fish. *Dis. Aquat. Org.*, doi: 10.3354/dao02275.
- Lopez-Jimena, B., N. Cherif, E. García-Rosado, C. Infante, I. Cano, D. Castro, S. Hammami, J.J. Borrego & M.C. Alonso. 2010a. A combined RT-PCR and dot-blot hybridization method reveals the co-existence of SJNNV and RGNNV betanodavirus genotypes in wild meagre (*Argyrosomus regius*). *J. Appl. Microbiol.*, 109: 1361-1369.
- Lopez-Jimena, B., E. García-Rosado, C. Infante, I. Cano, M. Manchado, D. Castro, J.J. Borrego & M.C. Alonso. 2010b. Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from asymptomatic redbanded seabream (*Pagrus auriga*) and common seabream (*Pagrus pagrus*) using a non-destructive procedure. *J. Fish Dis.*, 33: 311-319.