



ALLIANCE™

(<https://debug.globalseafood.org>).



Health &
Welfare

Transmisión experimental del Virus de la Tilapia de Lago en reproductores

24 February 2020

By Ha Thanh Dong, Ph.D. , Saengchan Senapin, Ph.D. , Warachin Gangnonngiw, Ph.D. , Vuong Viet Nguyen, M.S. , Channarong Rodkhum, D.V.M, Ph.D. , Partho Pratim Debnath, M.S. , Jerome Delamare-Deboutteville, Ph.D. and Chadag Vishnumurthy Mohan, Ph.D.

Resultados sugieren que el TiLV puede transmitirse verticalmente a los órganos reproductores y óvulos fertilizados



Los resultados de este estudio sugieren que TiLV puede transmitirse verticalmente y recomienda el uso de reproductores probados negativos a TiLV para la producción de semillas de tilapia sin TiLV.
Foto de Darryl Jory.

El Virus de la Tilapia de Lago (TiLV) es un virus recientemente descubierto de tilapinas (una tribu dentro de la familia de peces *Cichlidae*) y sus infecciones se han documentado en poblaciones de tilapinas cultivadas o silvestres en 14 países de todo el mundo, incluidos en Asia, África y América del Sur. Los brotes naturales de TiLV causaron una mortalidad del 20 al 90 por ciento, y la infección experimental con virus cultivados causó una mortalidad del 66 al 90 por ciento en los juveniles de tilapia. La literatura actual muestra que TiLV parece ser más importante en semillas, alevines y juveniles de tilapia, aunque también se evidenciaron infecciones virales en peces subadultos y adultos. Además, también se han informado infecciones subclínicas con un impacto menor en la mortalidad.

La transmisión horizontal (transmisión de infecciones entre miembros de la misma especie que no están en una relación padre-progenie) del virus se ha confirmado a través de la cohabitación de peces infectados con peces clínicamente sanos, lo que resultó en una mortalidad del 80 por ciento, confirmando la transmisión por el agua. El desafío experimental de nueve especies de peces que no son tilapia con TiLV reveló que el gourami gigante (*Osphronemus goramy*; comercialmente importante en la acuicultura) es una especie susceptible adicional y la convivencia entre tilapia y gourami gigante causó la transmisión entre especies.

Una investigación preliminar que realizamos indicó que había una proporción de reproductores de tilapia aparentemente sanos que dieron positivas para TiLV. En los criaderos de tilapia, la detección de TiLV en huevos fertilizados y etapas de desarrollo muy tempranas de la tilapia, por ejemplo, la etapa del saco vitelino, alevines y alevines sugieren una posible transmisión vertical de este virus. Sin embargo, todavía no está claro si TiLV puede transmitir desde reproductores infectados a sus órganos reproductivos y su progenie.

Este artículo, adaptado y resumido de la **publicación original** (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734541>). [Dong HT et al. 2020. Experimental infection reveals transmission of tilapia lake virus (TiLV) from tilapia broodstock to their reproductive organs and fertilized eggs] reporta sobre investigaciones para inquirir si los reproductores infectados experimentalmente pueden transmitir el virus a sus órganos reproductores, óvulos y espermatozoides, así como en huevos fertilizados in vitro.

Este trabajo se llevó a cabo como parte del Programa de Investigación del CGIAR sobre Sistemas Agroalimentarios de Pescado (FISH) y liderado por WorldFish. El programa es apoyado por contribuyentes al Fondo Fiduciario del CGIAR. Los autores agradecen a S. Taengphu, W. Meemetta, P. Meenium y M. Bunnontae por su asistencia técnica especializada.

Configuración del estudio

Se cultivó y aisló la cepa NV18R del Virus de la Tilapia de Lago de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) enferma, y se confirmó el stock viral purificado mediante PCR específica de TiLV, y se estableció una dosis de inyección de $10^{5.5}$ dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID₅₀) por pez.

Se obtuvieron cinco pares de reproductores de tilapia del Nilo completamente maduros (300 a 400 gramos) de un criadero de tilapia comercial sin antecedentes de infección por TiLV, y cada par de reproductores se cultivó en tanques aireados de fibra de vidrio de 50 litros. Los peces fueron alimentados dos veces al día con gránulos comerciales para tilapia que contenían 28 por ciento de proteína cruda al 5 por ciento de peso corporal.

