



INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

INFORME

ISSN 0378-7702

Volumen 38, Número 4

- Protocolo para evaluación de concha de abanico
- Protocolo para estudios sobre el proceso reproductivo de peces pelágicos y demersales
 - Sanidad en estanques de cultivo y en poblaciones silvestres de langostinos en Tumbes
- Estudios sobre el calamar gigante en primavera 2010 y verano 2011. Crucero B/P Hakurei Maru N° 8
- Experiencias en el sistema controlado para obtención de semillas de concha de abanico en Ilo, Moguequa
 - Diagnóstico y estado de la macroalga *Lessonia nigrescens* en el litoral de Arequipa



Octubre - Diciembre 2011
Callao, Perú

EL VIRUS DE LA MIONECROSIS INFECCIOSA (IMNV) EN POBLACIONES SILVESTRES DE *Penaeus vannamei* Y *P. stylirostris* EN TUMBES

THE INFECTIOUS MYONECROSIS VIRUS (IMNV) IN WILD POPULATIONS OF *Penaeus vannamei* AND *P. stylirostris* IN TUMBES

Rubén Alfaro Aguilera Mervin Guevara Torres

Sede IMARPE Tumbes

RESUMEN

ALFARO R, GUEVARA M. 2011. El virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV) en poblaciones silvestres de *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris* en Tumbes. *Inf Inst Mar Perú*. 38(4): 391-394.- El IMARPE Tumbes programó el 2007 el monitoreo de *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris* en los esteros de la Región, para detectar presencia y distribución del virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV). Se colectaron 2407 especímenes, y se concluyó que las poblaciones silvestres de *P. vannamei* y *P. stylirostris* se encontraban libres del virus.

PALABRAS CLAVE: IMNV, Prevalencia, *Penaeus vannamei*, *P. stylirostris*.

ABSTRACT

ALFARO R, GUEVARA M. 2011. The infectious myonecrosis virus (IMNV) in wild populations of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* in Tumbes. *Inf Inst Mar Perú*. 38(4): 391-394.- IMARPE Tumbes 2007 programmed monitoring of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* into the estuaries, to detect the presence and distribution of infectious myonecrosis virus (IMNV). 2407 specimens were collected, and concluded that wild populations of shrimp were free of the virus.

KEYWORDS: IMNV, Prevalence, *Penaeus vannamei*, *P. stylirostris*.

INTRODUCCIÓN

En el 2002, durante el periodo seco del estado de Piauí en Brasil, en algunas granjas de engorde de langostinos se registraron ejemplares que mostraban una progresiva opacidad muscular y mortalidades a partir de los 7 g. Inicialmente, se confundió esta sintomatología con una infección denominada enfermedad del algodón, causada por microsporidios que provoca una opacidad lechosa en la parte abdominal-caudal de los langostinos y que afecta principalmente a las especies de *Penaeus monodon* y *Fenneropenaeus merguensis* (NUNES et al. 2004).

Se enviaron muestras a la Universidad de Arizona, donde se descartó la presencia de microsporidios. Sin embargo, los análisis histopatológicos apuntaron hacia un síndrome de músculo acalambrado que tiene como sintomatología la necrosis muscular en el abdomen y cefalotórax, provocado por factores ambientales o nutricionales. Tras no encontrar el agente causal de la enfermedad se asumieron las siguientes hipótesis etiológicas: tóxica (causada por alguna cianotoxina), nutricional (deficiencia de vitamina

E), física (factores ambientales extremos) y viral o bacteriana (NUNES et al. 2004).

En el 2003, tras el anormal temporal de lluvias que se presentó en el estado de Piauí, que trajo como consecuencia un severo incremento en los nutrientes de las aguas y que condujo a floraciones excesivas de microalgas especialmente cianofitas, la prevalencia de la enfermedad se incrementó, ocasionando mortalidades progresivas durante varios meses, con pérdidas económicas estimadas en alrededor de US\$ 20 millones. No fue sino hasta mediados del mismo año, que se realizaron bioensayos de infección utilizando tejido de langostinos con la sintomatología de necrosis muscular y exponiendo a ejemplares de *Penaeus vannamei* libres de patógenos específicos, los que desarrollaron una alta prevalencia de necrosis muscular a los 12 días de cultivo, lo que dio indicaciones para la hipótesis viral; finalmente en el 2004 en la Universidad de Arizona se confirmó la presencia viral en los langostinos enfermos a través de microscopía electrónica. Este nuevo virus fue denominado virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV) (LIGHTNER et al. 2004a).

