

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Estandarización de la técnica RT-PCR a tiempo real  
para la detección del virus de la necrosis pancreática  
infecciosa (IPNV) en la trucha arco iris (*Oncorhynchus  
mykiss*)**

**TESIS**

para optar el título profesional de Médico Veterinario

**AUTORA**

**Gina Ruth Castro Sanguinetti**

**Lima – Perú**

**2010**

## ÍNDICE

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ANEXOS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. ENFERMEDAD DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA	3
2.1.1. Etiología	3
2.1.1.1. Taxonomía	3
2.1.1.2. Morfología	3
2.1.1.3. Propiedades Físico-Químicas	4
2.1.1.4. Genoma Viral	5
2.1.1.5. Composición Proteica	6
2.1.1.6. Replicación Viral	8
2.1.1.7. Características Serológicas	10
2.1.2. Hospederos	10
2.1.3. Signos Clínicos	11
2.1.4. Patología Macroscópica y Microscópica	12
2.1.5. Patogénesis	13
2.1.6. Transmisión	13
2.1.7. Epizootiología	15
2.1.8. Diagnóstico	16
2.1.8.1. Aislamiento Viral en Cultivo Celular	17
2.1.8.2. Técnicas Serológicas	17
2.1.8.3. Técnicas Moleculares	19
2.1.9. Prevención y Control	19

2.2.	TÉCNICA DE RT-PCR	21
2.2.1.	Fases	21
2.2.2.	RT-PCR en Tiempo Real	24
2.2.3.	Ventajas y Desventajas	26
2.2.4.	Aplicaciones	27
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1.	Lugar de Estudio	28
3.2.	Animales y Muestras	28
3.3.	Controles	28
3.4.	Tamaño Muestral	29
3.5.	Metodología	29
3.5.1.	Toma de Muestras	29
3.5.2.	Inmunofluorescencia Indirecta	30
3.5.3.	Extracción de ARN	30
3.5.4.	Técnica de RT-PCR en Tiempo Real (en dos pasos)	31
3.5.5.	Estandarización	34
3.5.6.	Validación	35
3.5.7.	Análisis Estadístico	36
IV.	RESULTADOS	37
4.1.	Análisis de Agua	37
4.2.	Examen de Necropsia	37
4.3.	Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta	38
4.4.	Técnica de RT-PCR en tiempo real	38
4.4.1.	Estandarización	38
4.4.2.	Validación	41
4.5.	Análisis de Resultados	43
V.	DISCUSIÓN	44
VI.	CONCLUSIONES	50
VII.	BIBLIOGRAFÍA	51
VIII.	ANEXOS	62

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1.** Proporción de los componentes para RT en volumen de reacción de 20 ul.

**Cuadro 2.** Proporción de los componentes para PCR en volumen de reacción de 20 ul.

**Cuadro 3.** Características del set de primers utilizado en la estandarización de RT-PCR en tiempo real para la Necrosis Pancreática Infecciosa.

**Cuadro 4.** Temperatura de Melting y Ct de los productos obtenidos en la estandarización utilizando el set de primers WB1 – WB2 y el Protocolo 1.

**Cuadro 5.** Temperatura de Melting y Ct de los productos obtenidos en la estandarización utilizando el set de primers WB1 – WB2 y Protocolo 2.

**Cuadro 6.** Cuantificación del ADNc obtenido a partir de la reacción de RT de las diluciones decrecientes de IPNV mediante espectrofotometría.

**Cuadro 7.** Temperatura de Melting (Tm) y Ct de los productos obtenidos en las diluciones decrecientes de IPNV.

**Cuadro 8.** Tabla de contingencia de las pruebas de IFI y RT-PCR tiempo real de las muestras de campo totales (n=121).

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representación esquemática de la disposición de genes del segmento A del genoma de los birnavirus.

**Figura 2.** Representación esquemática del genoma de un Birnavirus y de la transformación de las proteínas codificadas.

**Figura 3.** Lesiones halladas durante la necropsia.

**Figura 4.** Análisis de la curva de disociación de IPNV (rojo) y Ct utilizando el set de primers WB1-WB2 y Protocolo 1.

**Figura 5.-** Análisis de la curva de melting de IPNV (rojo) utilizando el set de primers WB1-WB2 y Protocolo 2.

**Figura 6.** Análisis de la curva de disociación de IPNV con muestras de campo.

**Figura 7.** Identificación de Ct y Curva de disociación (Tm) de las diluciones de inóculos del IPNV en machacados de riñón y bazo de peces. Nótese la asociación entre el menor Ct y el tamaño del

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1.** Protocolo de Inmunofluorescencia Indirecta para el diagnóstico de IPNV mediante el kit IPNV-FluoroTest Indirecto™ de BIOS Chile™.

**Anexo 2.** Protocolo de Extracción y Purificación de ARN mediante el Kit Purelink™ Micro-To-Midi Total Rna Purification System – Invitrogen.

**Anexo 3.** Protocolo de la Técnica de RT-PCR en tiempo real mediante El Kit “Sybr® Greener™ Two-Step Qrt-Pcr Kit Universal” – Invitrogen.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido Ribonucleico

Ct: Ciclo Umbral (Threshole Cycle)

dNTPs: Deoxinucleótidos trifosfato

IF: Inmunofluorescencia

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

IPN: Enfermedad de la Necrosis Pancreática Infecciosa (del inglés: *Infectious Pancreatic Necrosis Disease*)

IPNV: Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (del inglés: *Infectious Pancreatic Necrosis Virus*)

Oligo dT: Ácido Oligodeoxitimidílico

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*)

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa (del inglés: *Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction*)

Tm: Temperatura de Melting

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar y validar la técnica de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el Perú. Se utilizaron muestras de riñón y bazo de truchas arcoíris provenientes de dos piscigranjas del departamento de Junín, tomándose 61 animales con signos clínicos de enfermedad y 60 animales aparentemente sanos. Todas las muestras fueron evaluadas mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para determinar la presencia del virus. La prueba de RT-PCR tiempo real se realizó utilizando un kit comercial en dos pasos y utilizando el fluoróforo Sybr Green I. Se utilizaron los primers WB1 y WB2 para identificar un segmento genómico específico de la proteína estructural VP2. Como controles positivos se utilizaron virus inactivado IPNV cepa Sp, así como 10 muestras inoculadas con IPNV; y como controles negativos, se utilizaron virus relacionados a IPNV como son Rotavirus A y el virus de la Bursitis Infecciosa del pollo; así como virus no relacionados. A su vez, se llevó a cabo la inoculación viral en muestras de tejido en diluciones decrecientes para determinar el grado de sensibilidad. Los resultados fueron determinados a partir de los valores del Ciclo Umbral (Ct) y temperatura de Melting (Tm) de los productos amplificados. La prueba fue capaz de detectar al virus hasta concentraciones de  $10^2$  UFP/ml. Las 121 muestras de campo resultaron negativas a IPNV; los animales enfermos evidenciaron etiologías de tipos bacterianos y no virales. Los resultados obtenidos determinaron una especificidad del 100% y una sensibilidad del 100%; a su vez, los valores predictivo positivo y predictivo negativo resultaron en 100%. La técnica de RT-PCR en tiempo real estandarizada en el laboratorio representa una técnica valiosa para el diagnóstico de IPNV.

**Palabras clave:** Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa, IPNV, RT-PCR, RT-PCR tiempo real

## ABSTRACT

This study aimed to standardize and validate the real-time RT-PCR technique for diagnosis of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. Kidney and spleen samples of rainbow trout (n=121) from two fish farms of Junin were taken, 61 animals showed signs of disease and 60 were apparently healthy animals. All samples were assessed by indirect immunofluorescence technique (IIF) to determine presence of virus. Real-time RT-PCR was carried out using a two-step commercial kit. We used WB1 and WB2 primers for amplification of a specific genomic segment of the VP2 structural protein. IPNV Sp strain and 10 samples inoculated with IPNV were used as positive controls; whereas related viruses, such as rotavirus and infectious bursal disease virus from chickens, as well as unrelated viruses were all used as negative controls. Also, we inoculated decreasing dilutions of virus into tissue samples to determine the sensitivity degree of the test. Results were assessed according to the values of the threshold cycle (Ct) and melting temperature (Tm) of the amplified products. The test was able to detect the virus in concentrations up to  $10^2$  PFU/ml. All 121 field samples were negative for IPNV; sick animals were apparently infected by bacterial agents. Real Time RT-PCR's specificity and sensitivity were around 100%; moreover, the positive predictive value and negative predictive value was also set in 100%. Real time RT-PCR technique standardized in our laboratory is a valuable diagnostic tool for IPNV detection in field samples.

**Keywords:** Infectious Pancreatic Necrosis Virus, IPNV, RT-PCR, real time RT-PCR

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la acuicultura continental en el Perú ha alcanzado un gran desarrollo, lo cual se ve reflejado en el aumento de derechos otorgados en hectáreas de espejos de agua aptas para el desarrollo de la acuicultura (PRODUCE, 2008). A pesar de ello, la sanidad acuícola en nuestro país no ha tenido mayores avances, lo cual se evidencia en la falta de metodologías diagnósticas confiables de rápida detección que puedan ser aplicadas para el diagnóstico rutinario.

El control de las enfermedades infecciosas es muy importante para el desarrollo productivo de la industria de la acuicultura. En las granjas, donde los peces son criados bajo condiciones de cultivo intensivo, es indispensable el desarrollo de medidas de control de las enfermedades.

En el Perú, el virus de la Necrosis Pancreática representa un riesgo para la crianza de trucha arcoíris debido a la constante importación de ovas que podrían permitir el ingreso de la enfermedad en una instalación ocasionando problemas y pérdidas económicas. Existen limitados estudios patológicos que sugieren la presencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa en nuestro país (Mora, 2006), sin embargo, no pueden ser confirmadas por la falta de técnicas estandarizadas aplicadas a este agente viral en el Perú.

A nivel internacional, existen diversos estudios que demuestran la alta sensibilidad y especificidad de las pruebas de RT-PCR y RT-PCR en tiempo real en la detección de IPNV. Además, muestran superioridad en relación con otras pruebas diagnósticas (Williams *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2001; Bowers *et al.*, 2008). Sin embargo, el aislamiento del virus en cultivo celular continúa siendo la prueba de oro para la detección del virus para la OIE. El principal inconveniente es el tiempo necesario para aislar y confirmar el agente como IPNV, que puede tomar de 1 a 14 días (OIE, 2006).

El presente estudio busca adaptar la técnica de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de IPNV en nuestro medio. Esta prueba ha demostrado ser altamente específica, sensible, fácil de reproducir y rápida en la detección del virus y, ante la necesidad de implementar pruebas de diagnóstico eficientes, de bajo costo, estandarizadas y validadas en nuestro medio, para apoyar programas de control sanitario y vigilancia epidemiológica acuícola en el Perú, la técnica de RT-PCR en tiempo real debe considerarse como una herramienta valiosa en el diagnóstico de IPNV.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ENFERMEDAD DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA

#### 2.1.1. Etiología

La enfermedad de la necrosis pancreática infecciosa (IPN, del inglés *Infectious pancreatic necrosis*) es una enfermedad viral aguda altamente contagiosa causante de altas mortalidades en diversas especies de peces salmónidos jóvenes. Es causada por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV, del inglés *Infectious pancreatic necrosis virus*), el primer virus en ser aislado de teleósteos (Wolf *et al.*, 1960).

##### 2.1.1.1. Taxonomía

El IPNV pertenece al género Aquabirnavirus de la familia Birnaviridae. Esta familia contiene tres géneros: género Aquabirnavirus (especie tipo: IPNV) de los peces; género Avibirnavirus (especie tipo: virus de la Bursitis Infecciosa, IBDV) de las aves; y género Entombirnavirus (especie tipo: Virus de Drosophila X, DXV) de los insectos (Dobos, 1995a; Fauquet *et al.*, 2005).

##### 2.1.1.2. Morfología

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) no tiene envoltura, es icosaédrico, su cubierta proteica tiene un diámetro aproximado de 60nm (de 55 a 75nm), conteniendo en el interior el genoma de ARN de cadena doble. La cápside consta de 180 subunidades estructurales ubicadas entre 132 capsómeros en la superficie del virión (Ozel y Gelderblom, 1985).

### 2.1.1.3. Propiedades Físico-Químicas

El virión posee un coeficiente de sedimentación de 435 S. La masa molecular de la partícula es de  $55 \times 10^6$  Da, y la estimación de la masa total de proteínas de la cápside es  $50,2 \times 10^6$  Da. La diferencia de  $4,8 \times 10^6$  Da se debe al ARN, el cual constituye el 8,7% del peso de la partícula (Wolf, 1988; Dobos, 1995a).

El IPNV es estable en ácido clorhídrico, éter, cloroformo y glicerol, y es relativamente estable al calor. El IPNV puede ser almacenado a 4°C por 4 meses aproximadamente, pero para mayores periodos de tiempo debe ser almacenado a -20°C o menos. Hasta el momento, es el más estable de los virus de peces en medios de salinidad de 0 a 40%, y es fácilmente liofilizado en presencia de leche descremada, lactosa o hidrolizado de lactoalbúmina (Mortensen *et al.*, 1998).

