



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

SEDE MANABÍ

CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

TRABAJO DE TITULACIÓN

**ESTUDIO FILOGENÉTICO Y GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE
LA MANCHA BLANCA (WSSV)**

PREVIO AL TÍTULO DE

BIÓLOGA MARINA

AUTORA

ANA ELENA AYONG FIGUEROA

DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

FRANCISCO HERNÁN POZO MIRANDA. M. Sc.

SEPTIEMBRE 2021

BAHÍA DE CARÁQUEZ, ECUADOR

CERTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Francisco Pozo Miranda, M. Sc.

TUTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

En mi calidad de tutor del trabajo de integración curricular, certifico haber revisado el presente manuscrito de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, cumpliendo la Normativa del Trabajo de Integración Curricular; en consecuencia, es apto para su presentación y sustentación.

Francisco Hernán Pozo Miranda, M. Sc.

C.C.: 0918330952

ACTA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador aprueba el presente trabajo de integración curricular en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Sede Manabí.

Gabriel Durán Cobo, M. Sc.

Primer lector

Juan Carlos Murillo Posada. M.Sc.

Segundo lector

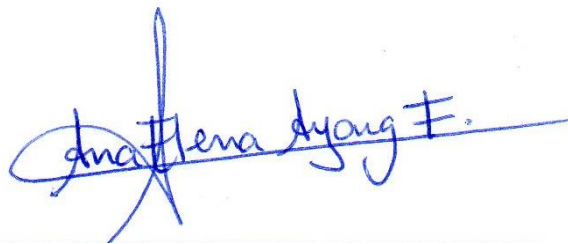
Evelyn Arias Cedeño, M.Sc.

Tercer lector

Bahía de Caráquez, septiembre de 2021

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Este manuscrito no contiene ningún tipo de material que ha sido aceptado para la obtención de un título universitario en otra institución, excepto en forma de información de soporte que ha sido debidamente citada en mi trabajo. Este trabajo es de total responsabilidad del autor, quien declara bajo juramento que ninguna sesión de este trabajo de integración curricular infringe los derechos de autor de nadie.

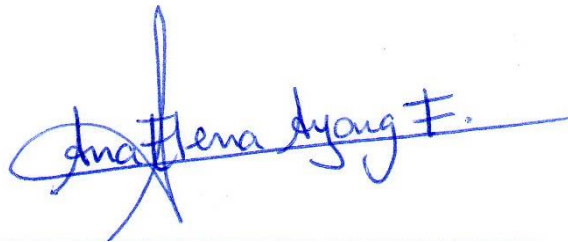


Ana Elena Ayong Figueroa

C.C.: 131335132-0

DECLARACIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a distribuir este manuscrito de investigación en medios físicos y electrónicos con el fin de promover la divulgación de mis resultados a la comunidad científica y a la sociedad en general. Adicionalmente autorizo el uso de los contenidos de esta investigación como bibliografía para fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, citando como fuente de información al autor de este trabajo.

A handwritten signature in blue ink, reading "Ana Elena Ayong F.", written over a horizontal line.

Ana Elena Ayong Figueroa

C.C.: 131335132-0

Email: anaelenaayong24@gmail.com

Teléfono: 0960244695

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser mi luz.

A mi madre por darme su apoyo incondicional.

A mi hermano Marcos por ser uno de mis pilares.

A Irma Betancourt, Cristóbal Domínguez, Rosita Malavé, Ramiro Solórzano, Juan Carlos Muñoz, Mayu Sotomayor, Ceci Tomalá, Betsy Andrade, Bolívar Chalén, Paúl Guillén, Pablo Bonati, Julio Arriaga, a las señoras Francia Gonzabay, Emma Choez y Ceci Rodríguez, Sandrita Rodríguez, Alionte Carvajal, Pascualito, Alexita y Señora Nancy, por ser siempre un gran apoyo incondicional y ser parte de mi aprendizaje.

A mis amigos incondicionales que de una u otra manera nunca me dejaron caer y me alentaron a continuar, Gigi, Nicolás, Alexandra, Sandy, Caro, Karlita, Carmita, Zaidita, mi Chati, Cecilia y Valeria.

A mi amigo, el máster Gustavo Naranjo, por incondicional y estar presto siempre a ayudarme en cada paso de este proyecto.

Agradezco a la PUCE MANABÍ, especialmente a mi querida Verito Muzo por estar siempre pendiente de mí y alentándome a por fin terminar mi carrera.

Finalmente, a mi tutor de tesis, el más paciente y risueño, Francisco Pozo, M. Sc. por brindarme su apoyo y dirección en todo momento de la manera más atenta.

DEDICATORIA

A mi Padre Celestial.

A mi abuela Paulina.

A mi madre María Elena y a mi mami Paula.

A mi hermano Marcos.

A mis tíos: Mario, Nieve, Jorge y Carmen Mora.