El IMNV, tiene una forma icosaédrica, sin envoltura o superficie de protección, de 40 nanómetros de diámetro, presenta un genoma de doble hebra simple (dsARN) molécula de 7560 bp. El análisis filogenético indica que puede pertenecer a la familia Totiviridae o representar una nueva familia de virus dsARN que infecta a invertebrados (POULOS et al. 2006).

La sintomatología típica de los camarones infectados por IMNV es la necrosis del músculo estriado del abdomen y cefalotórax, manifestándose como pérdida de la transparencia de la cola, que finalmente se necrosa y adquiere un color rojizo. Las mortalidades pueden ocurrir en todos los ciclos de cultivo de *Penaeus vannamei* aumentando conforme se incrementa la tasa de alimentación diaria, cuando los langostinos están sobre los 6 g. Las mortalidades a cosecha se calculan en alrededor del 70% (LIGHTNER et al. 2004b; NUNES et al. 2004). Se demostró por el método de Hibridación in situ que además de *Penaeus vannamei*, experimentalmente también son susceptibles de ser infectadas con el IMNV las especies *Penaeus stylirostris* y *P. monodon* (TANG et al. 2005).

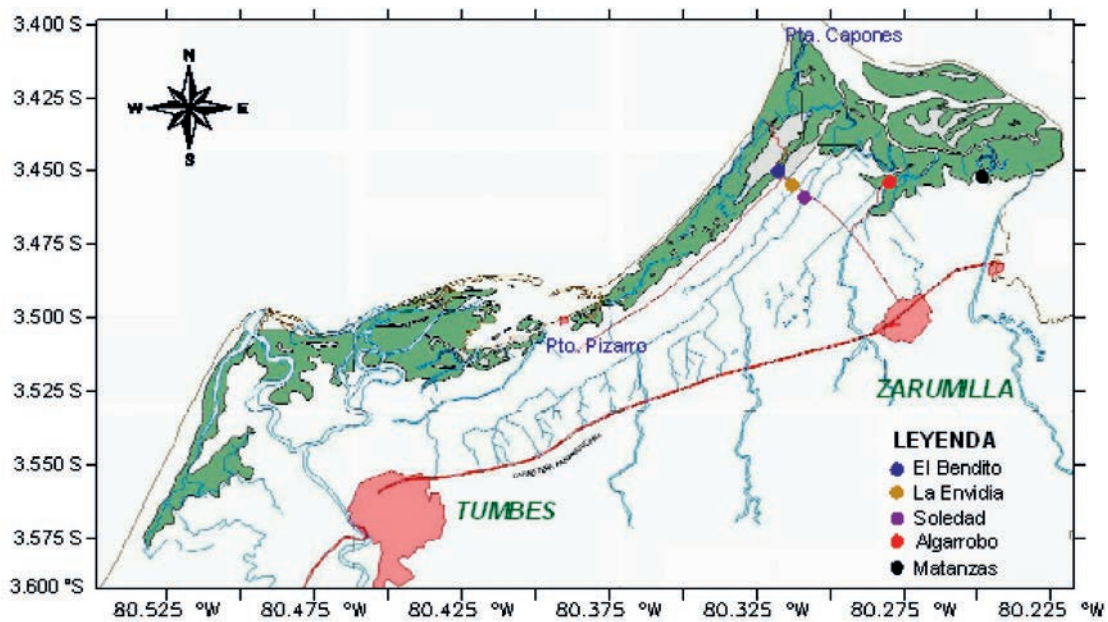


Figura 1.- Carta de las estaciones de muestreo del Virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV). Canales de marea del Manglar de Tumbes.