La infectividad del IPNV es estable en agua filtrada mantenida a 4° C y persiste por lo menos durante 5-6 meses. En agua potable a 10° C, la infectividad persiste durante más de 7 meses, pero en agua natural no tratada el virus no es detectable después de 14 días. La carga viral en agua de río y agua de mar sufre una considerable baja en sólo 17 días (Toranzo y Hetrick, 1982; Barja *et al.*, 1983). La infectividad del virus persiste cuatro veces más en agua esterilizada que en agua natural contaminada (Toranzo *et al.*, 1983).

El IPNV es resistente en condiciones de sequedad (4 semanas), radiación  $\gamma$  (10% de infectividad a dosis de  $10^6$  rads) y radiación UV (254 nm por 5 minutos) (Oye y Rimstad, 2001). La infectividad del IPNV se ve reducida por diversos agentes desinfectantes como el cloro, yodo, ozono y formalina (Hamor, 1996). La inactivación del virus en pH 2.5 es incompleta y en pH 12.5 es total (viricida) (Wolf, 1988). La mayoría de agentes virales de los peces son termolábiles, sin embargo el IPNV es la excepción. En un rango de pH de 3.0 a 9.0, el perfil de inactivación térmica a 60° C es bifásico y la mayor actividad ocurre en pH 3.0 durante los primeros 30 minutos. En el rango fisiológico y en pH 9.0 se mantiene una infectividad significativa por varias horas (Desautels y MacKelvie, 1975).

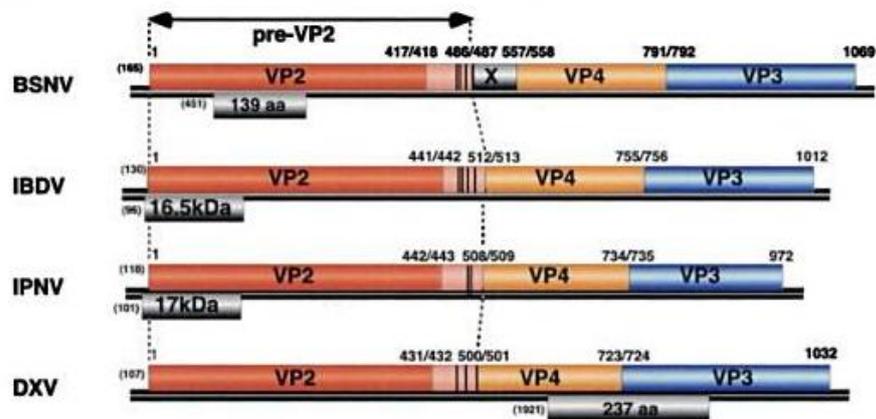
#### 2.1.1.4. Genoma Viral

El genoma del virus es una cadena doble de ARN (dsRNA) bisegmentada; el segmento A de  $2,5 \times 10^6$  Da, y segmento B de  $2,3 \times 10^6$  Da (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

El segmento A del genoma (ver Figura 1) contiene un gran marco de lectura abierto (ORF) entre los 2962 y 3104 bp, que codifica una poliproteína (PP) de 106 kDa (NH<sub>2</sub>-preVP2-NS-VP3-COOH), que es fragmentada para generar tres polipéptidos: pVP2 (precursor de la principal proteína de la cápside VP2); VP3 (proteína menor de la cápside), y NS (proteína no estructural). La proteína pVP2 es, a su vez, fragmentada a VP2 durante la maduración del virus. La actividad proteasa responsable de la división se ha asociado a la proteína no estructural NS (Magyar y Dobos, 1994a).

El segmento A contiene adicionalmente un pequeño ORF, el cual precede y en parte se superpone al extremo amino terminal del ORF de la poliproteína PP y está en un diferente marco de lectura (Duncan *et al.*, 1987). Este pequeño ORF codifica un polipéptido pequeño de 17-kDa rico en arginina (VP5) el cual ha sido detectado en células infectadas, pero no en viriones purificados (Magyar y Dobos, 1994b; Santi *et al.*, 2005) y se sugiere que permite al virus inhibir la respuesta de apoptosis celular para permitir una mayor producción viral (Hong *et al.*, 2002; Santi *et al.*, 2005).

El segmento B del genoma codifica una poliproteína VP1 (94kDa) entre los 2731 y 2784 pb. Esta proteína constituye la ARN-polimerasa dependiente de ARN del virión (RdRp) (Duncan *et al.*, 1991). VP1 se encuentra en el virión en dos formas: como un polipéptido libre de actividad asociada a la ARN polimerasa ARN dependiente, y como una proteína ligada al genoma, VPg. Esta proteína está ligada al extremo 5' de cada segmento genómico (Calvert *et al.*, 1991).



**Figura 1.** Representación esquemática de la disposición de genes del segmento A del genoma de los birnavirus. Blotched snakehead virus (BSNV), virus de la bursitis infecciosa (IBDV), virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y virus de *Drosophila* X (DXV) (Fauquet, 2005).

### 2.1.1.5. Composición Proteica

Las principales proteínas estructurales del IPNV, analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), se distribuyen en tres clases según su tamaño: un gran polipéptido VP1 (94 kDa, 4% de la masa proteica del virión), un polipéptido de tamaño medio VP2 (54 kDa, 62%), y dos polipéptidos pequeños VP3 (31 kDa, 28%) y VP3a (29 kDa, 6%) (Dobos, 1995a) (Ver figura 2).

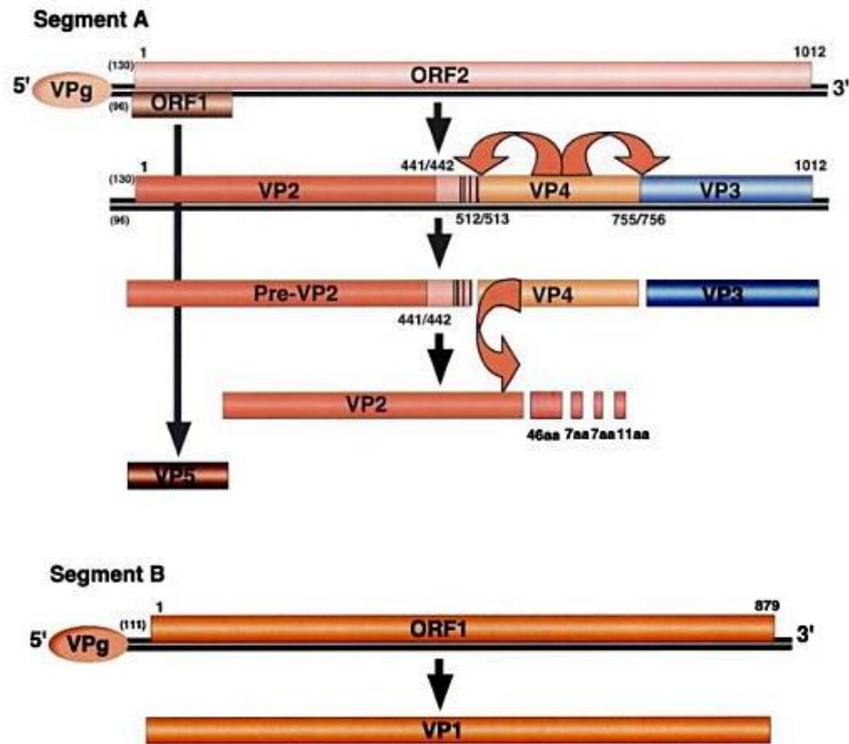
#### *Proteínas estructurales*

- VP2 es la proteína externa de la cápside y contiene los sitios de unión celular y epítomos de neutralización (Lipipun *et al.*, 1992). Se ha demostrado existen dos epítomos de neutralización variables y uno conservado (Caswell-Reno *et al.*, 1986; Christie *et al.*, 1990; Frost *et al.*, 1995).
- VP3 y VP3a han sido descritos con una localización completa o esencialmente interna (Dobos y Rowe, 1977; Nicholson, 1993).

### ***Proteínas no estructurales***

- VPg, forma ligada al genoma de la proteína VP1, detectado con Western Blot usando bajos porcentajes de gel (menos del 5%) (Dobos, 1995a).
- Polipéptido de 49 kDa, detectado por tinción de Plata, por autorradiografía, o por métodos inmunológicos. Este polipéptido se ha demostrado que representa un derivado de VP2 (Duncan *et al.*, 1987).
- Poliproteína (PP), se detecta a través de Western Blot utilizando mAc anti-VP2 y anti-VP3 (Magyar y Dobos, 1994a).
- El polipéptido NS es una proteína no estructural que reacciona con suero policlonal anti-IPNV en Western Blot (Manning y Leong, 1990). Un polipéptido derivado de NS fue detectado y designado como VP4, el cual representa el polipéptido NS asociado al virión (Havarstein *et al.*, 1990).
- El polipéptido VP5 de 17 kDa, el cual posee dominios homólogos Bcl-2, por lo que se sugiere que podría inhibir la apoptosis celular (Hong *et al.*, 2002; Santi *et al.*, 2005).

Varios autores han investigado la glicosilación de polipéptidos virales. La secuencia del segmento A del IPNV indica cuatro sitios potenciales de glicosilación en el gen de pVP2 del serotipo Jasper (Dobos, 1995a) y seis en los serotipos Sp y N1 (Havarstein *et al.*, 1990). En cuanto a otros polipéptidos, hay dos posibles sitios de glicosilación cerca de la extremo amino de VP3 del serotipo N1, y ocho y seis posibles sitios de glicosilación de la región de codificación de VP1 de los serotipos Jasper y Sp, respectivamente (Duncan *et al.*, 1991). Sin embargo, no ha habido evidencia de que VP3 y VP1 sean glicosilados.



**Figura 2.** Representación esquemática del genoma de un Birnavirus y de la transformación de las proteínas codificadas (Fauquet, 2005).

### 2.1.1.6. Replicación Viral

El virus se replica en el citoplasma y un solo ciclo de replicación toma de 16 a 20 horas a 22° C, resultando en un efecto citopático (ECP) característico en los cultivos celulares susceptibles y con un rendimiento infeccioso de  $10^6$  a  $10^9$  PFU/ml. Sin embargo, las líneas celulares también pueden estar persistentemente infectadas sin mostrar ECP (Rodríguez *et al.*, 2003).

El virus se une a polipéptidos de alto peso molecular (100-200 kDa) en las membranas citoplasmáticas de células de los peces, tanto específicas o inespecíficas (Kuznar *et al.*, 1995). Diversos experimentos demostraron que el virus satura los sitios de unión después de 2 a 3 horas a 4° C y es VP2 la proteína de adhesión del virus a la célula animal (Dobos, 1995a).

Hay poca información sobre el desnudamiento y penetración, pero se ha demostrado que la RdRp asociada al virión se activa sin ningún tipo de pretratamiento proteolítico del virus, por lo tanto el desenvolvimiento no puede ser una condición previa para la replicación del virus (Cohen, 1975). Después de la adsorción, el virus es encerrado en compartimentos vesiculares periféricos de la célula, lo que sugiere que la entrada del IPNV, como la de muchos otros virus desnudos, se realiza por endocitosis (Couve *et al.*, 1992). El pH ácido endosómico puede promover cambios necesarios para que los viriones escapen hacia el citosol, sin embargo parece no ser una condición obligatoria para lograr la entrada en el citosol de las células infectadas (Espinoza y Kuznar, 1997).

La tasa de síntesis de ARN específico de IPNV en las células de peces infectadas es máxima en 8 a 10 horas después de la infección y disminuye después de las 14 horas (Somogyi y Dobos, 1980). In vitro, la transcripción viral en células infectadas por RdRp viral es iniciada por la proteína VP1 y procede a través de un mecanismo de desplazamiento de hebra asimétrico semiconservativo (Dobos, 1995b). Es importante subrayar la singularidad de los birnavirus porque son los únicos virus ARNs con una proteína ligada al genoma que presentan síntesis de ARN iniciado por proteínas (Dobos, 1993).

Diversos análisis de secuencia nucleotídica y peptídica han demostrado que el ORF mayor del segmento A de IPNV es monocistónico y codifica una poliproteína en la cual se organizan tres polipéptidos virales en el orden N-pVP2-NS-VP3-C' (Duncan y Dobos, 1986; Dobos, 1995a). El producto del segmento B es una ARN polimerasa viral (VP1). Este polipéptido está presente en el virión como un polipéptido libre y como una proteína ligada al genoma (VPg) (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

El ensamblaje de los componentes del virión tiene lugar en el citoplasma de las células infectadas y la liberación de los virus se produce a través de la destrucción de la célula. Estudios en células CHSE-214 infectadas por IPNV, demostraron que la maduración de la proteína de la cápside (VP2) y la división de VP4 (proteínasa NS) podría ser bloqueada por inhibidores de proteínasa (Wu *et al.*, 1998).

### 2.1.1.7. Características Serológicas

La caracterización serológica de este grupo de virus es muy importante por razones epidemiológicas, así como para el desarrollo de vacunas (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

IPNV comprende un amplio grupo antigénicamente diverso. El primer esquema de agrupación propuso tres principales serotipos designados como VR-299 (serotipo 1), Ab (serotipo 2) y Sp (serotipo 3) (Hill, 1977). Más tarde, mediante ensayos de neutralización cruzada con más de 200 aislamientos de IPNV y otros birnavirus acuáticos, se designaron dos serogrupos diferentes, que no presentan reacción cruzada: serogrupo A y B (Hill y Way, 1995).