A mi Anita y mi Draguito.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	6
- <i>Obtención de secuencias</i>	6
- <i>Análisis Filogenético</i>	6
- <i>Genotipificación de Genoma Completo</i>	6
RESULTADOS	8
- <i>Secuencias de Análisis</i>	8
- <i>Filogenia</i>	8
- <i>Genotipificación de Genoma Completo</i>	10
- <i>Evaluación de genotipado VP28 y VP19</i>	13
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	18
RECOMENDACIONES	19
LITERATURA CITADA	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nombre, código de acceso y país de origen de aislados de secuencias de WSSV en NCBI.....	8
Tabla 2. Tabla 2. Matriz de identidad entre cepas evaluadas de WSSV.....	10

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La historia evolutiva.....	9
Figura 2. Matriz de identidad de secuencias.....	12
Figura 3. Evaluación de la alineación del gen VP28 responsable de la virulencia de WSSV.....	14
Figura 4. Evaluación de la alineación del gen VP19.....	14

RESUMEN

Este estudio semicuantitativo evaluó las principales cepas del virus de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) registradas en *The National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, para establecer su filogenia y genotipificación, y dilucidar el efecto de la virulencia que afecta la supervivencia de los cultivos de camarón. Consiguientemente, este estudio se ejecutó mediante análisis bioinformático (*in silico*) en Bahía de Caráquez, Ecuador, durante febrero y marzo de 2021. Para ello, se realizó un árbol filogenético y una evaluación genética de las proteínas estructurales VP19 y VP28. Los resultados del árbol filogenético muestran que las cepas más afines son China y Taiwán con 98,7%, mientras que la cepa de Ecuador y una segunda cepa de China presentan similitud de 95,7% determinando que dos variantes generan problemas en América. En cuanto al genotipado del gen VP28, se observa variación en los genes de China (CN03 y CN04) y Australia en posición Glicina 49, y en la cepa CN02 en la posición 56; en el gen VP19, las variaciones se presentan en CN03, CN04 y Australia en la posición Alanina 90. Esto permite concluir que mediante el uso de la filogenia se establece cercanía de la cepa reportada en Ecuador, y lejanía de la cepa de alta virulencia de Taiwán; en cuanto a la genotipificación, se establece el cambio entre Isoleucina por Asparagina en VP19 que afecta la virulencia, aunque este cambio no se observa para la cepa de Ecuador.

Palabras clave: WSSV, filogenia, virulencia, genotipado

ABSTRACT

This semi-quantitative research study evaluated main white spot syndrome virus (WSSV) strains recorded by the National Center for Biotechnology Information (NCBI), in order to determine their phylogeny and genotyping, and clarify the effects of virulence that affect shrimp farming survival. Consequently, this research study was carried out through a bioinformatic analysis (*in silico*) in *Bahía de Caráquez*, Ecuador, from February through March 2021. For this purpose, a phylogenetic tree and a genetic evaluation of the structural proteins VP19 and VP28 were performed. The findings from the phylogenetic tree reveal that the most closely related strains are China and Taiwan (98.7%), while the strain observed in Ecuador and a second one in China share 95.7% of similarity determining that two variants cause problems in America. As per genotyping of the VP28 gene, variations are seen in the genes from China (CN03 and CN04) and Australia for glycine at position 49, and in the strain CN02 at position 56; in the VP19 gene, variations are seen in CN03, CN04 and Australia for alanine at position 90. This makes it possible to establish that there is closeness to the strain reported in Ecuador, and remoteness of the highly virulent strain circulating in Taiwan; considering genotyping, it is established the change from isoleucine to asparagine in the VP19 gene, which affects virulence, even though this change is not seen in the Ecuadorian strain.

Keywords: WSSV, phylogeny, virulence, genotyping

INTRODUCCIÓN

Los cultivos de camarón a escala comercial iniciaron con la producción de *Penaeus monodon* como una de las primeras especies en ser cultivadas en Taiwán en 1968, con una buena aceptación en el mercado; posteriormente hubo un crecimiento exponencial de la acuicultura, teniendo como especies importantes a *P. monodon*, *P. indicus*, *P. merguensis* y *P. chinensis*; siendo en América Central y América del Sur las especies *P. vannamei* y *P. stylirostris* las más representativas (Castro Lara, J. L., 2010).

La industria camaronera en Ecuador es el segundo producto más importante en la economía del país. La misma se ha expandido rápidamente aportando un 5% de la producción acuícola total a nivel mundial hasta el año 2014. La industria tuvo sus inicios en la década de los 70 y 80 por la gran cantidad y disponibilidad de salitrales, encontrando en ella una actividad rentable (FAO, 2016).

La camaronicultura en Ecuador se ha visto afectada por innumerables enfermedades, entre ellas, el Síndrome de la Mancha Blanca, el cual empezó con brotes en junio de 1999 devastando la producción camaronera del país, variando su mortalidad del 60 al 95 % entre 5 a 8 días después de la aparición de los signos clínicos en época cálida.

Los brotes inician habitualmente entre los 30 a 40 días después de la siembra en estanques. En un estudio realizado por Rodríguez et al., (2003) se demostró mediante encuestas que no existieron diferencias significativas en la época seca-húmeda; mientras que las épocas calientes fueron comparadas entre sí. En la época seca-fría se vio una diferencia, la cual indicaba que existía mayor prevalencia de la enfermedad.

Las manchas blancas no siempre se encuentran presentes en los animales infectados, estas manchas en su mayoría se encuentran en la parte interna del cefalotórax, así como existe coloración rojiza en el cuerpo y en la hemolinfa de animales moribundos (Rodríguez et al., 2003).

- *El síndrome de la mancha blanca*

El síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) causada por un virus de doble cadena de ADN de forma elíptica a cilíndrica, cuya membrana es trilaminar, catalogado

por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) como único miembro del nuevo género *Whispovirus* y de la familia *Nimaviridae*. (Mayo M.A, 2002).