En 1999 en Centro y Sudamérica, la epidemia de la mancha blanca (WSV) causó grandes pérdidas en el cultivo de *P. vannamei*, y posteriormente la IMNV en Brasil, lo cual revela la necesidad de contar con un plan de contingencia ante nuevas epidemias. Los países que practican la vigilancia epidemiológica de sus poblaciones de animales silvestres tienen más probabilidades de detectar la presencia de enfermedades infecciosas, lo que permite adoptar medidas de prevención eficientes.

La zona norte del Perú, por su ubicación geográfica y gran actividad langostinera, está propensa al ingreso y establecimiento de diversas enfermedades exóticas de carácter bacteriano y viral, que pueden truncar el desarrollo acuícola local. Teniendo en cuenta que existen muchas langostineras informales que no toman las debidas precauciones en la importación de larvas para sus cultivos, la vigilancia y el seguimiento de brotes patógenos en poblaciones de animales silvestres revisten especial trascendencia ante el rápido movimiento transfronterizo de animales vivos y el estrecho contacto entre fauna silvestre y doméstica.

Uno de los grandes beneficios, derivados de un programa eficaz de vigilancia sanitaria de especies acuáticas en estado silvestre, en este caso del langostino, radica en la detección precoz de enfermedades nuevas, que aún no están presentes en los sistemas de cultivo de Perú, Ecuador y

Colombia como son el virus de la cabeza amarilla (YHV) de procedencia asiática, y el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV) de Brasil, las que podrían traer graves consecuencias económicas.

Este estudio tuvo como objetivo detectar la posible presencia y distribución del virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV), a través de un monitoreo constante de los esteros durante el período de febrero a diciembre 2007, por ser hábitat de langostinos nativos como *P. vannamei* (susceptible naturalmente) y *P. stylirostris* (susceptible experimentalmente).

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta de langostinos silvestres.- Se estableció cinco estaciones de muestreo en los esteros o canales de marea: El Bendito, La Envidia, Soledad, El Algarrobo y Matanzas (Fig. 1) La elección de estos lugares se hizo teniendo en cuenta que en estas zonas se encuentran muchas empresas langostineras informales, donde no existe control en cuanto a la posible introducción de enfermedades.

Tamaño de muestra y calendario de muestreo.- Se colectó un promedio de 20 ejemplares de juveniles y adultos por especie en cada estación de muestreo, para asegurar que el número acumulativo de ejemplares por especie y por estación exceda el número mínimo (150), necesario para lograr un nivel de confianza del 95% y con una prevalencia del

2%, para una población silvestre mayor a 100.000 individuos (DE CLERS 1994). Los muestreos se realizaron cada quince días, durante febrero a diciembre del 2007.

Procesamiento de las muestras.- Los ejemplares de langostinos colectados fueron colocados en bolsas de plástico rotuladas (estación, fecha, hora y temperatura de agua) y transportadas al laboratorio en un recipiente con hielo. En el laboratorio, para el análisis, se extrajo las branquias que se preservaron en etanol al 96%.

Extracción de ARN.- Para realizar la extracción de ARN se usó el Kit para detección de IMNV de IQ-2000™. Las branquias fueron maceradas en la solución de extracción, mezcladas con cloroformo y centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo, mezclada con isopropanol y centrifugada a 12.000 rpm por 10 min. El pellet recuperado fue lavado con etanol al 75% y centrifugado a 7.500 rpm por 5 min; se procedió a secar el pellet a temperatura ambiente y se disolvió en DEPC ddH₂O

Análisis por PCR.- La muestras fueron analizadas mediante la técnica de Nested PCR; el protocolo de amplificación está en el manual de procedimientos del Kit para detección de IMNV de IQ-2000™, que consiste en un primer paso de RT-PCR que consta de 15 ciclos y una Nested PCR de 30 ciclos de 94 °C por 20 s;

Tabla 1.- Número de ejemplares colectados por estación de muestreo, Tumbes. Febrero a diciembre 2007.