El serogrupo A contiene 9 serotipos: A1 (VR-299, West Buxton, WB), A2 (Spjarup, Sp), A3 (Abild, Ab), A4 (Hecht, He), A5 (Telliana, Te), A6 (Canadá 1, C1), A7 (Canadá 2, C2), A8 (Canadá 3, C3) y A9 (Jasper, Ja). El serogrupo B comprende un solo serotipo (B1) que incluye el antiguo serotipo TV-1 (Hill y Way, 1995). Un serotipo N1 aislado en Noruega y considerado un posible serotipo nuevo, no está incluido en esta clasificación serológica, porque se demostró que está relacionado con el serotipo Sp (Melby y Christie, 1994). Esta nueva terminología ha sido ampliamente aceptada.

Prácticamente todos los aislamientos de birnavirus acuáticos de peces de agua dulce y marinos en los Estados Unidos pertenecen al serotipo WB. Cuatro serotipos (C1, C2, C3, y Ja) se encuentran en Canadá, y cuatro serotipos (Sp, Ab, He, y Te), así como la cepa N1 se encuentran en Europa. Las cepas Ab, Sp, y WB han sido encontradas en Asia y América del Sur (Blake *et al.*, 1995). La mayoría de cepas fueron aisladas de salmónidos. Las excepciones son la cepa He (serotipo A4) obtenida del lucio (*Esox lucius*) y el serotipo A5, aislado del molusco bivalvo marino *Tellina tenuis* (Reno, 1999).

### 2.1.2. Hospederos

Desde su primer aislamiento en Estados Unidos en 1957, IPNV ha sido detectado en diferentes especies de salmónidos, se pensó que la infección se limitaba sólo a estas especies (Wolf y Quimby, 1971). Sin embargo, a partir de la década de los 1970s, diversos birnavirus tipo IPNV fueron aislados de otras especies de peces (Sonstegard *et al.*, 1972; Sano *et al.*, 1981). A partir de estas evidencias de enfermedad inducida por birnavirus en especies de peces no salmónidas, birnavirus e IPNV han sido aislados de muchas especies diferentes, y

cada vez más diversas, de peces de agua dulce, salobres y marinos, así como de moluscos marinos y crustáceos (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

La gama de hospederos conocidos se ha ampliado constantemente y se compone actualmente de peces de más de 30 familias, más de diez especies de moluscos y varias especies de crustáceos. Además, un birnavirus fue aislado de un parásito tremátodo de peces (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

Nuevos peces hospederos, incluyendo varias especies de importancia acuícola, han sido descritos recientemente, como el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (Rodríguez *et al.*, 1997), besugo (*Sparus pagrus*) (Rodger *et al.*, 1997), pez piedra de Corea (*Sebastes schlegeli*) (Joh y Heo, 1999); ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Jung *et al.*, 1999); anguila japonesa (*Anquilla japonica*) (Lee *et al.*, 1999), platija europea (*Rhombosolea tapirina*), galludo ñato (*Squalus megalops*) y el abadejo (*Genypterus blacodes*) (Crane *et al.*, 2000).

Ha habido una cierta confusión e incoherencia en la literatura sobre el uso del término "IPNV" porque algunos autores lo utilizan en un sentido genérico para cualquier aislamiento relacionado serológicamente a cepas referenciales de IPNV independientemente del hospedero. Según Hill y Way (1995) y Reno (1999), el término "IPNV" debe aplicarse estrictamente para describir a los aislamientos que demostraron que producen la enfermedad en salmónidos; y el término "birnavirus acuáticos", para aquellos que son avirulentos para la trucha arco iris y otros salmónidos, y suelen ser aislados de otros teleósteos, o de invertebrados acuáticos. Todos los birnavirus acuáticos son similares en la morfología y propiedades físico-químicas (Dobos *et al.*, 1979).

### **2.1.3. Signos Clínicos**

Los síntomas típicos de la enfermedad en salmónidos poseen las características de una enteritis catarral aguda (Wood *et al.*, 1955; Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003). Sin embargo, diferentes cepas de birnavirus acuáticos en otras especies de peces de agua dulce y peces marinos puede causar diferentes enfermedades, como nefroblastoma y branquionefritis en la anguila japonesa (Sano *et al.*, 1981), enfermedad de las branquias en la anguila japonesa (Lee *et al.*, 1999), ascitis en el *Seriola quinqueradiata* juvenil (Sorimachi y Hara, 1985), enfermedad de "spinning" en menhaden del Atlántico (*Brevoortia tyrannus*) (Stephens *et al.*, 1980), insuficiencia renal y necrosis en rodaballos (*Scophthalmus maximus*) (Castric *et al.*, 1987).

La enfermedad de IPN se caracteriza por cambios de comportamiento y lesiones internas macro y microscópicas, y no hay signos patognomónicos de la enfermedad. Los cambios de comportamiento incluyen anorexia y movimientos natatorios circulares intercalados con ataxia (Wood *et al.*, 1955; Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003). Los peces afectados presentan una gran variedad de signos externos de enfermedad, como una pigmentación oscura de la piel, hinchazón abdominal, exoftalmia leve o moderada, palidez de branquias y, en ocasiones, hemorragias en áreas ventrales y aletas (Wolf, 1988; Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003) sin embargo, la enfermedad puede manifestar algunos signos así como puede no manifestar ninguno (Reno, 1999).

La mortalidad es mayor en los peces jóvenes en edades por debajo de los 6 meses y rara en peces de más edad en los cuales la infección es a menudo inaparente (Frantsi y Savan, 1971; Jarp *et al.*, 1994; Bowers *et al.*, 2008). En los peces jóvenes la mortalidad puede llegar a alcanzar tasas de hasta el 90% (OIE, 2006).

#### **2.1.4. Patología Macroscópica y Microscópica**

Internamente, el lumen gástrico e intestinal carece de alimentos y, a su vez, característicamente, contiene un moco cohesivo lechoso considerado patognomónico (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003) En algunos peces infectados, en el ciego pilórico y tejido adiposo se observan petequias, y la cavidad corporal contiene líquido ascítico. A menudo se observan bazo, corazón, hígado y riñones aumentados de tamaño y anormalmente pálidos, y se observan petequias y hemorragias en toda la masa visceral (Reno, 1999; Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

La enfermedad IPN produce varios cambios histopatológicos en los salmónidos afectados. En el páncreas se observa una severa y masiva necrosis en células acinares con picnosis nuclear y cariorrexis y, en algunas casos, inclusiones citoplasmáticas basófilas (Smail *et al.*, 1995). A nivel del sistema excretorio, se observa zonas de congestión y hemorragia en glomérulos, edema y destrucción de epitelio de los túbulos (Sano, 1971). La mucosa del píloro, ciego pilórico e intestino anterior muestran enteritis aguda y necrosis con desprendimiento del epitelio (Smail *et al.*, 1995). Estas lesiones son características de la enteritis aguda y podría ser un cambio más letal que el de la necrosis pancreática (Wolf, 1988).

La trucha arco iris y el salmón del Atlántico afectados por IPN también pueden mostrar congestión y necrosis del tejido hepático (Sano, 1971; Taksdal *et al.*, 1997), con degeneración focal de células hepáticas (Swanson y Gillespie, 1979). Los viriones se puede observar en el interior de los hepatocitos (Kudo *et al.*, 1973).

A nivel ultraestructural, IPNV se observa en tejido pancreático y renal (Lightner y Post, 1969; Yamamoto, 1974). Se pueden detectar agregados virales cubiertos por una membrana en el interior del citoplasma de las células infectadas. Los títulos virales en los tejidos infectados son generalmente altos en el rango de  $10^7$ - $10^{10}$  dosis infectiva en cultivo celular (DICT<sub>50</sub>) por gramo (Castric *et al.*, 1987).

#### **2.1.5. Patogénesis**

Diversos estudios de infecciones experimentales utilizando alevines de trucha indican que hay un período de latencia de unos 2 días post inoculación en los que se puede detectar IPNV en el agua. Posteriormente, hay un período de 2 a 4 días post inoculación en el que se manifiestan los signos clínicos de la enfermedad (Swanson y Gillespie, 1982). Sin embargo, el tiempo de incubación de IPN depende de varios factores, tales como la edad y especie del hospedero, así como la temperatura del agua.

La patogenia de la enfermedad de IPN aún no está bien establecida. Swanson (1981), estudiando el curso de la infección en truchas de arroyo juveniles expuestos al virus por inyección intraperitoneal e inoculación oral, demostró que IPNV entra en la cavidad peritoneal de los peces e interactúa con las células pancreáticas exocrinas en un periodo de 2 días. Sin embargo, no se ha determinado todavía si el virus entra en el páncreas directamente a través de la serosa o llega a allí vía sanguínea. El páncreas parece ser el principal objetivo para la replicación del virus, aunque se observan leves cambios patológicos y antígenos virales en el riñón e hígado de algunos peces infectados (Swanson, 1981; Swanson y Gillespie, 1982).

#### **2.1.6. Transmisión**

Existe cada vez mayor evidencia de que el modo de transmisión dentro de un criadero puede ser una combinación de transmisión vertical y horizontal.

La transmisión horizontal puede producirse por contacto directo entre peces sanos e infectados por ingestión y por fomites. La transmisión a través del agua es el principal mecanismo de propagación entre alevines. Durante la epizootia de IPN, las concentraciones de IPNV en el agua pueden alcanzar niveles tan altos como  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml (Desautels y MacKelvie, 1975), lo cual es más que suficiente para infectar a peces y huevos (Ahne *et al.*, 1989). Los virus también pueden ser hallados en animales de alimentación por filtración (ejem. esponjas marinas), y moluscos bivalvos marinos, actuando como reservorios de IPNV en medio natural (Dobos *et al.*, 1979; Lo *et al.*, 1988; Mortensen *et al.*, 1998).

Una vez que el virus se ha introducido en una población de peces, la transmisión horizontal se produce como resultado de la ingestión de heces contaminadas, orina, agua u otros materiales y por contacto de agua contaminada con las agallas de peces sanos (Frantsi y Savan, 1971).

IPNV ha sido aislado en varias ocasiones a partir de productos sexuales (Mulcahy y Pascho, 1984; Ahne y Negele, 1985; Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 1992; Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003). El virus se encuentra en altos niveles en el fluido ovárico y algunos virus permanecen asociados a ovas lavadas (Wolf *et al.*, 1963; Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

La desinfección de la parte externa de ovas infectadas no elimina la transmisión del virus dentro de ovas embrionadas, y por ende, a los alevines (Bullock *et al.*, 1976). IPNV ha sido aislado de cáscaras de ovas después del nacimiento de alevines debido a que el virus puede protegerse en lóbulos y poros de la cáscara, donde puede impedir que los desinfectantes lo alcancen (Ahne y Negele, 1985). A su vez, los salmónidos jóvenes pueden infectarse al comer la cáscara del huevo al momento de la primera alimentación (Sadasiv, 1995). Por otro lado, el virus puede infectar a los espermatozoides (Mulcahy y Pascho, 1984) y penetrar en el óvulo durante la fertilización (Dorson y Torchy, 1985).

Los peces que sobreviven a las epizootias de IPN desarrollan una infección persistente y transmitirán continuamente la infección a otros peces (Dorson, 1982; Bootland *et al.*, 1986; Wolf, 1988). En las poblaciones naturales de salmónidos, la excreción intermitente por los portadores es un importante mecanismo por el cual el virus asegura su persistencia endémica (McAllister *et al.*, 1993). Diversos factores, incluyendo la edad, la especie del pez, temperatura del agua y cepa del virus, pueden influir en la gravedad de la infección y la posterior aparición del portador (McAllister *et al.*, 1993; Sadasiv, 1995; Yamamoto, 1974).

Los peces portadores pueden transmitir la enfermedad a otras poblaciones susceptibles, incluyendo a su propia descendencia. Además, IPNV puede introducirse en una instalación a través de huevos, alevines y peces juveniles infectados (Wolf, 1988; McAllister, 1993).

El virus viable puede ser transportado y excretado por aves y mamíferos predadores (McAllister y Owens, 1992). Además, el abastecimiento de agua de un criadero puede albergar peces e invertebrados que son portadores del IPNV (Dobos *et al.*, 1979).

### **2.1.7. Epizootiología**

En truchas y demás salmónidos de crianza, la infección varía de inaparente o subclínica, donde las pérdidas no son importantes, hasta brotes agudos en el que la mortalidad afecta a casi el total de población de peces. La gravedad y mortalidad acumulada en salmónidos dependerán de la combinación de una serie de factores relacionados con el hospedero, el virus, y el medio ambiente (Dorson y Torchy, 1981).

#### **a. Factores del Hospedero**

La trucha arco iris y la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) han resultado ser los más sensibles a IPN (Pilcher y Fryer, 1980), y el salmón del Atlántico es la más resistente de las especies de salmónidos estudiadas con respecto a los efectos letales del virus (Sadasiv, 1995). Además, se han encontrado variaciones en la resistencia a IPN entre las variedades cultivadas de trucha arco iris (Hill, 1982; Okamoto *et al.*, 1993).

