

RESUMEN DE TESIS DOCTORAL**Pathogenesis and transmission of lymphocystis disease virus (LCDV) in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)****Estefanía Jiménez Valverde**Directores:

Dr. Juan José Borrego García

Dra. M^a Dolores Castro López

Defendida el 11/11/2016 en la Universidad de Málaga.

Realizada en el Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga; Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN), CSIC, Cádiz; Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Weymouth, UK

Mención Internacional, *Cum laude***Resumen**

Uno de los problemas más importantes a los que se enfrenta la acuicultura, y que puede limitar de forma significativa el cultivo de las especies piscícolas, es la aparición de patologías de etiología microbiana que ven favorecidas su propagación por las condiciones derivadas del cultivo intensivo. Dentro de las enfermedades infecciosas, las de origen vírico tienen una especial relevancia debido a diversos factores, como las altas mortalidades que provocan y la capacidad de inducir infecciones persistentes. Las infecciones víricas son, de hecho, un factor limitante para la expansión de la acuicultura debido a las pérdidas directas en la producción de peces, los costes derivados de la reducción de la productividad y la gestión de la enfermedad, sumados a la pérdida de mercados de exportación en relación con las restricciones comerciales.

La enfermedad de linfocistis (LCD) se ha descrito en más de 150 especies diferentes de peces teleósteos, tanto marinos como dulceacuícolas, y tiene una amplia distribución geográfica. Su agente etiológico es el virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV), género *Lymphocystivirus*, familia *Iridoviridae*. La LCD se describió por primera vez en dorada (*Sparus aurata*) cultivadas en Israel en 1982, y desde entonces se ha convertido en una de las patologías más frecuentemente registradas en las poblaciones de doradas cultivadas en las costas suratlánticas europeas y mediterráneas. Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de unos pequeños nódulos parecidos a papilomas localizados en la superficie del cuerpo y las aletas, que pueden aparecer aislados o más frecuentemente agrupados en racimos, pudiendo llegar a cubrir todo el cuerpo del animal. En las instalaciones de acuicultura la LCD suele presentar una elevada morbilidad, ocasionando graves pérdidas económicas relacionadas con la desfiguración de los animales que impide su comercialización.

Existen pocos estudios realizados sobre la patogénesis del LCDV, limitados en su mayoría a estudios histopatológicos de las lesiones localizadas en la piel y en algunos órganos internos, pero no se ha descrito el curso de la infección ni el tropismo del virus. Por otra parte, al igual que ocurre en otras muchas infecciones víricas de peces, no existen medidas profilácticas adecuadas para el control de la LCD 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, para evitar la aparición de brotes y las pérdidas económicas que estos suponen.

Los principales objetivos planteados en esta Tesis doctoral fueron el estudio de la patogénesis del LCDV en dorada, y el establecimiento de las rutas de transmisión del mismo en larvas y alevines de esta especie. Para la consecución de estos objetivos se diseñaron y evaluaron técnicas moleculares para determinar los órganos diana del LCDV en el hospedador, tanto en infecciones agudas como en animales infectados de forma subclínica y en portadores recuperados de la enfermedad. Estas herramientas permitieron también la identificación de reservorios del virus en

las instalaciones de cultivo larvario de dorada, y el estudio de su implicación en la transmisión vírica. Por último, se planteó establecer si la artemia es susceptible a la infección por LCDV.

En primer lugar, se diseñaron, evaluaron y aplicaron métodos moleculares para la detección y/o cuantificación del LCDV en doradas cultivadas. El ensayo de PCR a tiempo real (qPCR) desarrollado constituye un método sensible, específico y fiable para la detección y cuantificación del LCDV en doradas, que permite determinar el estatus virológico de peces individuales, tanto enfermos como infectados de forma subclínica, mediante el muestreo de una porción de aleta caudal. Además, su empleo es también útil para la identificación de reservorios del virus en las piscifactorías o para estudios de replicación vírica en doradas.

El ensayo de LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) diseñado también permite la detección rápida y específica del LCDV con una sensibilidad comparable a la de la qPCR, pero presenta algunas ventajas comparado con otras técnicas moleculares para su aplicación en programas de vigilancia en instalaciones de acuicultura como pueden ser la duración del ensayo (la detección del LCDV puede conseguirse en menos de 60 minutos en muestras de dorada portadores del virus con infección subclínica) y la posibilidad de aplicarlo en condiciones de campo al utilizar una plataforma portátil y no requerir muestras de DNA de alta pureza. Esto es especialmente interesante cuando ocurren brotes de infección en piscifactorías y el tiempo para determinar la presencia del virus es limitado.