Considerándose el principal problema viral para crustáceos (Kou et al., 1998). Según la Organización Mundial de Salud Animal (Lo, 2012) este virus es capaz de provocar mortalidades masivas en periodos cortos de tiempo, llegando a desaparecer en su totalidad poblaciones de cultivos en períodos de tres a siete días, a partir de la aparición de los primeros síntomas (Bustillo-Ruiz, Escobedo-Bonilla, et al., 2009). En estanques de cultivo es viable en agua por doce días y en sedimento por tres, este se inactiva después de 120 minutos a 50 °C y 1 minuto a 60 °C; su ciclo de replicación se da en 20 horas a 25 °C. (Cuéllar-Anjel, J., 2013).

El virus tiene un genoma circular de doble hebra de ADN de ~300 kb de tamaño es el único miembro del nuevo género de virus *Whispovirus* de la nueva familia *Nimaviridae*. Siendo uno de los genomas más grandes de virus animal. El genoma de WSSV codifica 184 marcos de lectura abiertos (ORF) siendo la mayoría de función desconocida (Müller et al., 2010).

- **Genoma**

Los aislados geográficos son muy similares (identidad > 99%), con excepción de 5 regiones del genoma: largas deleciones (□13 kb) en la región ORF23/24, región proclive a recombinación en la región 14/15, región que codifica para una transposasa, número variables de repeticiones en tándem (VNTR) dentro de las regiones codificantes de ORF75, ORF94 y ORF125 y polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs); las variaciones en las regiones 23/24 y 14/15 son usadas para identificación evolucionaria de cepas de WSSV, mientras que, los VNTR son usados en epidemiología porque podrían estar asociados a virulencia diferencial (Müller et al., 2010).

La secuencia completa del genoma del virus fue determinada en tres aislados distintos de China, Tailandia y Taiwán, en total ambas cadenas contienen entre 531 a 684 marcos de lectura abierta (ORF), formados por un codón de inicio ATG y de terminación. Los tres aislados de WSSV manifiestan diferencias de tamaño; el aislado chino presenta 305107 pb (AF332093), el aislado de Taiwán presenta 307287 bp (AF440570), y el aislado de Tailandia siendo el más pequeño con 292967 pb (AF369029). Las variaciones de tamaño posiblemente se deberían a deleciones de aproximadamente 12 kbp., indicando inestabilidad genética (Bustillo-Ruiz et al., 2009).

El aislado tailandés contiene cerca de 184 ORFs, y un aproximado de cinco proteínas estructurales mayores como VP15, VP24 y VP26 corresponden a la nucleocápside, VP19 y VP28 están asociados a la envoltura del virión (Garza et al., 2007).

En Ecuador se registró un aislado con 288,997 pb (MH090824.1), recibe el código WSSV-EC-15098 presentando una identidad de nucleótidos entre el 99,7% y el 99,9%, con las secuencias disponibles en ese entonces, siendo WSSV-CN el más cercano relacionado y WSSV-KR el más distante. El virus de Ecuador presenta deleciones con fragmentos de 3.24 kb que contienen los ORF VP22 y VP25 todos anotados como proteínas de la envoltura, y un fragmento de 17,04 kb que incluye el ORF VP35, anotado como una proteína de la cápside; esta cepa está muy extendida en el país, sin embargo, causa la tasa más baja de mortalidad del camarón (Restrepo et al., 2018a).

En base a lo expuesto, el objetivo del presente estudio fue comparar filogenéticamente los genomas de las cepas patógenas del virus de la mancha blanca disponibles en las bases de datos mundiales del NCBI.

Las enfermedades de camarón son altamente contagiosas, y en Ecuador la mancha blanca ha provocado grandes pérdidas económicas en la industria camaronera generando graves problemas sociales. Sin embargo, al pasar los años se ha convertido en un patógeno endémico en la mayoría de los países afectados, manteniendo cierto riesgo de altas mortalidades en los cultivos.

La presente investigación está enfocada en identificar mediante herramientas bioinformáticas las posibles variaciones en el genoma de WSSV (Virus del Síndrome de la Mancha Blanca), así se busca estimar la diversidad genética del patógeno que ataca principalmente a *Penaeus vannamei*, para contribuir al manejo de la enfermedad en los cultivos del sector camaronero ecuatoriano. Esto se realizará mediante un estudio filogenético de cepas patógenas del virus de la mancha blanca WSSV para definir el estado de virulencia entre las cepas reportadas en la base de datos NCBI, para así desarrollar una búsqueda mediante bases de datos los principales aislados del genoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

- *Obtención de secuencias*

Las secuencias de los 13 aislados fueron obtenidas de la página de The National Center for Biotechnology Information (NCBI), con sus respectivos códigos de acceso. Se asignaron nombre resumidos para las diferentes secuencias obtenidas, a fin de analizar los resultados.

- *Análisis Filogenético*

Se realizó una alineación de secuencias en Clustal W -2.1 for Linux (Thompson et al., 2003), con los parámetros por defecto, este análisis se llevó a cabo en el servidor de Analítica NOGAN S.A.

Posteriormente se siguió el procedimiento descrito por Kumar et al., (2016), a partir del alineamiento se hizo una construcción del árbol filogenético con un modelo de Máxima Verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei., en el programa MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbour-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima probabilidad compuesta (MCL), y luego seleccionando la tipología con un valor de probabilidad logarítmico superior.

El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 13 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 263.508 posiciones en el conjunto de datos final. El árbol final fue modificado gráficamente para insertar nombres y colores de leyendas, en el software InkScape.