Existe una importante influencia de la edad del hospedero en la virulencia del IPNV, siendo la letalidad mayor en los peces más jóvenes (Wolf *et al.*, 1960). En infecciones experimentales en truchas de arroyo y trucha arcoíris, se obtuvieron mortalidades acumuladas del 85% y 70% en peces de menos de un mes de edad (Frantsi y Sawan, 1971; Dorson y Torchy, 1981). Peces de más edad (más de 5-6 meses) son resistentes a la enfermedad y pueden convertirse en portadores asintomáticos del virus, diseminándolo periódicamente en heces y productos reproductivos (Ghittino *et al.*, 1984; Wolf *et al.*, 1963).

#### b. Factores del Virus

Existe una amplia variación en el grado de patogenicidad del IPNV (Wolf *et al.*, 1963). El serotipo Sp suele ser el más virulento, mientras que el serotipo Ab muestra un grado de baja virulencia (Jorgensen y Kehlet, 1971). Sin embargo, cepas tanto virulentas como avirulentas están presentes en el mismo grupo serológico (Hedrick y Okamoto, 1983; Sano *et al.*, 1990).

Se ha demostrado que algunos de los virus de peces no salmónidos y mariscos son patógenos para los alevines de trucha arco iris en los que se produce la enfermedad típica IPN (Hill, 1982; Hill y Way, 1995). La patogenicidad para el hospedero y tropismo celular están determinados por la interacción de las proteínas virales codificadas por el segmento A del ARN viral (Sano *et al.*, 1992).

#### c. Factores Medioambientales

Los sistemas de crianza intensiva representan un entorno altamente estresante para los peces, puede producir inmunosupresión con resultado en un aumento de la susceptibilidad a enfermedades o en la activación de infecciones persistentes. La enfermedad clínica en alevines se produce principalmente cuando los peces se encuentran bajo condiciones ambientales adversas, tales como cambios bruscos de temperatura, manejo, elevada densidad de población y mala calidad del agua (bajo contenido de oxígeno, alto contenido de amoníaco, etc.) (Wedemeyer, 1970; Snieszko, 1974; Jarp *et al.*, 1994). La temperatura del agua es un factor importante en el desarrollo de la mayoría de las enfermedades de los peces debido a que las respuestas fisiológicas del pez, incluyendo los mecanismos de defensa, dependen de su temperatura corporal que siempre es cercana al de su entorno (rango de 8 a 12°C) (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

#### **2.1.8. Diagnóstico**

La implementación de técnicas de diagnóstico rápidas y sensibles en la detección del virus es la mejor herramienta para prevenir la exposición en las piscigranjas, al no existir tratamiento ni vacunas efectivas contra esta enfermedad. Diversos métodos son utilizados para el diagnóstico que han mostrado poseer alta sensibilidad y ser de rápida ejecución, sin embargo la metodología aceptada por la OIE continúa siendo el aislamiento en cultivo celular seguido de la confirmación serológica (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

### 2.1.8.1. Aislamiento Viral en Cultivo Celular

El IPNV y demás birnavirus acuáticos se replican habitualmente en una variedad de líneas celulares establecidas como BF-2 (bluegill fry o bluegill juvenil), CHSE-214 (embrión de salmón chinook), EPC (epitelioma Papulosum cyprini), RTG-2 (rainbow trout gonad o gónada de trucha arco iris), y SAF-1 (sea bream fins o aleta de besugo) (Wolf, 1988; Reno, 1999) con la consecuente producción del ECP característico, por lo general se manifiesta como una apariencia filamentosa de las células. La temperatura óptima para el crecimiento de IPNV es de 20 a 24° C (Dobos, 1995a).

Para fines de diagnóstico, las variaciones en la susceptibilidad de las líneas celulares a la infección han tomado mayor importancia y, por esta razón, los intentos de aislamiento primario del virus generalmente se hacen en al menos dos líneas celulares continuas (Amos, 1985; Reno, 1999). Hill (1982) sugirió que la línea celular BF-2, derivadas de tejidos de bluegill (*Lepomis macrochirus*), es el más sensible para el aislamiento de birnavirus acuáticos en los moluscos e invertebrados. Lorenzen *et al.* (1999) demostraron que los cultivos celulares BF-2 y CHSE-214 obtuvieron los mejores resultados para el aislamiento y cultivo in vitro de IPNV.

### 2.1.8.2. Técnicas Serológicas

#### *Inmunofluorescencia*

La técnica de Inmunofluorescencia (IF) se ha utilizado para estudiar a los virus de peces desde 1972 y es ampliamente aceptado para la detección e identificación de IPNV en cultivos celulares (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003). Tanto la IF directa (IFD) e indirecta (IFI) pueden ser utilizadas, pero la IFI es preferible, porque sólo requiere de uno o dos conjugados y, además, muestra una mayor sensibilidad (Gardner, 1986).

Para la prueba, lo ideal es que las muestras se incuben de 10-12 horas en cultivo celular, lo que permitirá observar el mayor número de células infectadas en el primer ciclo de infección; luego de 24h de incubación se observan células infectadas en el segundo ciclo de infección por lo que se considera un tiempo de tinción más adecuado y útil en el diagnóstico de rutina. Sin embargo, en situaciones de emergencia, IFI se puede realizar después de sólo 7-8 h de incubación (Tu *et al.*, 1974; Rodríguez *et al.*, 1995a). A su vez puede llevarse a cabo a partir de muestras de tejido (OIE, 2006).

La técnica de IFI se ha convertido en un método universalmente aceptado y normalizado para inspecciones y certificaciones según los programas de sanidad en peces de la Unión Europea y Estados Unidos (OIE, 2006). Esta técnica tiene varias ventajas en comparación con las técnicas de aislamiento convencionales, tales como la rapidez, especificidad, sensibilidad y reproducibilidad. Sin embargo, la IFI es generalmente laboriosa y requiere de un personal altamente capacitado para la lectura de las muestras teñidas (Rodríguez *et al.*, 2001).

### *Inmunoperoxidasa*

El ensayo de IP puede utilizarse con fines de diagnóstico por su simplicidad, rapidez y alta especificidad (Ahne, 1981). Se ha utilizado con frecuencia en inmunohistoquímica para estudiar la patogénesis de IPNV y otros virus de peces (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

La prueba de IP es similar a la IFI, pero utiliza anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina en lugar de anticuerpos marcados con FITC. Para la identificación de IPNV y otros virus de peces en cultivos celulares, la técnica de IP reporta un mayor grado de sensibilidad en comparación con IFI y la detección de los antígenos virales es más rápida (Faisal y Ahne, 1980), sin embargo, requiere de títulos de  $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml (Rodríguez *et al.*, 2001).

### *ELISA*

La prueba ELISA es una técnica ampliamente aceptada y utilizada en programas de salud para el control de virus (OIE, 2006), tanto en ELISA de captura como la prueba de ELISA directa. El primer paso de la técnica consiste en la adsorción de un antisero antiviral (o de la fracción purificada de IgG) a una fase sólida, luego, se añaden anticuerpos marcados y el sustrato, y la reacción (hidrólisis del sustrato) es visible por un cambio de color (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003; OIE, 2006).

Puede detectar e identificar IPNV en cultivos celulares utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales. Es una técnica de gran especificidad y rapidez para la detección de IPNV (Nicholson y Caswell, 1982), fácil de automatizar, y un método fiable para el diagnóstico del IPN, que podría detectar en  $10^4$ TCID<sub>50</sub>/ml en líquido de cultivo celular (Domínguez *et al.*, 1990). Los anticuerpos monoclonales pueden aumentar la especificidad y la sensibilidad de la prueba (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

### *Citometría de Flujo*

En el campo de virología de peces, se ha desarrollado una tinción inmunofluorescente indirecta aplicada a varios tipos de células infectadas y monitoreada por citometría de flujo para la detección de IPNV y estudios de interacción virus-célula (Rodríguez *et al.*, 1991, 1995b; Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 1992; Pérez-Prieto *et al.*, 2001). El ensayo permite una lectura rápida de 2000 células por segundo, examen de un gran número de muestras, es especialmente precisa para la detección de los portadores de IPNV, con un nivel de sensibilidad comparable a la del aislamiento del virus en el cultivo celular y menor gasto de tiempo. Además, se ha aplicado con éxito en el muestreo no letal de espermatozoides (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 1992) o leucocitos (Rodríguez *et al.*, 1991, 2001). Esta técnica ofrece un gran potencial para la investigación ictiopatólogica, pero hasta ahora son pocos los estudios realizados, debidos principalmente a la necesidad de utilizar equipos sofisticados que no siempre están disponibles.

### **2.1.8.3. Técnicas Moleculares**

#### *Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa– RT-PCR*

La reacción de RT-PCR se ha convertido en el método de elección para el análisis de la expresión génica debido a su sensibilidad, la velocidad y el tamaño mínimo de la muestra. Además, muchas mejoras la han hecho una prueba cuantitativa (Dieffenbach y Dveksler, 2003). Hoy en día RT-PCR se ha convertido en una de las técnicas más ampliamente aplicadas en la investigación biomédica. La facilidad con la que la técnica permite detectar ARNm específico ha sido un importante aporte en la investigación molecular de patogénesis de diversas enfermedades (O'Connell, 2002). A su vez, la variante de RT-PCR convencional, el RT-PCR en tiempo real, ha demostrado poseer también una mayor rapidez, menor riesgo de contaminación, facilidad de empleo (Costa, 2004) y sobretodo poseer una alta especificidad (Bowers *et al.*, 2008).

### **2.1.9. Prevención y Control**

En la actualidad, el único método realmente eficaz de control de la enfermedad causada por IPNV en la acuicultura es mediante la prevención de la exposición de los peces susceptibles al virus. En algunas zonas donde la enfermedad no es endémica, el mejor medio

de control radica en una política de exclusión y erradicación del virus, pero requiere de niveles excepcionalmente altos de monitoreo, certificación y cooperación entre los acuicultores y las autoridades responsables. En consecuencia, se han desarrollado programas de inspección sanitaria piscícola para identificar a las poblaciones infectadas. El éxito de tales programas sanitarios depende de la detección e identificación rápida de patógenos específicos. Un diagnóstico rápido y eficaz de IPNV es esencial para controlar la enfermedad y la propagación del virus. El diagnóstico precoz junto con los estudios epizootiológicos podría utilizarse para controlar la enfermedad mediante la prohibición del movimiento de huevos infectados, alevines, adultos y portadores asintomáticos, y mediante la adecuada selección de huevos, alevines y adultos libres de virus (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

No existen tratamientos profilácticos o terapéuticos más que la destrucción de las poblaciones infectadas y desinfección de todas las instalaciones de explotación y manipulación, y el equipo personal (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

En sistemas de producción acuícola, el control de la mortalidad se realiza generalmente a través del manejo de la densidad (LaPatra *et al.*, 1996). La reducción de la densidad poblacional en la crianza de trucha arco iris puede disminuir la mortalidad de los peces en un brote de IPNV (Smith *et al.*, 2000).

La cría selectiva sistemática para aumentar la resistencia natural de los peces constituye una estrategia potencialmente útil para el control de las enfermedades infecciosas (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

Se han evaluado diferentes estrategias para el desarrollo de vacunas contra IPNV; sin embargo, las vacunas no han cumplido con los efectos beneficiosos previstos, porque los peces a la edad más susceptibles a la infección (alevín) todavía no han alcanzado un sistema inmunológico plenamente desarrollado (Wolf, 1988; Lillehaug, 1997). La vacunación con virus inactivado IPNV sólo brinda protección mediante inyección (Dorson, 1977; Hill *et al.*, 1980), aplicación que no resulta práctica en la crianza. Induce la producción de anticuerpos neutralizantes; sin embargo, no previenen la infección tras la exposición y la inmunidad a menudo es corta (Bootland *et al.*, 1995).

En la actualidad, existe una vacuna autorizada contra IPNV utilizada en el salmón del Atlántico que contiene una proteína recombinante de IPNV. Es comercializada en Noruega como una vacuna polivalente contra IPN, forunculosis, vibriosis y vibriosis de agua fría (NP-IPN) que protege contra IPNV en brotes naturales (Frost y Ness, 1997).

## 2.2. TÉCNICA DE RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una poderosa técnica usada para amplificar regiones específicas del ADN (PCR) o ARN (RT-PCR) a niveles fácilmente detectables en geles de agarosa o con sondas de ácido nucleico. Esta técnica utiliza dos oligonucleótidos cortos de secuencia específica en la reacción para actuar como primers o cebadores que extienden la secuencia de ácido nucleico de interés y una enzima polimerasa termoestable para aumentar exponencialmente la cantidad de ácido nucleico a través de repetidos ciclos de síntesis (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003; Valasek y Repa, 2005).

Como el ARN no puede servir como templado para el PCR, el primer paso en una transcripción reversa (RT) para producir un ADNc a partir de un molde de ARN, seguido de un segundo paso para la amplificación exponencial del ADN en una reacción PCR (Bustin, 2000).