Estación de Muestreo (Esteros)	<i>Penaeus vannamei</i>	<i>Penaeus stylirostris</i>	Total de ejemplares colectados	Positivos a IMNV	Prevalencia (%)
Algarrobo	145	194	339	0	-
Soledad	400	30	430	0	-
El Bendito	167	279	446	0	-
La Envidia	378	298	676	0	-
Matanzas	387	129	516	0	-
Total	1477	930	2407	0	0

Tabla 2. Número de ejemplares colectados para el monitoreo epidemiológico de IMNV por trimestre. 2007

Trimestre	<i>P. vannamei</i>	<i>P. stylirostris</i>	Total	IMNV
Primer	333	206	539	Negativo
Segundo	342	288	630	Negativo
Tercer	368	180	548	Negativo
Cuarto	434	256	690	Negativo
	1477	930	2407	

Tabla 3.- Ejemplares colectados en canal de marea, para el monitoreo epidemiológico de IMNV por estación de muestreo. 2007

Canal de marea	<i>Penaeus vannamei</i>	<i>Penaeus stylirostris</i>	Total	IMNV
Algarrobo	145	194	339	Negativo
Soledad	400	30	430	Negativo
El Bendito	167	279	446	Negativo
La Envidia	378	298	676	Negativo
Matanzas	387	129	516	Negativo
	1477	930	2407	

62 °C por 20 s, 72 °C por 30 s y un ciclo adicional de 72 °C por 30 s, para finalizar 20 °C por 30 s.

Los amplicones fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% conteniendo 0,5 µg/µL de bromuro de etidio y en amortiguador TAE al 1X. En muestras positivas se obtendrá una banda de 284 bp.

Análisis de los datos.- El tamaño de muestra fue calculado usando el programa Win Episcopy 2.0 (BLAS y col. 1996), que se usa para medir la enfermedad en poblaciones animales en diferentes situaciones. Los datos se analizan para determinar la prevalencia usando la fórmula:

$$p = \frac{N^{\circ} \text{ de casos con la enfermedad en un momento dado}}{\text{Total de la población en ese momento}}$$

RESULTADOS

Se analizaron 2407 ejemplares (1477 fueron *P. vannamei* y 930 *P. stylirostris*), colectados en los diferentes ambientes naturales (esteros o canales de marea). Todos los ejemplares resultaron negativos al IMNV, obteniéndose que la población bajo estudio se encontrara libre de IMNV (Tablas 1, 2, 3).

DISCUSIÓN

Este estudio fue diseñado para detectar la presencia del virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV) en los langostinos silvestres *P. vannamei* y *P. stylirostris* de la Región de Tumbes, basados en la asunción de que dicho patógeno se encuentra en los ambientes naturales (canales de ma-

rea), infectando a estos peneidos que son susceptibles a contraerlo. Aun cuando se ignora si el IMNV puede estar presente en las zonas aledañas de cultivo, es importante el monitoreo constante de patógenos exóticos, para detectar a tiempo su aparición. Hay claras evidencias en acuicultura de que muchos patógenos que producen enfermedades en los sistemas de producción, tienen su origen en individuos silvestres de las mismas especies o de especies similares. Sin embargo, las condiciones que favorecen la aparición de epidemias en acuicultura raramente se encuentran en las poblaciones silvestres, previniendo la ocurrencia de enfermedades o efectos negativos sobre estas poblaciones, lo que no significa que tales efectos no existan.

El virus del IMNV se ha encontrado en Brasil, Indonesia y se sospecha su presencia en Tailandia y China. En Ecuador se reportaron casos de langostinos de cultivo con opacidad muscular sin razón aparente, signo clínico muy similar al causado por el IMNV; sin embargo, el análisis por PCR arrojó resultados negativos para este patógeno; así mismo, después de analizar las muestras de 2407 langostinos colectados de cinco estaciones, no se encontró ningún caso positivo al IMNV en este estudio, lo que supone que los canales de marea de la Región Tumbes estarían libres de este patógeno.

En esta investigación se tuvo en cuenta evitar la presencia de falsos negativos, para ello el kit de diagnóstico utilizado lleva incorporado en su sistema de análisis un control interno, que codifica una región específica para los decápodos; de esta forma se elimina la posibilidad de falsos resultados negativos causados por fallas en el proceso de extracción (ausencia de ADN o degeneración del mismo) o de reacción.