- *Genotipificación de Genoma Completo*

Al analizar genomas completos con una alta cantidad de pares de bases, resulta complicado presentar los distintos genotipos que se presentan en diferentes genes y regiones codificantes.

Por lo cual se realizó una comparación masiva de todo el genoma de manera gráfica mediante la herramienta BLAST Ring Image Generator (BRIG) (Alikhan et al., 2011), en lo cual se pueden encontrar regiones de alta variabilidad (Hot Spots), así como deleciones e inserciones.

Para el uso de este programa se tomó como secuencia de referencia, el genoma del aislado de WSSV obtenido en China (CN) (AF332093.3) y las anotaciones de los genes asociados a esta secuencia. Se insertó manualmente los nombres de la región de codificación del gen, también conocida como CDS en las anotaciones generadas en esta secuencia, y solamente se programó que se presenten en el gráfico los genes que tienen un tamaño considerable (aproximadamente superior a 1Kb) para que sea distinguible gráficamente. Además, se programó el software para que dentro del anillo correspondiente se presente una disminución de color cuando se encontraban similitudes menores al 90% con la secuencia de referencia.

Finalmente se realizó una inspección minuciosa del ingreso de datos correspondientes a los CDSs, así como discordancias de colores y formatos antes de exportar el gráfico circular de comparación de genomas.

RESULTADOS

- *Secuencias de Análisis*

En la exploración de los genomas completos en la plataforma NCBI, se pudo identificar 13 secuencias genómicas con sus respectivos códigos de acceso, se encontraban anotadas y ensambladas dentro del Proyecto de Genomas del NCBI. Entre las cepas obtenidas están AF332093.3, la cual corresponde a la cepa de referencia en el trabajo de Restrepo 2018, para ensamblar el genoma del aislado proveniente de Ecuador (Tabla 1).

Tabla 1. Nombre, código de acceso y país de origen de aislados de secuencias de WSSV en NCBI.

Secuencias		
Nombre Asignado	Cód. Acceso	País
WSSV AU	MF768985.1	Australia
WSSV CN	AF332093.3	China
WSSV CN01	KT995472.1	China
WSSV CN02	KT995470.1	China
WSSV CN03	KT995471.1	China
WSSV CN04	KY827813.1	China
WSSV CN05	KX686117.1	China
WSSV K-LV1	JX515788.1	Corea del Sur
WSSV-EC-15098	MH090824.1	Ecuador
WSSV IN	MG702567.1	India
WSSV MEX2008	KU216744.2	México
WSSV TH	AF369029.2	Tailandia
WSSV TW	AF440570.1	Taiwán

- *Filogenia*

A partir del alineamiento con Clustal W se generó una matriz de comparación de identidad global entre todos los genomas analizados, a fin de comparar porcentualmente las diferencias existentes entre los genomas. Se encontró que la cepa proveniente de la India presentaba los porcentajes más bajos de similitud con las 12 cepas restantes, siendo la menor similitud en

toda la comparación entre esta cepa y la cepa china CN01 con un 89,2%. Una baja similitud también fue encontrada entre las cepas chinas CN01 y CN03 (89,8%) así como entre CN01 y CN04 (90,1%). Por otro lado, las cepas CN (China) y TW (Taiwán) fueron las más idénticas con un 98,7%, seguida de una alta similitud entre la cepa mexicana (MEX2008) y la cepa coreana (K-LV1) con un 98,1%.

La cepa EC15098 proveniente de Ecuador, presentó en similitudes inferiores al 96% con las 11 cepas restantes, solamente hubo una identidad superior con la cepa tailandesa (TH) (96,5%). La cepa con menos similitud fue la cepa china (CN01) que presentó una identidad de 93,4% (Fig. 1).