### 2.2.1. Fases

#### *a. Extracción de ARN*

Previa a la prueba de RT-PCR se requiere de la purificación de ARN y la calidad del templado es uno de los factores determinantes más importante de la reproducibilidad y la relevancia biológica de los resultados del RT-PCR. El ARN es extremadamente delicado una vez retirado de su entorno celular. Por lo tanto, su depuración es mucho más complicada que la del ADN y un templado adecuado para la inclusión en el RT-PCR debe ser de alta calidad, libre de ADN y nucleasas (Bustin y Nolan, 2004).

#### *b. RT (Obtención de ADNc)*

El paso inicial en RT-PCR es la producción de una copia de ADN complementario (ADNc) del ARN de interés a través de la acción de la enzima transcriptasa inversa o retro transcriptasa (RT) (Freeman *et al.*, 1999).

Las enzimas RT comúnmente usadas son la del virus de mieloblastosis aviar (AMV-RT), la del virus de leucemia murina Moloney o Moloney leucemia murine virus (MMLV-RT), además de enzimas obtenidas por ingeniería que mejoran la actividad polimerasa y reducen la actividad RNasa no deseada, y son comercializadas por diversos laboratorios (por

ejemplo, Omniscript, PowerScript, StrataScript, SuperScript II, etc.) (Valasek y Repa, 2005). Estas enzimas han sido utilizadas con éxito en RT-PCR (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

La síntesis de ADNc puede llevarse a cabo utilizando primers específicos, hexámeros al azar, oligo dT o una combinación de hexámeros al azar y oligo dT (Bustin *et al.*, 2005), y la elección de estos cebadores requiere una cuidadosa consideración.

El uso de primers específicos permite obtener ADNc específico y probablemente provee la mayor sensibilidad en pruebas cuantitativas. Para su utilización se requiere una cantidad abundante de ARNm blanco (Bustin *et al.*, 2005).

Los hexámeros al azar inician el RT en diversos puntos a lo largo de cada ARN templado produciendo más de un ADNc por cada ARNm presente; además la mayoría de ADNc deriva de ARN ribosomal. Esto sobreestima la cantidad de ARNm inicial, lo cual afecta la cuantificación. Esto podría crear problemas si el ARNm de interés está presente en niveles bajos (Bustin *et al.*, 2005).

La síntesis de ADNc utilizando oligo dT es más específica que con hexámeros al azar y es la mejor opción cuando el objetivo es obtener una cantidad representativa de ADNc a partir de un pool de ARNm y también cuando la muestra de ARNm es limitada. Sin embargo, requiere de ARNm intacto, que no se fragmente o presente estructuras secundarias (Bustin *et al.*, 2005).

El uso de hexámeros al azar y oligo dT maximiza el número de moléculas de ARNm que se puede analizar desde una pequeña muestra de ARN (Bustin, 2000).

La prueba de RT-PCR se puede llevar a cabo en un formato de dos tubos o dos pasos (Two Step RT-PCR), en donde primero se lleva a cabo la transcripción inversa del ARN en ADNc, a continuación, una alícuota de la reacción de RT se utiliza para PCR. Esto ha hecho difícil utilizar procedimientos de control de contaminación basada en UNG. Además, la manipulación extra y pipeteo se añaden a la variabilidad de los resultados. En los últimos años, se ha desarrollado y utilizado un sistema mejorado de RT-PCR en un tubo o un paso (One Step RT-PCR). Este método tiene la ventaja de ser un formato que se realiza en un solo tubo de reacción, es compatible con PCR en tiempo real y puede tolerar la inclusión de sistemas de control de contaminación (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

### c. PCR

Posterior a la reacción de RT, el ADNc es amplificado por PCR. La técnica de PCR se realiza normalmente utilizando una alícuota de la reacción de RT o añadiendo los componentes necesarios de PCR directamente a la reacción de RT (Erlich *et al.*, 1991; Pfeffer *et al.*, 1995).

El PCR utiliza ADN polimerasas para amplificar segmentos específicos de ADN utilizando pequeños oligonucleótidos de secuencia específica que actúan como primers o cebadores. La más utilizada es la enzima Taq polimerasa (de *Thermus aquaticus*) (Valasek y Repa, 2005).

La técnica de PCR es generalmente un proceso cíclico de tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión, con temperaturas que varían sujetas a una serie de consideraciones que deben determinarse empíricamente.

- Desnaturalización. El ADN templado (cadena doble) es llevado a temperaturas altas (95°C por 5 minutos) para separar ambas hebras obteniendo cadenas simples (Valasek y Repa, 2005).
- Hibridación. La temperatura desciende (alrededor de un minuto de 55-65°C, temperatura determinada por las características de los primers utilizados) para permitir a los primers unirse a las regiones complementarias en cada hebra del ADN templado (Valasek y Repa, 2005). Este paso representa un punto crítico, si la temperatura no es la óptima puede no darse la hibridación o pueden generarse productos inespecíficos. Comúnmente la temperatura de hibridación se calcula en 5°C menor a la temperatura de Melting (T<sub>m</sub>) de los primers (Innis *et al.*, 1990; Rychlik *et al.*, 1990).
- Extensión. Por acción de la enzima ADN polimerasa sintetiza una cadena ADN complementaria (72°C por alrededor de 30 segundos). La enzima lee la cadena molde y extiende los primers adicionando los nucleótidos complementarios (Valasek y Repa, 2005).
- Extensión final. Al término del último ciclo. Los tubos se mantienen a 72°C durante 10-15 minutos, lo cual permitirá que todos los productos completen su extensión.

La reacción requiere de un control estricto de las concentraciones de  $Mg^{2+}$  y dNTPs, debido a que el  $Mg^{2+}$  influye en la actividad de la polimerasa así como una mezcla desbalanceada de dNTPs pueden afectarla (Eckert y Kunkel, 1991). El  $Mg^{2+}$  aumenta la temperatura de melting ( $T_m$ ) del ADN de doble cadena y forma complejos solubles con dNTPs para producir el sustrato que la polimerasa reconoce. Las altas concentraciones de dNTPs interfieren con la actividad polimerasa y afectan la hibridación de los primers reduciendo el  $Mg^{2+}$  (Bustin, 2000).

Actualmente se pueden encontrar diversos kits comerciales que incluyen un buffer Master Mix que contiene concentraciones estandarizadas de los reactivos necesarios para el desarrollo de la prueba, así como para su uso en pruebas en tiempo real que pueden utilizarse en los distintos equipos termocicladores (Bustin, 2002).

### **2.2.2. RT-PCR en Tiempo Real**

Actualmente existen técnicas disponibles basadas en emisión de fluorescencia que detectan los productos amplificados con similar sensibilidad (Wittwer *et al.*, 1997). Utilizan tintes fluorescentes y combinan los procesos de amplificación y la detección de ADN blanco para permitir el seguimiento de las reacciones de PCR en tiempo real; su gran sensibilidad elimina la necesidad de una segunda ronda de amplificación y disminuye el riesgo de generar falsos positivos (Morris *et al.*, 1996).

La rapidez con la que la señal fluorescente supera un nivel umbral se correlaciona con la cantidad de secuencia blanco original, lo que permite la cuantificación (Valasek y Repa, 2005). El valor de  $C_t$  representa el ciclo en el cual la emisión de fluorescencia supera el umbral por encima del ruido de fondo o “background” (Bustin, 2005). Además, el producto final puede ser caracterizado sometándolo al aumento de temperatura para determinar a qué temperatura se disocia la doble cadena del producto, determinando así la “temperatura de Melting ( $T_m$ )”. Este punto de fusión es una propiedad única dependiente de la longitud del producto y la composición de los nucleótidos (Valasek y Repa, 2005).

Para el diseño de primers debe tenerse en cuenta diversos aspectos. La longitud óptima de los primers debe ser alrededor de 15-30 bases, y el contenido de GC (guanina y citocina) debe ser entre 30% y 80% (Dorak, 2006). La temperatura de Melting ( $T_m$ ) de los primers no debe diferir en más de 1-2 °C entre ambos. Los primers que se seleccionen sólo

deben contener uno o dos Gs o Cs en los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' (Bustin, 2000). La longitud máxima del amplicón no debe exceder las 400 pb, sin embargo lo ideal es elegir amplicones de longitud entre 50 y 200bp, ya que permiten obtener resultados más consistentes al ser más tolerantes a las condiciones de la reacción (Dorak, 2006).

La detección de productos específicos suele encontrarse entre los ciclos 25 y 35, y a mayor número de ciclos, aumenta la acumulación de productos inespecíficos (Bustin *et al.*, 2005). Un valor Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos. En la actualidad hay softwares que pueden determinar valores Ct mediante un análisis matemático de la curva de amplificación pudiendo tener así una mejor reproducibilidad en las pruebas de PCR en tiempo real (Bustin y Nolan, 2004; Dorak, 2006).

Existen 3 principales sistemas de detección y monitoreo por fluorescencia para la amplificación de ADN:

#### **a. Sondas de hidrólisis**

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis TaqMan, sondas Scorpions y *molecular beacons* (Dorak, 2006).

*Sondas de hidrólisis* (Taqman y Scorpion) Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador mientras la sonda está intacta. Durante la amplificación del ADN blanco, la sonda se hibrida con su cadena complementaria, la ADN polimerasa de actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Separados donador y aceptor la fluorescencia emitida es captada por el lector (Costa, 2004; Dorak, 2006).

*Molecular beacons*. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN blanco. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda está intacta, lo que conlleva que donador y aceptor estén cerca uno de otro. Al hibridar con el ADN blanco, la sonda se abre, alejándose donador y aceptor y la fluorescencia será captada por el lector (Costa, 2004; Dorak, 2006).

### **b. Sondas de hibridación FRET**

El sistema se basa en el fenómeno de transferencia de energía entre una molécula donadora de energía y otra receptora capaz de liberar energía. Se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN blanco. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo (Costa, 2004).

### **c. Agentes intercalantes**

Son fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia al unirse a ADN de cadena doble. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy sencilla y además, es más barato que las sondas específicas (Costa, 2004; Dorak, 2006).

## **2.2.3. Ventajas y Desventajas**

Básicamente, la ventaja más importante de la técnica de RT-PCR tiempo real es su amplio rango de detección de ácidos nucleicos (Valasek y Repa, 2005; Dorak, 2006), que le permite detectar cantidades mínimas de de templado (menos de 5 copias), por lo que es posible analizar tamaños de muestra muy pequeños (Valasek y Repa, 2005) requiriendo 1000 veces menos cantidad de ARN que el RT-PCR convencional.

Otra ventaja de la prueba es la capacidad de medición de datos en tiempo real durante la fase de crecimiento exponencial a diferencia de la prueba convencional que hace la medición en la fase plateau, captando la emisión de fluorescencia por parte del fluoróforo la cual es directamente proporcional a la cantidad de productos amplificados (Dorak, 2006). De esta manera, la prueba no requiere de procesamiento posteriores (Valasek y Repa, 2005; Dorak, 2006) reduciendo el tiempo de ejecución.

Algunas desventajas de la prueba están relacionadas a la calidad de las muestras, debido a que éstas pueden contener sustancias inhibitoras de los reactivos del PCR (Valasek y Repa, 2005); así como la cantidad de templado en la muestra, debido a que la cuantificación será más eficiente al haber una cantidad reducida de templado, ya que la amplificación es exponencial (Klein, 2002).

#### 2.2.4. Aplicaciones

La técnica de PCR en tiempo real se puede utilizar en las aplicaciones tradicionales de PCR, así como en nuevas aplicaciones en las que la prueba tradicional sería menos eficaz. Permite la evaluación y cuantificación de la expresión genética (Heid *et al.*, 1996; Klein, 2002) con la capacidad de obtener datos en la fase de crecimiento exponencial de la prueba. De esta manera, su aplicación se ha ampliado siendo utilizada para la detección y cuantificación de agentes patógenos bacterianos y virales (Bustin, 2000; Klein, 2002; Valasek y Repa, 2005). A su vez, permite realizar estudios de genotipificación (Heid *et al.*, 1996), identificación de mutaciones (polimorfismos de nucleótido único) (Klein, 2002; Valasek y Repa, 2005), monitoreo de la respuesta a terapia de drogas (Bustin, 2000; Valasek y Repa, 2005), monitoreo de transcripción *in vitro* (Bustin, 2002) e Inmuno-PCR (Heid *et al.*, 1996). En oncología clínica se aplica en la detección y cuantificación de las translocaciones cromosómicas (Klein, 2002).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de Estudio**

El estudio se desarrolló en el laboratorio de Microbiología y Parasitología Sección Virología, Unidad de Diagnóstico Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) con sede en Lima.

#### **3.2. Animales y Muestras**

El estudio se realizó utilizando muestras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles y adultos (edad comprendida entre los 4 y 12 meses) provenientes del departamento de Junín, lugar donde se desarrolla ampliamente este tipo de crianza; estas muestras recolectadas pertenecieron a dos piscigranjas: El Edén, ubicada en la provincia Concepción a 3400 m.s.n.m.; y Arco Iris, ubicada en la provincia de Jauja a 3430 msnm. Las muestras correspondientes a riñón y bazo fueron tomadas mediante necropsia en las piscigranjas, conservadas en refrigeración (cooler) y transportadas a la brevedad al laboratorio en Lima. Así mismo, se llevaron a cabo las mediciones de temperatura, contenido de oxígeno y pH del agua.