En el día 6 después de la infección, todavía no había signos de síntomas anormales. Los huevos ovulados y el semen de cada progenitor fueron recolectados y mezclados con el semen recolectado del macho de la misma familia. Los restantes huevos no fertilizados también se mantuvieron para más experimentos de PCR y cultivo viral. Para cada prueba de diagnóstico, se utilizaron grupos de 10 óvulos no fertilizados o fertilizados en cada curso de tiempo. También se recolectaron muestras de sangre de los peces, que luego fueron sacrificados y anatomizados para recolectar hígados y órganos reproductivos. Estos tejidos fueron preservados para PCR, histología y re-aislamiento en cultivos celulares.

Para obtener información detallada sobre la preparación de virus; infección de peces, fertilización in vitro y recolección de muestras; detección de RT-PCR semi-anidada de TiLV; histología e hibridación in situ; y re-aislamiento viral usando la línea celular de peces, consulte la publicación original.

Resultados y discusión

En este estudio, los tejidos de tres familias de reproductores de tilapia infectados con TiLV experimentales, así como sus huevos fertilizados in vitro, fueron sometidos a detección de TiLV por reacción en cadena de la polimerasa (PCR; un método de biología molecular ampliamente utilizado que rápidamente genera millones a miles de millones de copias de una muestra de ADN específica para estudio detallado). Se recolectaron hígados, sangre, ovarios y huevos no fertilizados de reproductores hembras y se usaron hígados, sangre y testículos de peces machos. Huevos fertilizados artificialmente se recolectaron a las 3, 12 y 64 horas después de la fertilización. Las muestras correspondientes de las dos familias de control fueron procesadas de manera similar.

Los resultados demostraron una infección sistémica con TiLV en los peces desafiados experimentalmente. Todas las muestras analizadas de las familias desafiadas – incluidos hígados, sangre, los órganos reproductores de reproductores masculinos y femeninos, y los huevos no

fertilizados – dieron positivo para TiLV por PCR. Los huevos fertilizados a las 3, 12 y 64 horas post-fertilización recolectados de tres familias infectadas (1 a 3) también fueron positivos, a excepción de las muestras recolectadas a las 3 y 64 horas de la familia 1. Muestras de dos familias de control (4 y 5) fueron todas negativas para TiLV. Los resultados representativos de las pruebas de PCR de una familia de control infectada y no infectada se muestran en la Figura 1.

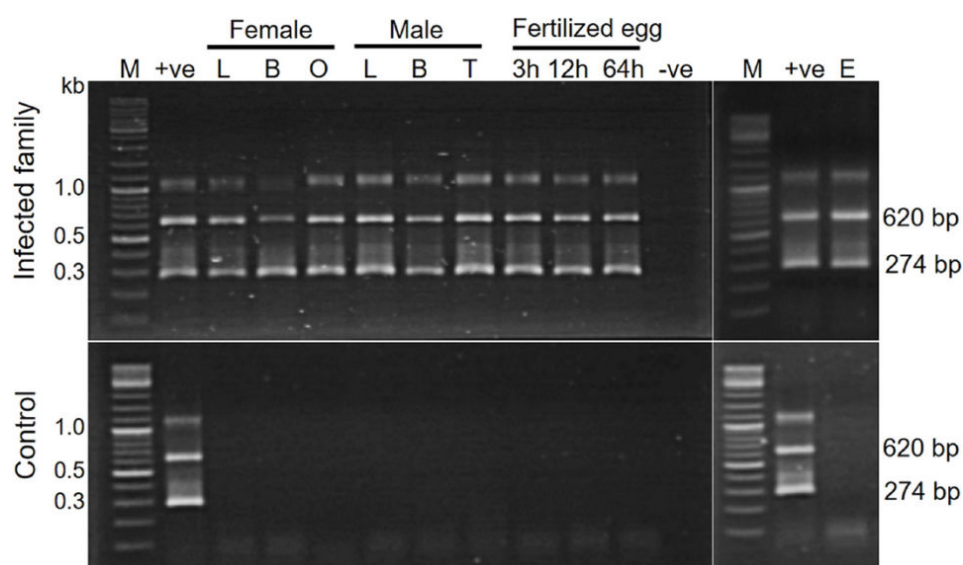


Fig. 1: Resultados representativos de las pruebas de PCR de muestras obtenidas de familias infectadas y de control (no infectadas). M, marcador de ADN (New England Biolabs); + ve, control positivo; -ve, control negativo; L, hígado; B, sangre; O, ovario; T, testículo; E, huevos no fertilizados.