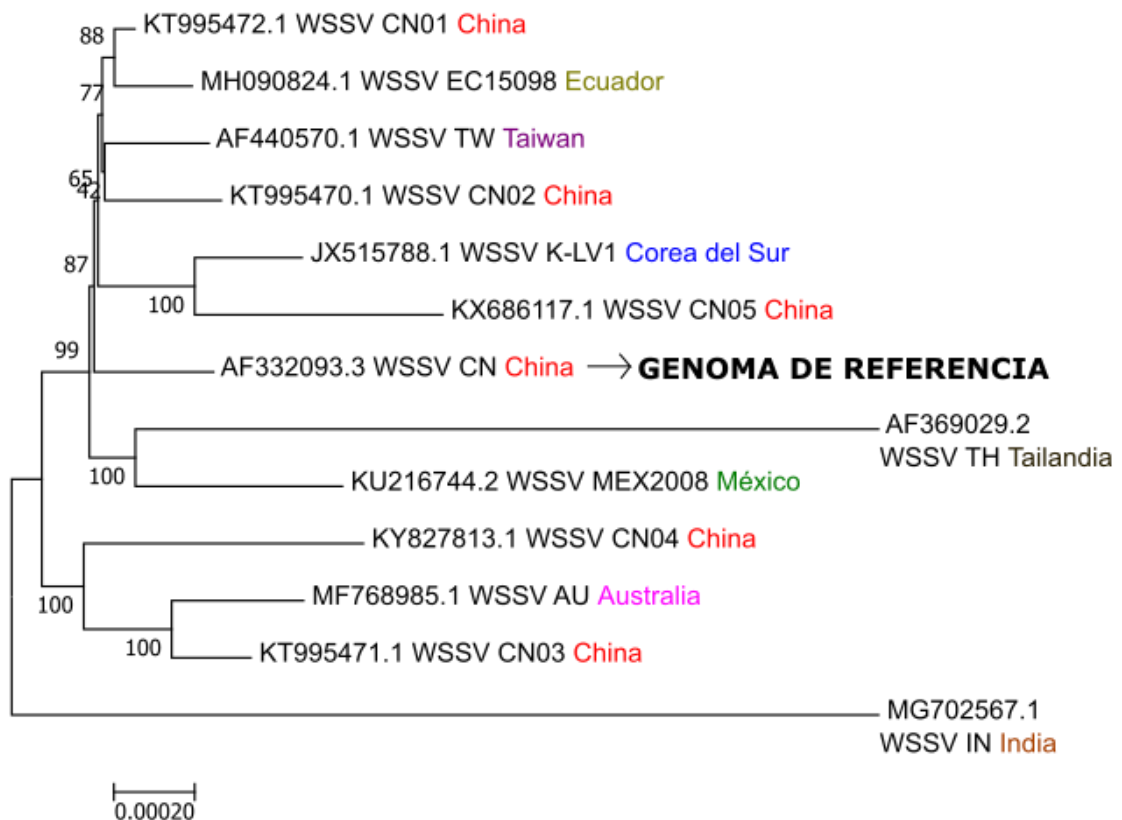


Figura 1. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) basado en el modelo Tamura-Nei. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-381313,96). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas.

En la tabla 2, se observa la matriz de identidad de secuencias de las cepas analizadas y se distingue por color el porcentaje de similitud entre estas.

Las cepas CN y TW las más afines con un 98,7%, las cepas EC15098 y CN02 con 95,7%. Se puede observar que variantes generaron problemas de mortalidad en América (EC15098 y MEX2008), solo la variante mexicana tiene más homología (97.5) con la cepa de referencia CN. La variante EC15098 disminuyó su identidad a 94.7 ± 1.4 .

	CN	CN02	CN03	CN04	TW	AU	K-LV1	CN05	CN01	EC15098	TH	IN	MEX2008
CN		96,220	91,573	91,879	98,725	93,229	96,802	96,519	97,254	94,575	95,116	91,246	97,466
CN02			92,994	93,503	95,338	94,477	96,597	96,269	94,244	95,733	94,774	92,294	97,103
CN03				97,482	90,931	96,912	93,144	92,404	89,781	95,224	93,855	93,904	92,990
CN04					91,228	96,677	93,615	92,826	90,113	95,714	94,181	94,123	93,277
TW						92,588	96,108	95,711	97,078	93,730	94,312	90,484	96,557
AU							95,020	93,732	91,390	94,924	93,641	93,277	94,412
K-LV1								97,800	94,490	94,845	95,725	92,288	98,108
CN05									94,255	94,525	95,516	91,751	97,774
CN01										93,393	92,833	89,222	95,176
EC15098											96,531	94,703	95,515
TH												93,742	96,627
IN													92,728
MEX2008													

Tabla 2. Matriz de identidad entre cepas evaluadas de WSSV.

- Genotipificación de Genoma Completo

La comparación gráfica realizada en BRING (BLAST Ring Image Generator) permitió la visualización de las principales diferencias entre las cepas analizadas. Se encontró que los genomas en comparación con el genoma de referencia tienen varias deleciones en todo el cromosoma. Solamente el genoma CN01 conservaba la misma estructura sin deleciones o inserciones apreciables (Figura 2).

La cepa taiwanesa (TW) presentó una estructura muy similar a la referencia, solamente se encontró una pequeña deleción de menos de 1Kb en una ubicación aproximada de 272 Kb del genoma de referencia. Esta deleción también fue encontrada en las restantes 9 cepas, siendo en algunas más amplias y en otros casos más cortas. Esta deleción se encuentra entre los CDSs (Coding Sequence) wsv457 a wsv 464, por lo que puede tener un efecto deletorio en las proteínas originarias de estos CDSs.

Estas 9 cepas, presentan deleciones en la zona entre los 280Kb a 289Kb, las cuales son de tamaño variable. En las cepas chinas (CN02 y CN05), la cepa mexicana y la cepa coreana, se encuentra una deleción de aproximadamente 3 Kb ubicadas entre 286Kb a 289 Kb. En la cepa china CN03 y la cepa australiana se presentan dos deleciones, una similar a las cepas anteriores mencionadas y otra de aproximadamente 2 kb ubicadas entre los 281 Kb a 283 Kb, entre estas se encuentra una región no delecionada de aproximadamente 3 Kb (entre 283 Kb y 285 Kb) que corresponde al CDS wsv489. Por otro lado, en la cepa china CN05, cepa ecuatoriana, cepa taiwanesa y cepa india esta deleción ocupa toda la zona de los 9 Kb, e inclusive la cepa india presenta una deleción extra de 2 Kb en la zona de los 290 Kb a 292 Kb.

Todas las 9 cepas mencionadas anteriormente, presentan pequeñas secuencias intercaladas dentro de la deleción 3 Kb ubicadas entre 286Kb a 289 Kb. Además, todas estas cepas presentan una alta variabilidad de secuencia en la zona de los 289 Kb a 291Kb correspondiente a un CDS de gran tamaño, wsv497. En todas las deleciones y variaciones de secuencia mencionadas en esta zona de interés, se puede observar que tienen efecto en los CDSs desde wsv479 a wsv497.