#### **3.3. Controles**

Como control positivo se utilizó virus inactivado de IPN cultivado en tejido celular BF-2 del Laboratorio de SVA (The National Veterinary Institute - Suecia) conservados en congelación (-40°C); y como controles negativos se utilizaron cultivos de virus relacionados que no afectan a peces disponibles en el laboratorio como son rotavirus (cepa SA11) y virus de enfermedad de la bursa en aves (virus Gumboro); así como cultivos de virus no relacionado como son el virus de parainfluenza 3 bovino (PI3), virus de la diarrea viral bovina (BVDV), virus respiratorio sincitial bovino (RSV), influenza equina cepa New market, virus de Newcastle y virus de la fiebre porcina clásica (PPC).

### **3.4. Tamaño Muestral**

Se establecieron 2 grupos de muestreo en cada piscigranja, el primero correspondiente a animales enfermos, es decir, que presenten algún signo de enfermedad (tanto compatible como no compatible con IPN); y el segundo grupo correspondiente a animales sanos, aquellos que no presentasen ningún signo de enfermedad y se observen aparentemente normales.

De acuerdo con el Manual de Animales Acuáticos de la OIE el tamaño muestral debe corresponder a un mínimo de 60 animales para pruebas diagnósticas en las que no ha sido determinada la sensibilidad y especificidad con una prevalencia del 5% con un tamaño de lote mayor a 2000 animales (OIE, 2006). Por lo tanto, se utilizarían 60 truchas con signos de enfermedad y 60 sin signos aparentes de enfermedad.

Siguiendo con lo indicado, se pudieron recolectar un total de 121 truchas en ambas piscigranjas. En la piscigranja El Edén, se pudieron recolectar 30 animales para ambos grupos, mientras que en la piscigranja Arco Iris se pudieron recolectar 31 animales enfermos y 30 sanos. De esta manera, el tamaño de muestra total en este estudio correspondió a 121 truchas arcoíris, en dos grupos correspondientes a enfermos (61 animales) y aparentemente sanos (60 animales).

### **3.5. Metodología**

#### **3.5.1. Toma de Muestras**

Las necropsias fueron realizadas en las piscigranjas y se tomaron muestras de un segmento de riñón (segmento craneal) y bazo. Al tomar las muestras se procedió a hacer una impronta de riñón en una lámina portaobjeto fijándose en acetona por 15 minutos para su conservación y posterior uso en la IF. Las muestras fueron mantenidas en refrigeración durante el transporte y en congelación al arribo al laboratorio hasta su procesamiento.

Las muestras de riñón y bazo fueron procesadas juntas mediante la técnica de machacado clásico utilizando un molinillo de vidrio para triturar tejido (tissue grinder) estéril y suero fisiológico logrando una suspensión de aproximadamente 20% obteniendo 2ml de sobrenadante por muestra y alicuotado en 2 viales. Los viales fueron rotulados y almacenados en congelación a -35°C hasta su utilización.

### **3.5.2. Inmunofluorescencia Indirecta**

Se realizó la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta a todas las improntas de riñón a partir de las muestras de campo fijadas en acetona. Como control positivo se utilizó el virus inactivado (mediante la reacción del contenido celular). Se utilizó el kit IPNV-FluoroTest Indirecto™ de BIOS Chile™. Se aplicó sobre cada frotis el reactivo oligoclonal (anticuerpos monoclonales para IPNV) incubándose por 30 minutos en cámara húmeda a 37°C. Posterior a la incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con solución de lavado a pH 7.5 (solución salina). Posteriormente se agregó, sobre cada frotis, el conjugado (anti-IgG de ratón conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)), dejándose incubar por 30 minutos en cámara húmeda a 37°C. Se repitieron los lavados 3 a 5 veces y se procedió a colocar el aceite de montaje para la observación en el microscopio de fluorescencia.

### **3.5.3. Extracción de ARN**

El ARN de las muestras fue extraído de acuerdo a las especificaciones del kit comercial “*PureLink™ RNA Purification System*” de Invitrogen. Los productos obtenidos fueron almacenados a -70° hasta su utilización.

Para la extracción de ARN se utilizó el virus IPN, muestras de cultivo celular así como los machacados de tejido alicuotados anteriormente. Este procedimiento lisa y homogeniza las muestras en un buffer de lisis que contiene 2-mercaptoetanol e isotiocianato de guanidina, el cual protege al ARN de ARNasas endógenas inactivándolas y permite la precipitación de proteínas celulares, y junto con 2-mercaptoetanol, desnaturaliza proteínas y rompe membranas celulares. Posteriormente se centrifugaron los lisados para que las proteínas celulares y restos precipiten por completo mientras que el ARN se mantiene en suspensión. Se extrajo el sobrenadante al cual se le agregó etanol para que el ARN precipite. Se trasladó y centrifugó en una canastilla que contiene una membrana de sílice donde el ARN se adhiere. Estas membranas se sometieron a diversos lavados y procesos de centrifugación para lograr la purificación del ARN, separándolo de proteínas, sales y demás componentes celulares. Finalmente, el ARN fue eluído en agua libre de nucleasas y alicuotado en tubos de microcentrífuga en volumen de 25ul y almacenados a -70°C hasta su utilización en la prueba de RT-PCR.

### 3.5.4. Técnica de RT-PCR en Tiempo Real (en dos pasos)

Para este procedimiento se requirió del termociclador a tiempo real PTC 200 (MJ Research) y un equipo Chromo-4™ (MJ Research) el cual hace las lecturas de emisión de fluorescencia, a su vez se utilizó el software Opticon Monitor 2 v2.0.3 para la determinación de los resultados obtenidos.

Para la realización de la técnica de RT-PCR se utilizó el kit comercial “SYBR® GreenER™ Two-Step qRT-PCR Kit Universal” de Invitrogen, el cual realiza la prueba en “dos pasos”.

#### 3.5.4.1. RT (Obtención de ADNc)

Se utilizó el “SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR” del kit para la obtención de ADNc a partir del ARN extraído de las cepas control y muestras de campo. Se siguieron todas las especificaciones indicadas en este kit. Los productos fueron conservados a -20° C hasta su utilización.

La síntesis de ADNc se realizó mediante los reactivos que se detallan a continuación:

- Buffer de reacción, el cual contiene dNTPs, oligo(dT)<sub>20</sub> (2.5uM), hexámeros al azar (2.5 ng/ml) y 10nM MgCl<sub>2</sub>;
- Mix de Enzima Transcriptas Reversa, el cual contiene transcriptasa reversa (RT) M-MLV y una proteína recombinante inhibidora de ribonucleasas.
- RNasa H (de *E. coli*), el cual se adiciona luego de la síntesis de ADNc para remover ARN restante en el templado.

El volumen de reacción utilizado en este paso fue de 20ul correspondiendo de éste 1ul de muestra de ARN; la proporción de los reactivos se observan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Proporción de los componentes para RT en volumen de reacción de 20 ul.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen/muestra</b>
Agua libre de nucleasas	7ul
2X RT Reaction Mix	10ul
RT Enzyme Mix	2ul
<b>Total Volumen/muestra</b>	<b>19ul</b>

Se dispensó 19ul de esta mezcla en los tubos en tiras para PCR, inmediatamente después se adicionó 1ul cada muestra de ARN. Estas muestras de ARN fueron descongeladas y mantenidas en hielo para su uso. Se procedió a tapar las tiras de tubos y se colocaron en el termociclador programado con el siguiente patrón térmico:

- 25°C por 10 minutos, (extensión de hexámeros);
- 50°C por 30 minutos (síntesis de ADNc);
- 85°C por 5 minutos (inactivación de la transcriptasa reversa);
- 4°C indefinidamente.

Posteriormente, se adicionó 1ul de RNasa H a cada tubo y se incubó a 37°C por 20 minutos para eliminar el ARN restante en la muestra, luego de ello se mantuvo a 4°C hasta su utilización inmediata en el PCR o de lo contrario se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### **3.5.4.2. PCR en tiempo real**

En este paso se utilizó el módulo “SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal” del kit, el cual contiene el fluorocromo Sybr Green I.

El PCR utilizó una mezcla (SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal) que contiene la enzima ADN polimerasa *Taq* (*Thermus aquaticus*) modificada, el fluorocromo Sybr Green I, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs (con dUTP), UDG, además el kit incluye ROX, un colorante de referencia pasiva que ayuda a normalizar la señal de fluorescencia de las reacciones en fluctuaciones no relacionadas al PCR.

El volumen de reacción en este paso fue de 20ul, donde el templado de ADNc representó el 5% del volumen total (1ul). La mezcla de los componentes (sin incluir templado) ha de prepararse en un vial de microcentrífuga estéril libre de nucleasas y mezclar ligeramente en un vórtex. La proporción de los reactivos en la elaboración de la mezcla de reacción se pueden observar en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Proporción de los componentes para PCR en volumen de reacción de 20 ul.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen/muestra</b>
SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal	10ul
Primer Forward, 10uM	0.4ul
Primer Reverse, 10uM	0.4ul
ROX 1:10 (colorante de referencia)	1ul
Agua libre de nucleasas	7.2ul
<b>Total Volumen/muestra</b>	<b>19ul</b>

De igual manera, se dispensó 19ul de esta mezcla en los tubos en tiras para PCR, adicionando posteriormente 1ul de ADNc de cada muestra obtenido en el paso anterior (síntesis de ADNc). Los tubos fueron tapados y llevados al termociclador e incubados siguiendo dos protocolos:

- Protocolo 1: siguiendo las indicaciones del kit para un PCR tiempo real:

50°C por 2 minutos (incubación de UDG, sugerido por indicación del kit);

95°C por 10 minutos (inactivación de UDG y activación de la ADN polimerasa);

Luego 40 ciclos de:

95°C por 10 segundos (activación de la ADN polimerasa);

60°C por 1 minuto (hibridación)

- Protocolo 2: siguiendo el protocolo de PCR convencional:

50°C por 2 minutos (incubación de UDG, sugerido por indicación del kit);

95°C por 10 minutos (inactivación de UDG y activación de la ADN polimerasa);

Luego 40 ciclos de:

95°C por 10 segundos (activación de la ADN polimerasa);

60°C por 30 segundos (hibridación);

72°C por 30 segundos (extensión)

La curva de disociación fue desde 65 hasta 95°C con lectura de placa cada 0.2°C por 2 segundos en ambos protocolos. Luego se mantuvo a 4°C indefinidamente.

Finalmente, se retiraron los tubos y se almacenaron en congelación a -20°C.

Para la determinación de los resultados se analizaron los valores de Ct (ciclo de amplificación) y Tm (Temperatura de disociación o Melting) obtenidos mediante el software Opticon Monitor 2 v2.0.3. El equipo utilizado fue el termociclador a tiempo real PTC 200 (MJ Research) y el equipo Chromo-4™ (MJ Research) lector de emisión de fluorescencia.

### 3.5.5. Estandarización

La estandarización de la prueba se realizó con el objetivo de probar la especificidad de los primers utilizados así como de optimizar esta técnica.

En este paso fue utilizado el virus inactivado IPN como control positivo, en conjunto con los virus relacionados y no relacionados a los aquabirnavirus disponibles en el laboratorio y utilizados como controles negativos:

- Virus de la fiebre porcina clásica (PPC)
- Influenza equina cepa New market
- Virus de parainfluenza 3 bovino (PI3)
- Virus de enfermedad de la bursa en aves (virus Gumboro)
- Rotavirus SA II
- Virus respiratorio sincitial bovino (RSV)
- Virus de la diarrea viral bovina (BVDV)
- Virus de Newcastle

Se utilizaron los protocolos de extracción de ARN y RT-PCR tiempo real descritos anteriormente.

Se utilizaron los primers WB1 y WB2, específicos para IPNV publicados por Williams *et al.* (1999) (ver Cuadro 3), quienes realizaron un RT-PCR competitivo revelado en gel de agarosa para determinar su especificidad. Se realizó un análisis informático de comparación de secuencia de los primers con las secuencia genómicas disponibles en el GenBank. Este par de primers corresponden a un segmento genómico específico de la proteína VP2 de los aquabirnavirus.

**Cuadro 3.** Características del set de primers utilizado en la estandarización de RT-PCR en tiempo real para la Necrosis Pancreática Infecciosa.

Primers	Longitud del amplicon (pares de bases-pb)	Secuencia	Tm (°C)
WB1 <sup>a</sup>	206	F: 5' CCG CAA CTT ACT TGA GAT CCA TTA TGC 3'	67.00
WB2 <sup>a</sup>		R: 5' CGT CTG GTT CAG ATT CCA CCT GTA GTG 3'	68.00

<sup>a</sup> Referencia: Williams *et al.*, 1999.

Para la evaluación de la prueba de PCR tiempo real con el set de primers WB1-WB2, se utilizaron los perfiles de temperaturas descritos en el protocolo 1 y protocolo 2.

La curva de disociación fue desde 65° hasta 95°C con lectura de placa cada 0.2°C por 2 segundos. Luego se mantuvo a 4°C indefinidamente.