La comprensión de la patogénesis de la enfermedad y la ruta de transmisión del TiLV son bases científicas importantes para futuros estudios sobre enfoques de prevención efectivos. En nuestro estudio, a pesar del hecho de que el virus se inyectó por vía intramuscular en los reproductores, el virus se detectó más tarde en la sangre, el hígado y los órganos reproductivos, lo que se confirmó mediante PCR, hibridación in situ (ISH; un tipo de hibridación que utiliza un etiquetado cadena complementaria de ADN, ARN o ácidos nucleicos modificados [es decir, sonda] para localizar una secuencia específica de ADN o ARN en una porción o sección de tejido) y cultivo celular. Grandes áreas que rodean los vasos sanguíneos de los tejidos analizados (hígado y testículos) reaccionaron fuertemente con la sonda específica de TiLV por ISH. Hasta donde sabemos, esto aún no se ha reportado para la infección por TiLV. Estos hallazgos sugieren que el TiLV es de naturaleza sistémica y se propaga a otros órganos muy probablemente a través del sistema circulatorio.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio controlado por laboratorio que demuestra que los reproductores infectados experimentalmente pueden transmitir el virus TiLV a sus órganos reproductivos. Observamos que, en base a las frecuencias comparativas de señales reactivas ISH fuertes y generalizadas en los órganos reproductivos, la infección viral en el ovario parece ser más grave que en los testículos.

Fig. 2: Microfotografías representativas de secciones de los huevos fertilizados post-3 horas obtenidos de dos familias separadas infectadas con TiLV. Tres secciones consecutivas de cada espécimen de huevo fueron sometidas a tinción H&E, ISH con sonda no relacionada e ISH con sonda específica de TiLV, respectivamente. Se detectaron señales positivas de TiLV dentro de los huevos fertilizados. El alto aumento del área marcada por cuadros punteados revela señales positivas de ISH multifocales (flechas).

Por lo tanto, a pesar del hecho de que en nuestro desafío de infección experimental, TiLV pudo transmitirse verticalmente a los huevos fertilizados, aún se desconoce si esos huevos fertilizados infectados podrían desarrollarse en semillas y alevines y si el virus aún sería infeccioso a través de sus etapas de desarrollo. Estas preguntas deben ser investigadas más a fondo.

Perspectivas

Los resultados de nuestro estudio sugieren que el TiLV causó una infección sistémica en los reproductores de tilapia y que el virus es capaz de circular en los órganos reproductores de ambos sexos a través del sistema circulatorio sanguíneo. Las hembras infectadas produjeron huevos infectados, y cuando se fertilizaron con espermatozoides de reproductores machos infectados resultaron en huevos fertilizados infectados. Por lo tanto, para producir semillas sin TiLV, recomendamos encarecidamente usar reproductores sin TiLV.

Referencias disponibles de la publicación original.

Authors



HA THANH DONG, PH.D.

Corresponding author
Faculty of Science and Technology
Suan Sunandha Rajabhat University
Bangkok, Thailand

hathanh.do@ssru.ac.th (<mailto:hathanh.do@ssru.ac.th>).



SAENGCHAN SENAPIN, PH.D.

Fish Health Platform
Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology (Centex Shrimp)
Faculty of Science, Mahidol University
Bangkok, Thailand



WARACHIN GANGNONNGIW, PH.D.

Fish Health Platform
Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology (Centex Shrimp)
Faculty of Science, Mahidol University
Bangkok, Thailand



VUONG VIET NGUYEN, M.S.

Fish Infectious Diseases Research Unit (FID RU)
Department of Veterinary Microbiology
Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University
Bangkok, Thailand



CHANNARONG RODKHUM, D.V.M, PH.D.

Fish Infectious Diseases Research Unit (FID RU)
Department of Veterinary Microbiology
Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

Bangkok, Thailand



PARTHO PRATIM DEBNATH, M.S.

WorldFish
Dhaka, Bangladesh



JEROME DELAMARE-DEBOUTTEVILLE, PH.D.

WorldFish
Penang, Malaysia



CHADAG VISHNUMURTHY MOHAN, PH.D.

WorldFish
Penang, Malaysia

Copyright © 2023 Global Seafood Alliance

All rights reserved.