

Resumen de los resultados obtenidos en el proyecto

En el presente proyecto se abordó en primer lugar el análisis filogenético de aislados de LCDV obtenidos a partir de doradas y lenguados cultivados, utilizando la secuencia del gen codificador de la proteína principal de la cápside (MCP). Estos estudios permitieron comprobar que los aislados de LCDV que infectan doradas y lenguados cultivados en nuestras latitudes pertenecen a un mismo genotipo dentro del género *Lymphocystivirus*, diferenciable de otros genotipos previamente establecidos y que infectan a otras especies de peces de diferentes áreas geográficas.

La similitud en la secuencia nucleotídica del gen de la MCP de los aislados de dorada posibilitó el diseño de cebadores específicos que se han utilizado para un ensayo de PCR a tiempo real que permite la detección y cuantificación del virus. Este protocolo metodológico se evaluó en términos de especificidad, sensibilidad, precisión y reproducibilidad. Se observó una relación lineal entre el número de copias de DNA plasmídico y los valores de C_t para un amplio rango de valores de concentración, de 10^6 a 2 copias, obteniéndose coeficientes de correlación (R^2) $\geq 0,988$ y una eficiencia de amplificación del $101,89 \pm 5,11\%$. También se obtuvo una buena sensibilidad en términos de concentración vírica, estimándose que 1 TCID₅₀ corresponde a una media de $1,3 \times 10^2$ copias de DNA vírico, existiendo una buena correlación entre la cantidad de virus analizada y el número de copias de DNA ($R^2 = 0,998$). La variabilidad intraensayo obtenida fue de $1,14 \pm 0,65\%$. En cuanto a la reproducibilidad, el coeficiente de variación (CV) inter-ensayo calculado fue de $2,51 \pm 0,40\%$. Estos valores de CV ($< 3\%$) se consideran aceptables para validar la precisión y reproducibilidad del protocolo de PCR a tiempo real desarrollado.

Este protocolo de PCR a tiempo real se ha aplicado para la detección y cuantificación del LCDV en muestras de doradas tanto enfermas (mostrando los síntomas típicos de la enfermedad de linfocistis) como sanas, así como en animales de distintos estadios de desarrollo recolectados en una misma piscifactoría con historial previo de linfocistis. Las cargas virales estimadas para los peces enfermos oscilaron entre $6,9 \times 10^4$ y $2,2 \times 10^2$ copias de DNA/mg de tejido, mientras que en las muestras de animales asintomáticos analizadas la carga viral osciló entre 1,3 y 22 copias/mg. En el caso de la muestra de huevos analizada, la carga viral estimada fue de 0,6 copias/mg.

La transmisión del LCDV a larvas de dorada se estudió utilizando huevos de dorada fertilizados procedentes de la hatchery de una piscifactoría con historial previo de linfocistis. En esta instalación se detectó la presencia de viriones infectivos de LCDV en huevos, larvas y alevines mediante observación de efectos citopáticos en la línea celular SAF-1. Así mismo, se analizó la sangre de los ejemplares de reproductores mediante PCR-hibridación, detectándose el virus en un 17,5% de las muestras analizadas. Los cultivos de rotíferos empleados para la alimentación de las larvas también dieron un resultado positivo para LCDV mediante PCR-hibridación.

Las larvas eclosionadas a partir de huevos contaminados con LCDV presentaron genomas virales en su epidermis en la fase endotrófica de crecimiento, lo que indicaría

que la infección de la epidermis la producen los viriones presentes en los huevos que pasarían al agua circundante. Una vez que se termina la fase de alimentación endógena, los viriones alcanzarían el digestivo, ya sea usando el agua como vehículo, o los rotíferos como vector. Cuando se utilizaron larvas eclosionadas a partir de huevos desinfectados con yodo activo (libres de contaminación por LCDV), la infección de la epidermis no se observa hasta la introducción de alimento vivo contaminado por LCDV, y ocurre a la vez que la infección del digestivo. Estos resultados indican que el LCDV puede transmitirse horizontalmente a larvas de dorada tanto por la piel (los viriones introducidos en el agua de cultivo con los huevos no desinfectados o con el alimento serían capaces de infectar la epidermis de las larvas), como a través del alimento.

La presencia de viriones de LCDV asociados a la superficie de los huevos fertilizados, y su implicación en la transmisión del virus a las larvas eclosionadas a partir de los mismos, plantea la posibilidad de la transmisión vertical de este virus. En sentido amplio, la transmisión vertical implica la transmisión de un agente infeccioso de una generación a la siguiente, no limitándose a la transmisión transovarial, en la que el agente se localiza dentro de los gametos o del embrión. En el caso del LCDV, los resultados obtenidos sugieren que la transmisión desde los reproductores sería a través de virus adheridos a la superficie del huevo. Para corroborar esta hipótesis habrá que estudiar la presencia del virus en el ovario de la dorada o en el fluido ovárico, y descartar que la contaminación de los huevos se deba a la presencia de mucus u otro material excretado por los reproductores (heces, orina...) en el agua de la puesta.

Por último, para determinar si las artemias son susceptibles a la infección por el LCDV se ha realizado un estudio con artemias infectadas experimentalmente, analizando en paralelo la carga viral en los animales inoculados (mediante PCR cuantitativa) y la expresión génica del virus (mediante RT-PCR relativa a tiempo real). La carga viral estimada para nauplios de artemia se incrementó en 4 órdenes de magnitud en el período de tiempo evaluado, de 3×10^2 copias DNA/mg de tejido en los nauplios procesados 24 h tras la inoculación, a $3,7 \times 10^6$ copias de DNA/mg de tejido para las artemias procesadas a los 8 d post-inoculación (p.i.). En todas las muestras de animales infectados experimentalmente analizadas fue posible detectar RNA mensajero de la MCP vírica. Cuando se analizan los valores de expresión génica, se observa un incremento muy importante de la expresión relativa del gen MCP a los 8 d p.i. Estos resultados demuestran que el LCDV es capaz de infectar los nauplios de artemia, al menos en condiciones experimentales, multiplicándose activamente en los tejidos del animal. Por tanto, la artemia debe considerarse un hospedador del virus, y no simplemente un vector mecánico. Estos resultados son muy relevantes desde el punto de vista científico, ya que constituiría el primer caso descrito de un arbovirus de peces (virus de vertebrados que infecta también invertebrados). Por ello, estamos realizando nuevas infecciones experimentales con otras cepas de LCDV para corroborar estos resultados, a la vez que se realizará un estudio de microscopía electrónica para observar las células hospedadoras del LCDV en las artemias.