El nivel de sensibilidad de la técnica utilizada para el análisis de detección fue del 98%, el límite de detección de 10 copias por reacción, el cual es comprobado con el estándar positivo cuantificado (que supervisa la sensibilidad de detección). Esto respaldaría los resultados negativos encontrados como correctos.

En los trabajos publicados sobre este tema, el rango de hospederos para IMNV parece estar limitado al cultivo de *P. vannamei*, aun cuando *P. stylirostris* y *P. monodon* han sido experimen-

talmente infectados vía inyección con el virus purificado de la mionecrosis, no se han reportado mortalidades (TANG et al. 2005), sugiriendo que estas especies son naturalmente susceptibles al virus, pero son refractarias a los signos clínicos de la enfermedad.

Las interacciones entre enfermedades y la exposición a patógenos procedentes de organismos silvestres a cultivados, depende fuertemente de la situación actual del control de las enfermedades de los animales cultivados. La liberación de altos niveles de patógenos desde los estanques de cultivo al medio natural expone a las poblaciones silvestres, pudiendo conducir a la aparición de enfermedades en ellas, aun cuando las condiciones del medio no son favorables como detonante para una epidemia. Los animales silvestres pueden permanecer como infectados latentes, los cuales si llegan a establecerse en los sistemas de cultivo con grandes densidades y sumado a las fluctuaciones de temperatura, salinidad y nutrientes, podrían desencadenar una rápida propagación de cualquier patógeno. Sin embargo, cabe señalar que la identificación de individuos enfermos en poblaciones silvestres de animales acuáticos es bastante difícil. Existen datos disponibles que sugieren que cuando ocurre una epidemia en las poblaciones silvestres, ésta tiende a localizarse en una zona, diluyéndose finalmente

debido a las bajas densidades de los organismos susceptibles.

CONCLUSIONES

- No se detectó presencia de IMNV en las poblaciones silvestres de *P. vannamei* ni en las poblaciones de *P. stylirostris* en la Región Tumbes.
- Si la enfermedad de la Mionecrosis apareciera, será más fácil detectarla en estanques de cultivo, los cuales reúnen las condiciones favorables para la aparición de la misma.

RECOMENDACIONES

El monitoreo de la aparición del virus de la Mionecrosis debe realizarse en langostinos de cultivo, por ser estos los que reúnen las condiciones, ya que está confirmado que los brotes de IMNV aparecen típicamente inducidos por estrés.

REFERENCIAS

- BLAS I, ORTEGA C, FRANKENA K, NOORDHUIZEN J. 1996. Win Episcopa 2.0. Facultad de Veterinaria, Zaragoza y Universidad de Agricultura, Wageningen.
- DE CLERS S. 1994. Sampling to detect infections and estimate prevalence

- in aquaculture. Pisces Press University of Stirling. Scotland. 58 pp.
- LIGHTNER D, PANTOJA C, POULOS B, TANG K, REDMAN R, ANDREAS T, BONAMI J. 2004a. Infectious myonecrosis (IMN): a new virus disease of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 2004. Book of Abstracts. World Aquaculture Society. 353 pp.
- LIGHTNER D, PANTOJA C, POULOS B, TANG K, REDMAN R, PASOS DE ANDRADE T, BONAMI J. 2004b. Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. Global Aquaculture Advocate. Vol. 7: 85 pp.
- NUNES A, CUNHA P, VASCONSELOS T. 2004. Carcinicultura amenazada. Revista Panorama Acuicola. Disponible en web: http://www.panoramaacuicola.com/noticia.php?art_clave=977.
- POULOS BT, TANG KFJ, PANTOJA CR, BONAMI JR, LIGHTNER D. 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. J Gen Virol. Vol. 87 no. 4 987-996. doi: 10.1099/vir.0.81127-0
- TANG K, PANTOJA C, POULOS B, REDMAN R, LIGHTNER D. 2005. In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 63 (2-3):261-265.