Otra zona notable de deleción se encontró entre los 132 Kb y 140 Kb. En la cepa china (CN02) se encontró una deleción de aproximadamente 4 Kb entre los 133 a 137 Kb, mientras que en la cepa india (IN) se encontró una deleción más grande de aproximadamente 6 Kb entre las regiones de 135 Kb a 141 Kb. Por otro lado 4 cepas (CN03, CN04, EC15098 y AU) presentaron una deleción de 3 Kb ubicada entre los 135 Kb a 138 Kb. En toda esta zona se encuentran los CDSs desde wsv231 a wsv244, notándose la presencia de CDSs con función asignada VP41B, VP52A y VP41A en los cuales puede haber una pérdida de función deletérea o la completa inexistencia de estas proteínas dependiendo la cepa en la que se presente la deleción.

Además de estas regiones notables de variación, se encontraron otras varias regiones con deleciones de tamaños menores a los 3 Kb a lo largo de todo el genoma en distintas cepas, destacándose una deleción de aproximadamente 3Kb en 3 cepas (AU, CN03 y CN04) que puede tener efecto en los CDSs con función asignada VP31, VP39 y VP62.

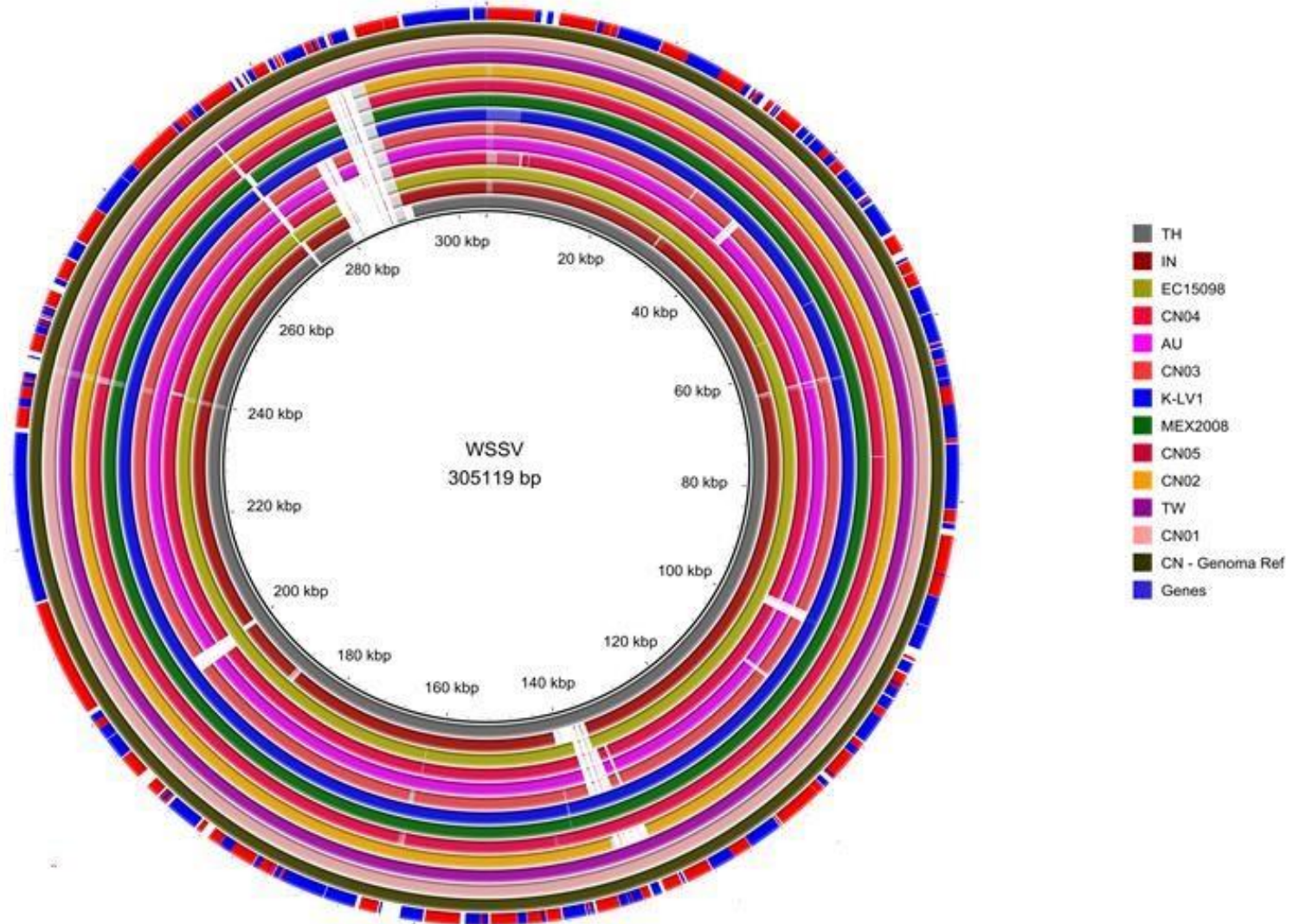


Figura 2. Matriz de Identidad de Secuencias

- ***Evaluación de genotipado VP28 y VP19***

Se evaluó el genotipado de VP28 y VP19, por ser responsables de la evasión a la respuesta inmune celular de camarones.

En la Figura 3, se observa la alineación del gen VP28, y la variación en los genes procedentes de cepas China (WSSV CN03 y WSSV CN04) y de la cepa de Australia en la posición del aminoácido Glicina 49, mientras que la cepa WSSV CN02 se observa en la posición 56.