Por último, se desarrolló un protocolo que permite la detección de transcritos virales en cultivos celulares (ICC-RT-PCR) que ha demostrado ser una técnica rápida, específica y sensible para la detección y cuantificación de LCDV infectivos. Esta técnica puede ser una herramienta valiosa para estudios epizootiológicos y de transmisión, donde es necesario determinar tanto la presencia como la cantidad de virus infectivos.

El estudio de la patogénesis del LCDV se abordó empleando ensayos de qPCR y RT-qPCR para la cuantificación de genoma y transcritos virales, y protocolos de hibridación in situ para la detección de transcritos virales en secciones histológicas. También se realizaron estudios histopatológicos en doradas infectadas con LCDV para establecer la presencia de alteraciones histológicas asociadas a la enfermedad. Los resultados obtenidos indican que la infección del LCDV en dorada es sistémica, incluso en el caso de infecciones subclínicas, identificándose diferentes órganos como dianas primarias o secundarias para la replicación del virus. El curso de la infección por LCDV puede ser crónico, presentando los peces una infección persistente durante un periodo de tiempo no determinado. El tropismo del LCDV es muy amplio. Además de los fibroblastos de la dermis, que se convierten en linfocistos como consecuencia de la infección por LCDV, existen células en hígado, bazo, riñón, intestino y cerebro que son capaces de soportar una infección vírica productiva. Las células permisivas para la replicación del LCDV parecen ser fibroblastos, hepatocitos y células del sistema fagocítico mononuclear. Los cambios histopatológicos asociados con la enfermedad de linfocistis aparecen en diferentes órganos de alevines de dorada, y no siempre están relacionados directamente con la replicación del virus. Dichos cambios histopatológicos revierten cuando los peces se recuperan de la enfermedad.

En cuanto a las vías de transmisión del LCDV a larvas y alevines de dorada, se ha establecido la existencia de múltiples rutas para la transmisión horizontal del virus. Los estudios realizados han permitido comprobar que los reproductores asintomáticos de doradas son portadores del LCDV, y pueden liberar partículas víricas en sus fluidos reproductivos y/o excreciones, provocando la transmisión del virus a las larvas. Además, los rotíferos constituyen un vector de infección para el LCDV, tanto por el consumo de alimento contaminado por el virus, como por el agua de cultivo. También se ha demostrado que los metanauplios de *Artemia* pueden actuar como vector para la transmisión del LCDV a doradas. Por último, se ha comprobado que el LCDV provoca una infección productiva en *Artemia*, al menos en las condiciones experimentales utilizadas, lo cual extiende el rango de hospedador del LCDV a crustáceos. Esta es la primera descripción de un virus de peces que infecta también a un hospedador invertebrado.

Palabras clave: virus de la enfermedad de linfocistis, *Sparus aurata*, patogénesis, transmisión, acuicultura.

Publicaciones de la Tesis

Enlace al documento completo: <http://hdl.handle.net/10630/13956>

Borrego, J.J., Valverde, E.J., Labella, A.M., Castro, D. (2015). Lymphocystis disease virus: its importance in aquaculture. *Reviews in Aquaculture* (doi: 10.1111/raq.12131).

Valverde, E.J., Borrego, J.J., Castro, D. (2016a). Evaluation of an integrated cell culture RT-PCR assay to detect and quantify infectious lymphocystis disease virus. *Journal of Virological Methods*, 238: 52-65. (doi: 10.1016/j.jviromet.2016.09.016).

- Valverde, E.J., Cano, I., Labella, A., Borrego, J.J., Castro, D. (2016b). Application of a new real-time polymerase chain reaction assay for surveillance studies of lymphocystis disease virus in farmed gilthead seabream. *BMC Veterinary Research*, 12: 71. (doi: 10.1186/s12917-016-0696-6).
- Valverde, E.J., Cano, I., Castro, D., Paley, R.K., Borrego, J.J. (2017a). Rapid and sensitive detection of lymphocystis disease virus genotype VII by loop-mediated isothermal amplification. *Food and Environmental Virology*, 9: 114-122. (doi: 10.1007/s12560-016-9265-1).
- Valverde, E.J., Borrego J.J., Sarasquete, C., Ortiz-Delgado, J.B., Castro, D. (2017b). Target organs for lymphocystis disease virus replication in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Veterinary Research*, 48: 21. (doi: 10.1186/s13567-017-0428-3).