### 3.5.6. Validación

Para la validación de la prueba de RT-PCR tiempo real se utilizaron, como muestras positivas: genoma viral de IPNV y 10 muestras de 500 uL de machacado de riñón y bazo de peces aparentemente sanos, negativos a IFI e inoculados con 10 uL de virus cultivado de IPNV ( $10^3$  TCDI<sub>50</sub>/mL) y agua libre de nucleasas. Como muestras negativas, se utilizaron las mismas 10 muestras negativas a IFI sin inocular. A su vez, se procesaron y utilizaron las 121 muestras de campo para el diagnóstico.

Para la realización de la técnica se utilizaron los protocolos de extracción de ARN anteriormente descrito y la técnica de RT-PCR tiempo real utilizando el set de primers WB1-WB2 con el patrón de temperaturas descrito en el protocolo 1.

Para determinar el grado de sensibilidad de la prueba de RT-PCR tiempo real se realizaron diluciones seriadas hasta 1:100 del inóculo viral de IPNV (de concentración inicial conocida de  $10^3$  UFP/ml) en machacados de riñón y bazo de concentración aproximada del 20% en PBS y luego procesadas para la prueba de RT-PCR tiempo real siguiendo los pasos anteriormente descritos.

### 3.5.7. Análisis Estadístico

Para evaluar la validez diagnóstica, se analizaron los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Estos se obtuvieron mediante una tabla 2x2 a partir de las muestras de campo a la cual se aplicaron las respectivas fórmulas estadísticas con un intervalo de confianza del 95%, confrontando los resultados de las pruebas de IFI y RT-PCR tiempo real. La tabla de 2x2 y fórmulas se detallan a continuación:

		IFI		Total
		+	-	
RT-PCR	+	a	b	(a+b)
	-	c	d	(c+d)
Total		(a+c)	(b+d)	n

De donde se obtienen las siguientes definiciones:

- Sensibilidad:  $S = \frac{a}{(a+c)} \pm IC_{95\%}$
- Especificidad:  $E = \frac{d}{(b+d)} \pm IC_{95\%}$
- Valor Predictivo Positivo:  $VPP = \frac{a}{(a+b)} \pm IC_{95\%}$
- Valor Predictivo Negativo:  $VPN = \frac{d}{(c+d)} \pm IC_{95\%}$

Para determinar los intervalos de confianza se utilizará la siguiente fórmula:

$$IC = z_{(95\%)} \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Análisis de Agua

Se llevaron a cabo las mediciones de temperatura, contenido de oxígeno y pH. En la piscigranja El Edén, la temperatura del agua se midió en 12°C, el contenido de oxígeno disuelto en 8mg/L, pH de 6.8 y moderado grado de turbidez. A su vez, en la piscigranja Arco Iris, la temperatura del agua se midió entre 10 y 12°C, 4.7 mg/L de oxígeno disuelto, pH de 7.9 y alto grado de turbidez, siendo esto último causado por las lluvias propias del verano.

### 4.2. Examen de Necropsia

Los animales enfermos hallados en ambas granjas fueron elegidos por presentar signos de enfermedad tales como nado errático, exoftalmia, pigmentación de piel, abdomen abultado, úlceras en piel así como aquellos animales con retraso en el crecimiento. Cabe mencionar que los signos clínicos hallados en los peces de ambas piscigranjas son compatibles con IPN a excepción de las ulceraciones en piel.

Durante las necropsias de los animales con signos de enfermedad, se observaron diversas lesiones: hemorragias petequiales en hígado (19/61) (31.1% de los animales “enfermos” muestreados), ciegos pilóricos (1/61) (1.6%) e intestino (6/61) (9.8%); bazos reducidos de tamaño(5/61) (8.3%), palidez hepática (6/61) (10%), lesiones tegumentarias (12/61) (19.7%), lesiones oculares (hemorragias, exoftalmia e inflamación) (4/61) (6.6%), melanosis (1/61) (1.6%); a su vez se pudo observar que muchos animales presentaron un desarrollo heterogéneo de las tallas, presentando pesos y tamaños menores a lo correspondiente a la edad, y crecimientos irregulares de colas y aletas pectorales (más pequeñas en relación al tamaño del cuerpo) (26/61) (42.6%) (Figura 3). El diagnostico microbiológico determinó el crecimiento de bacterias gram negativas en el 70% de las muestras.

Los peces sanos a la necropsia no evidenciaron lesiones anatomopatológicas, a excepción de un animal en el cual se observó la presencia de estructuras blanquecinas de aspecto irregular que protruían del parénquima hepático, esplénico y renal, compatibles con granulomas (1/60) (1.7%).



**Figura 3.** Lesiones halladas durante la necropsia. A) Hemorragia a nivel de ciegos pilóricos e hígado. B) Exoftalmia con presencia de hemorragia. C) Lesión tegumentaria.

#### **4.3. Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta**

Al realizarse la prueba de Inmunofluorescencia indirecta, las 121 muestras de campo recolectadas fueron observadas a alta resolución de 400X y todas resultaron negativas a la prueba. Un número de 14 muestras tuvieron cierta coloración inespecífica, que no varió el criterio de negatividad de la muestra.

#### **4.4. Técnica de RT-PCR en tiempo real**

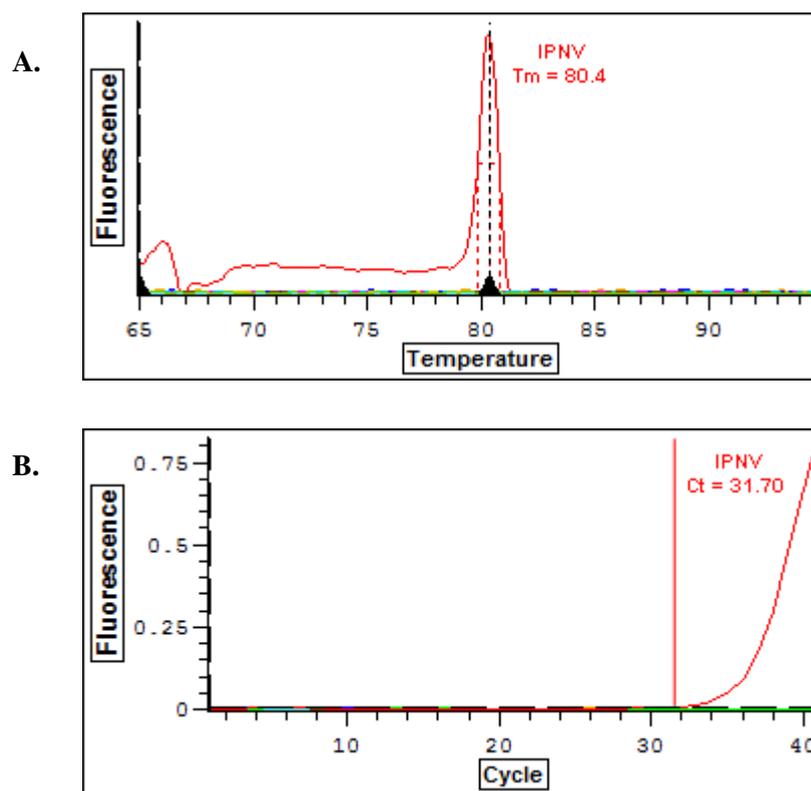
##### **4.4.1. Estandarización**

Tras la realización de la prueba de RT-PCR tiempo real utilizando el protocolo 1 y utilizando el ARN total de la cepa de referencia de IPNV se obtuvo un Ct de 31 (Ct = 31.7), obteniendo un producto específico a una Tm (Temperatura de disociación o melting) de 80.4°C. Los virus controles negativos, no amplificaron ningún producto específico, por lo que no marcaron un valor de Ct; pero el programa detectó pequeñas cantidades de ADN que determinan valores Tm a bajas temperaturas de disociación (de 65 a 72°C), que no generan ningún pico en el gráfico de los resultados mostrados por el programa Opticon Monitor 2 (Cuadro 4, Figura 4).

**Cuadro 4.** Valores de Ct y Temperatura de Melting de los productos obtenidos en la estandarización utilizando el set de primers WB1 – WB2 y el Protocolo 1.

ARN totales de virus controles	Ct	Tm (°C)	Resultado
Virus de la fiebre porcina clásica (PPC)	NC	72.6	-
Influenza equina cepa New market	NC	66.0	-
Virus de parainfluenza 3 bovino (PI3)	NC	67.4	-
Virus de enfermedad de la bursa (Gumboro)	NC	67.6	-
Rotavirus SA11	NC	65.0	-
Virus respiratorio sincitial bovino (RSV)	NC	72.4	-
Virus de la diarrea viral bovina (BVDV)	NC	66.0	-
Virus de Newcastle	NC	65.0	-
Virus IPNV	31.7	80.4	+

NC = No hubo Ct



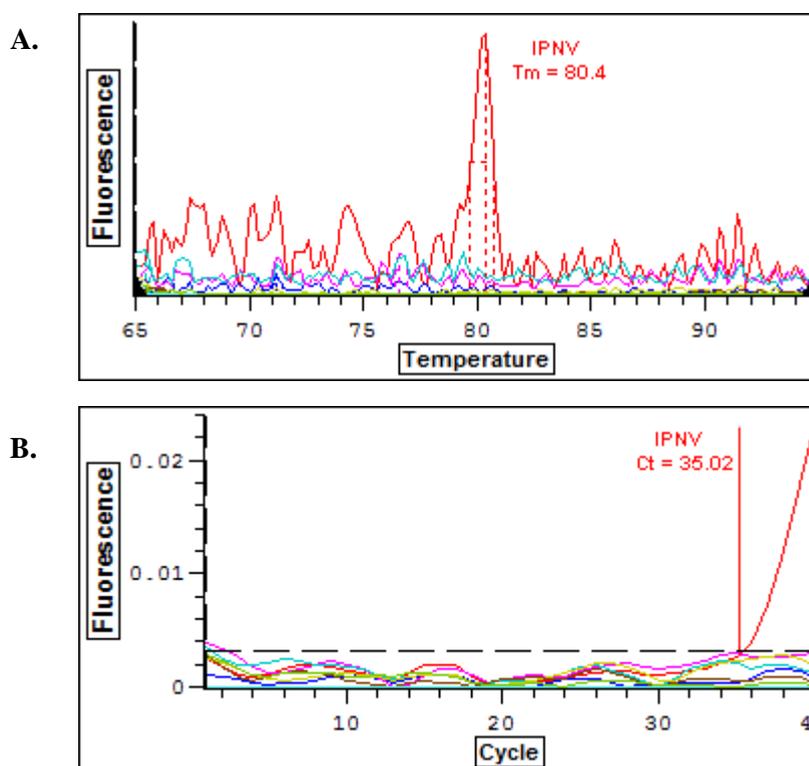
**Figura 4.** Análisis de valores de Tm y Ct de IPNV (rojo) utilizando el set de primers WB1-WB2 y Protocolo 1. A) En la curva de disociación se observa claramente la generación de productos específicos de IPNV a una Tm de 80.4°C a diferencia de los controles negativos que generan productos inespecíficos. B) En la curva de amplificación se observa que el control IPNV presenta un valor de Ct de 31 a diferencia del resto de controles negativos.

En la prueba de RT-PCR tiempo real utilizando el Protocolo 2, se obtuvieron resultados similares al protocolo anterior. Únicamente existen productos específicos a partir de la muestra control IPNV a una Tm de 80.4°C, sin embargo existe la presencia de un mayor “background” (fondo de productos inespecíficos). El inicio de amplificación de productos específicos se realizó en el ciclo 35 (Ct = 35.020), como se muestra en el Cuadro 5 y Figura 5.

**Cuadro 5.** Valores de Ct y Temperatura de Melting de los productos obtenidos en la estandarización utilizando el set de primers WB1 – WB2 y Protocolo 2.

ARN totales de virus controles	Ct	Tm (°C)	Resultado
Virus de la fiebre porcina clásica (PPC)	NC	65.0	-
Influenza equina cepa New market	NC	65.0	-
Virus de parainfluenza 3 bovino (PI3)	NC	66.2	-
Virus de enfermedad de la bursa (Gumboro)	NC	65.0	-
Rotavirus SA11	NC	65.4	-
Virus respiratorio sincitial bovino (RSV)	NC	76.6	-
Virus de la diarrea viral bovina (BVDV)	NC	65.0	-
Virus de Newcastle	NC	71.2	-
Virus IPN	35.020	80.4	+

NC = No hubo Ct



**Figura 5.-** Análisis de valores de Tm y Ct de IPNV (rojo) utilizando el set de primers WB1-WB2 y Protocolo 2. A) Se observa la generación de un producto específico de IPNV a una Tm de 80.4°C, y pequeñas cantidades de productos inespecíficos (ruido de lectura). B) El control IPNV generó un Ct de 35 a diferencia del resto de controles.

Al obtener estos resultados en la estandarización, se procedió a realizar la prueba de RT-PCR tiempo real con las muestras de campo utilizando los primers WB1-WB2 y el Protocolo 1.