En el gen VP19, las cepas que varían su constitución de aminoácidos se observaron en WSSV CN03, WSSV CN04 y WSSV AU en la posición 90 (aminoácido Alanina). Otras modificaciones fueron en WSSV CN02 con la presencia de Ácido aspártico, WSSV CN04 con Triptófano en la posición 132 y WSSV TH con Asparagina en posición 54 (Figura 4).

DISCUSIÓN

Los estudios de filogenia permiten evaluar las relaciones evolutivas no solo entre especies, sino también secuencias, esto permite establecer la tasa de identidad con un ancestro común.

Los genomas WSSV- CN y WSSV-TW son considerados como los ancestros de WSSV (Dieu et al., 2004; Pradeep et al., 2008). Según Restrepo et al. (2018), el aislado WSSV-EC15098 está estrechamente relacionado con WSSV-CN y posee más distancia con la cepa WSSV-KR, sin embargo, en este estudio mediante el análisis filogenético el aislado más cercano es WSSV-CN01 y el aislado de la India resulta más distante.

Esto nos permite establecer la evolución entre las cepas, provocadas por los sistemas de cultivos, especies de crustáceos hospedadores, organismos susceptibles, hacinamientos, temperatura de manejo, factores que se modifican de acuerdo con los protocolos de producción en cada país que resultan en alta presión selectiva (Wilton, 1992). La cepa india presento estar muy alejada de las cepas ancestro común, esto pudo ser provocado por las altas tasas de mutación o variación molecular pudiendo ser producto de la constante replicación viral por año (Troyer y Kurath, 2003). Cada pasaje viral entre hospederos va alterando la patogenicidad y provocando variación genómica en sus CDS, tratando de estabilizar su genoma a fin de adaptarse en hospederos diferentes (Sindhupriya et al., 2014).

- *Cepas*

En el caso del síndrome del virus de la mancha blanca (WSSV), cuyo genoma completo es de ~ 305 kpb. Los reportes de los genomas completos de cepas en las bases de datos eran muy escasos (2005-2009) con 9 reportes (Restrepo et al., 2018b), en la actualidad (2021) existen 13 genomas, lo cual facilita una comparación más completa sobre los clados formados y las similitudes entre cada cepa, permitiendo comprender mejor las estrategias de virulencia desde la vista molecular.

- ***Filogenia***

Para construcción del árbol filogenético se consideró los 13 genomas completos, se pudo confirmar que el genoma del aislado de Ecuador está relacionado con los genomas de otros países; mientras que los genomas WSSV- CN y WSSV-TW son considerados como los ancestros de WSSV (Dieu et al., 2004; Pradeep et al., 2008). Cinco cepas secuenciadas tienen relación directa con los genomas WSSV-CN y WSSV-KR; según Restrepo et al., (2018) el aislado WSSV-EC-15098 está estrechamente relacionado con WSSV-CN siendo WSSV-KR el más distante.

En este estudio mediante el análisis filogenético con genoma completo el aislado más cercano fue WSSV-CN01 y el más distante el de la India, nos permite presumir que efectivamente la presión de selección que existe sobre este virus también está presente. Por otro lado, WSSVEC-15098 mostró menos similitud a la cepa del ancestro común, esto pudo ser provocado por las altas tasas de mutación o variación molecular como producto de la constante replicación viral por año (Troyer y Kurath, 2003). Cada pasaje viral entre hospederos va alterando la patogenicidad y provocando variación genómica en sus ORF, tratando de estabilizar su genoma a fin de adaptarse en hospederos diferentes (Sindhupriya et al., 2014).

- ***Genotipificación***

La genotipificación nos ayuda a comprender mejor la estrategia de virulencia que poseen los virus, principalmente las interacciones huésped-patógeno en camarones (Cruz-Flores, *et al.*, 2020). Es importante en todo ataque viral realizar un análisis de rango de hospedero, basado en los tipos de proteínas estructurales en el genoma. En el caso de WSSV las proteínas VP 26, VP 24 y VP15 se relacionan con la nucleocápside, que protege al material nuclear viral, mientras que las VP28 y VP19 se asocian con la envoltura del virión. Esta última estructura se asocia con la virulencia del virus WSSV, debido a que le permite evadir a la respuesta inmune del organismo, y a su vez ayuda al ataque viral en la célula.

Aun cuando todas las cepas reportadas resultan ser altamente virulentas, en este estudio se realizó el análisis de genotipificación de los genes VP28 y VP19, en busca de definir

cambios en la composición de sus aminoácidos. Se estableció que el gen VP19 muestra más variación en la composición de aminoácidos. Estudios de infección asistida muestra que las cepas de Tailandia WSSV TH que difieren en el tamaño de su genoma, disminuye levemente la virulencia en ensayos con branquias de camarón, indicando que las posibles deleciones de su genoma afectan el índice de virulencia (Bustillo-Ruiz et al., 2009). Estas deleciones generan cambios la codificación de aminoácidos.

En el presente trabajo, en la cepa evaluada de Tailandia notamos solo el cambio en el gen VP19 de una Isoleucina (punto isoeléctrico 6,02) por Asparagina (punto isoeléctrico 5,41), lo que demuestra que el cambio de un aminoácido de constitución neutro por un aminoácido en posición 54 de constitución ácida, es responsable de la leve disminución de la virulencia.

CONCLUSIONES

El estudio filogenético estimado por el método de máxima verosimilitud de los 13 genomas mostró que el genoma de la cepa aislada en la India está completamente separado de las demás, se formaron dos clados definidos, en donde la cepa ecuatoriana EC15098 comparte estrecha relación con las cepas CN01, CN02 y TW.

En la filogenia se logró establecer que la cepa reportada para Ecuador posee cercanía a la cepa WSSV- CN, y presenta lejanía con la cepa WSSV-TW, considerada más virulenta en cultivos y en ensayos experimentales reportados en la literatura, atribuyendo esta virulencia a factores ambientales de cultivo.

En la genotipificación de genomas completos se encontró dos zonas grandes de variación en donde principalmente existe delección de la secuencia y por lo tanto de CDSs. Aunque muchas de estas se encuentran en proteínas en donde no hay función aun conocida, podrían ser las causantes de los niveles de propagación y patogenicidad de la cepa.

Podemos concluir que el cambio de aminoácido en el gen VP19 de entre la cepa de Tailandia y la de Taiwán de Isoleucina por Asparagina afecta la virulencia; mientras que los cambios en el gen VP28 entre estas dos cepas no mostraron cambios en su composición. Se encontraron disponibles 13 secuencias de genoma completo, que estaban completamente ensamblados y presentan anotaciones, en la base de datos mundial GenBank del NCBI. En el mismo se presentan aislados de China, India, Taiwán, México, Australia, Ecuador, Tailandia y Corea del Sur.

RECOMENDACIONES

A nivel de cepas, es necesario realizar una búsqueda en servidores asiáticos para determinar cepas y sus grados de mutación.

En la filogenia, fue muy importante el estudio global del genoma, pero sigue siendo importante actualizar el grado de modificación de genes conservados que permitan actualmente realizar estudios con las nuevas cepas reportadas.

Es recomendable realizar un análisis minucioso de las zonas de alta variabilidad, para encontrar cambios responsables de la variabilidad de la patogenicidad del virus.

LITERATURA CITADA

- Bustillo-Ruiz, Martin I, Escobedo-Bonilla, César M, & Sotelo-Mundo, Rogerio R. (2009). Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos. *Revista de biología marina y oceanografía*, 44(1), 1-11. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572009000100001>
- Bustillo-Ruiz, M. I., CsM, E.-B., & Sotelo-Mundo, R. R. (2009). A review of pathogenesis and molecular strategies against white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *REVISTA DE BIOLOGIA MARINA Y OCEANOGRAFIA*, 44(1), 1–11.
- Cruz-Flores, R., Mai, HN, Kanrar, S. et al. Reconstrucción del genoma del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) a partir de tejido de camarón (*Penaeus vannamei*) incrustado en parafina fijado por Davidson. *Sci Rep* 10, 13425 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70435-x>
- Dieu, B. T. M., Marks, H., Siebenga, J. J., Goldbach, R. W., Zuidema, D., Duong, T. P., & Vlak, J. M. (2004). Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. *Journal of General Virology*, 85(12), 3607–3618. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80344-0>
- Fao. (2016). *State of world fisheries and aquaculture 2016 (spanish)*. Food & Agriculture Org.
- Garza, Z. J. M., Silva, L. G., & Alcocer, J. M. (2007). *Filogenia de las proteínas estructurales del virus de la mancha blanca (WSSV) patógeno de Litopenaeus spp.* 3, 7.
- Kou, G.-H., Peng, S.-E., Chiu, Y.-L., & Lo, C.-F. (1998). Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. *Advances in shrimp biotechnology*, 267–271.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics

- Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Li F, Gao M, Xu L, Yang F. Comparative genomic analysis of three white spot syndrome virus isolates of different virulence. *Virus Genes*. 2017 Apr;53(2):249-258. doi: 10.1007/s11262-016-1421-z. Epub 2016 Dec 24. PMID: 28013454.
- Muller, I. C., Andrade, T. P., Tang-Nelson, K. F., Marques, M. R., Lightner, D. V., & others. (2010). Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. *Diseases of aquatic organisms*, 88(2), 91.
- NF Alikhan, NK Petty, NL Ben Zakour, SA Beatson (2011) BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons, *BMC Genomics*, 12:402. PMID: 21824423.
- Pradeep, B., Shekar, M., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2008). Characterization of variable genomic regions of Indian white spot syndrome virus. *Virology*, 376(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.02.037>
- Qiu, L., Chen, M.-M., Wan, X.-Y., Li, C., Zhang, Q.-L., Wang, R.-Y., Cheng, D.-Y., Dong, X., Yang, B., Wang, X.-H., Xiang, J.-H., & Huang, J. (2017). Characterization of a new member of Iridoviridae, Shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598017-10738-8>
- Restrepo, L., Reyes, A., Bajiña, L., Betancourt, I., & Bayot, B. (2018). Draft Genome Sequence of a White Spot Syndrome Virus Isolate Obtained in Ecuador. *Genome Announcements*, 6(26), e00605-18, e00605-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00605-18>
- Rodriguez, J., Bayot, B., Amano, Y., Panchana, F., de Blas, I., Alday, V., & Calderon, J. (2003). White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *Journal of Fish Diseases*, 26(8), 439–450. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00483.x>
- Sritunyalucksana, Wongsuebsantiti, Johnsson, Soderhall. 2001. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 353-363

Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2003). Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics*, 00(1), 2.3.1-2.3.22. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s00>

Troyer and Kurath. 2003. Molecular epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus reveals complex virus traffic and evolution within southern Idaho aquaculture. *Dis. Aquat. Org.* 55: 175-185

Winton, 1992. Evolution of fish rhabdoviruses. *OJI International Symposium on Salmonid Diseases* Hokkaido University Press. 88-95