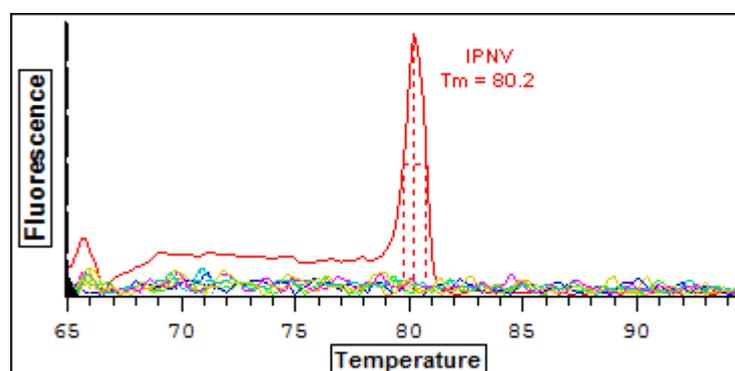
Se realizó la cuantificación de los cDNA obtenidos del paso de RT usados en ambos protocolos, utilizando las muestras inoculadas con virus inactivado en forma decreciente; los resultados indicaron una amplificación de gran cantidad de ARN tanto viral como celular en forma conjunta, sin guardar relación con el tamaño del inóculo como se puede observar en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Cuantificación del ADNc obtenido a partir de la reacción de RT de las diluciones decrecientes de IPNV mediante espectrofotometría.

Muestras con ARN viral	ADNc ug/ml
ARN viral puro ( $10^3$ UFP/ml)	4.90
Dilución 1:2	6.86
Dilución 1:5	6.8
Dilución 1:10	6.73
Dilución 1:100	6.64

#### 4.4.2. Validación

Se realizó la prueba de RT-PCR tiempo real utilizando las 121 muestras con previo diagnóstico por IFI (todas negativas) así como las 10 muestras inoculadas con IPNV utilizando el set de primers WB1-WB2. Todas las muestras de campo (n=121) resultaron negativa a la prueba (ver Figura 6) a diferencia de las 10 muestras inoculadas con IPNV que resultaron positivas a la prueba.



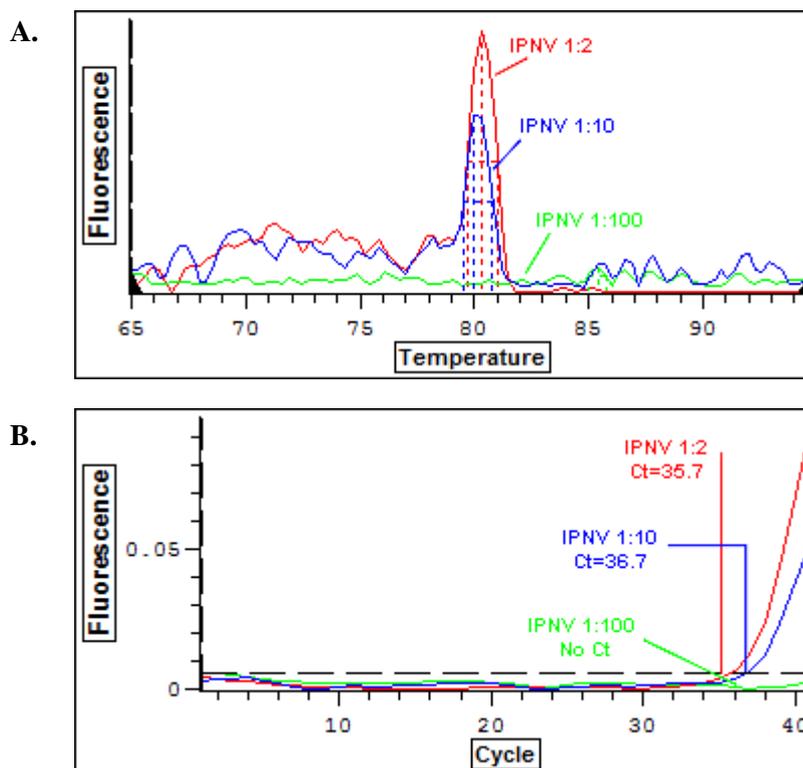
**Figura 6.** Análisis de la curva de disociación de IPNV con muestras de campo. Se observa la curva del control positivo (rojo) con una  $T_m$  de  $80.2^\circ$  C. Todas las muestras de campo (otros colores) fueron negativas a IPNV.

Al evaluar el grado de sensibilidad de la técnica de RT-PCR tiempo real se determinó que ésta pudo detectar al virus hasta una dilución de 1:10 de las muestras inoculadas con IPNV, es decir, la prueba fue sensible hasta la concentración viral de  $10^2$  UFP/ml. (cuadro 7, figura 7).

**Cuadro 7.** Valores de Ct y Temperatura de Melting (Tm) de los productos obtenidos en las diluciones decrecientes de IPNV en tejido celular.

Control	Ct	Tm (°C)	Resultado
IPNV puro( $10^3$ UFP/ml)	32.0	80.0	+
IPNV 1:2	35.7	80.3	+
IPNV 1:10	36.7	80.0	+
IPNV 1:100	NC	85.4	-

NC = No hubo Ct



**Figura 7.** Identificación de la Temperatura de Melting (Tm) y Ct de las diluciones de inóculos del IPNV en machacados de riñón y bazo de peces. Nótese la asociación entre el menor Ct (B) y el tamaño del pico de Tm (A).

#### 4.5. Análisis de Resultados

Los resultados obtenidos a partir de la tabla de contingencia de 2x2 que se observa en el cuadro 8, determinaron una sensibilidad de 100% y una especificidad de 100%. El valor predictivo positivo se determinó en 100% y el valor predictivo negativo en 100%. En todos los cálculos el intervalo de confianza fue de 0.

**Cuadro 8.** Tabla de contingencia de las pruebas de IFI y RT-PCR tiempo real de las muestras de campo totales (n=121).

	IFI (+)	IFI (-)	TOTAL
RT-PCR (+)	10*	0	0
RT-PCR (-)	0	121	121
TOTAL	10	121	131

\* Muestras de machacado de riñón y bazo de peces sanos inoculados con IPNV.

## V. DISCUSIÓN

Los resultados de la estandarización del RT-PCR tiempo real para la detección de ARN viral de IPNV, indican que el protocolo 1 (sin paso de extensión) diseñado en el trabajo es el más eficiente. El empleo de oligo(dT)<sub>20</sub> y hexámeros al azar en el desarrollo de la RT (primer paso de la prueba) permiten amplificar todas las cadenas de ARN presentes en las muestras en donde se incluye el ARN viral si la muestra es positiva, siendo una de las ventajas de usar el kit “SuperScript™ III First-Strand Shyntesis SuperMix for qRT-PCR”, sin embargo, no permitió diseñar una metodología de RT primer específico, que permitan amplificar sólo ARN mensajero de IPNV disminuyendo las inespecificidades en el PCR final.

La cuantificación de los productos del paso de RT utilizando un fluorómetro, en un ensayo con cantidades decrecientes de ARN viral, obtuvo cantidades muy similares, indicando que se transcriben reversamente diversos tipos de ARN celulares (produciéndose diversos tipos de ADNc), cuando se emplean los oligo(dT)<sub>20</sub> y hexámeros al azar (Cuadro 6). Los oligo(dT)<sub>20</sub> pueden ser empleados con ARN viral de IPNV porque estos son similares a los ARN mensajeros celulares ya que son poliadenilados e igualmente tienen en su secuencia genómica grupos de hexámeros que permiten amplificar cadenas de ARN tanto virales como celulares (Hunt *et al.*, 2008).

Los primers usados WB1 y WB2, fueron empleados por Williams *et al.* (1999) para detectar el IPNV en un RT-PCR múltiple convencional para la detección de agentes virales de peces (IPNV, IHNV y VHSV). Los primers WB1 y WB2 fueron desarrollados en base a un segmento de VP2 específico para todos los aquabirnavirus. Este par de primers permitieron la amplificación de un producto específico de 206 pares de bases, visualizado en gel de agarosa después de una electroforesis, diferenciándose claramente de los productos de IHNV y VHSV por la migración en el gel, debido a la diferencia del tamaño de los productos. En el presente trabajo se optó por utilizar los primers WB1 y WB2 en un RT-PCR a tiempo real para la detección de IPNV, debido a que los primers son aplicables en esta técnica porque generan la amplificación de un segmento específico y no mayor de 400 pb como es requerido para un PCR en tiempo real (Bustin, 2000); pero también se debe tener en cuenta que los amplicones a ser detectados con SYBR Green I deben ser relativamente grandes y tener un alto contenido de GC (Giglio *et al.*, 2003). Cabe mencionar que por este aspecto, permitirá que las muestras puedan utilizarse en caso se den condiciones adversas durante la recolección y transporte hasta el laboratorio.

En los protocolos de PCR empleados, se realiza un calentamiento de 50°C por 2 minutos para realizar la actividad de la UDG y otro calentamiento a 95°C por 10 minutos para inactivar la acción UDG y activar la ADN polimerasa, debido a que el kit combina la tecnología Taq polimerasa “Hot-start” y la actividad uracil-ADN-glicosilasa (Longo *et al.*, 1990; Chou *et al.*, 1992). Estos dos puntos permiten prevenir la reamplificación de los productos de ARN presentes después del primer paso (RT), e inhibir la actividad de la polimerasa a temperatura ambiente, siendo activa después de incubación por 10 minutos a 95°C (Chou *et al.*, 1992), dando productos más específicos y con menor riesgo de producción de inespecificidades.

Al compararse los resultados de la estandarización de los protocolos, el uso del protocolo 2 (que incluye el paso de extensión) amplificó más productos inespecíficos que el protocolo 1 (que no incluye el paso de extensión) (Figura 4 y 5), ya que las modificaciones propias de la polimerasa utilizada permiten que actúe eficientemente a la temperatura de hibridación de los primers con el ADNc viral. Esto fue beneficiado en que los primers utilizados tienen una temperatura de Melting ( $T_m$ ) de 67 y 68°C, por lo que se decidió trabajar con temperatura de hibridación de 60°C (Innis *et al.*, 1990; Rychlik *et al.*, 1990).

La temperatura de extensión de 72°C (por 30 segundos) presente en los ciclos en el protocolo 2, que normalmente es usada para la extensión y actividad de una polimerasa convencional, permite la generación de productos inespecíficos ya que la polimerasa modificada prolongará su acción. La tasa de extensión de Taq polimerasa es entre 30 y 70 bases/segundo (Jeffreys *et al.* 1988; Bustin, 2000), lo que significa que el tiempo de polimerización debe ser corto para que la amplificación de contaminantes de ADN genómico sea menos probable (Bustin, 2000). Al requerir de la amplificación de un producto de 206 pb y utilizando una polimerasa de actividad en un amplio rango de temperatura, es posible la amplificación a partir de la temperatura de hibridación y el tiempo establecido permite la hibridación y extensión a la vez, dando lugar a la generación del producto específico reduciendo el riesgo de formarse productos no deseados. De esta manera, el paso de extensión a 72° C en los ciclos puede omitirse.

La positividad de una muestra, utilizando el SYBR Green I, es determinada asociando los resultados del valor  $C_t$  con la Temperatura de Melting ( $T_m$ ), ya que todos las muestras darán una  $T_m$  por los ADNc y los primers presentes en la mezcla, pero sólo los positivos darán un valor  $C_t$  en un ciclo determinado, dependiente de la cantidad de templado como se observan en nuestros resultados. Dentro de los métodos basados en fluorescencia actualmente

disponibles para la detección de productos de PCR en tiempo real, SYBR Green I es el método más simple y menos costoso (Bowers *et al.*, 2008) porque no requiere del diseño de sondas específicas y existen en el mercado diversos kits comerciales lo cual facilita su uso (Ririe *et al.*, 1997; Giglio *et al.*, 2003). Sin embargo, al utilizarse el fluoróforo SYBR Green I se debe tener en cuenta que es un marcador que se unirá a la totalidad de ADN formado durante el PCR, es decir, que también se puede unir a productos inespecíficos que puedan formarse en la reacción como son los dímeros de primer; por esta razón es importante realizar un adecuado análisis de la curva de disociación, teniendo en cuenta que la temperatura de disociación que se obtiene para un producto específico dependerá del contenido de GC y del tamaño y secuencia del amplicón (Ririe *et al.*, 1997); de esta manera los productos no deseados pueden discriminarse de aquellos que son específicos, ya que estos últimos se disociarán a una temperatura más alta.

Los resultados de PCR en tiempo real se basan en la lectura de la emisión de la fluorescencia a lo largo de la reacción (Walker, 2002). El valores Ct determinado por la intensidad del marcador fluorescente Sybr Green I durante la estandarización, fue de 31 para el control positivo (utilizando el protocolo 1), mostrando una diferencia clara con los controles negativos (rotavirus, IBDV, PI3, BVDV, RSV, PPC, Influenza equina, virus de Newcastle) que no generaron productos específicos que excedieran el umbral; a su vez, los valores de Ct obtenidos con los controles positivos de IPNV fueron de 31 a 32 en los distintos grupos o bloques en los que fueron realizadas las pruebas de RT-PCR con las muestras de campo, determinando la especificidad de la prueba para IPNV. A pesar de usar altas concentraciones de ARN virales el Ct siempre fue alto lo que puede ser debido a las posibles estructuras secundarias presentes en el ARN doble hebra presente en el genoma viral (Bustin y Nolan, 2004), lo cual necesitaría un tratamiento previo para hacer más eficiente el paso RT.

En la estandarización, al utilizar los primers WB1 y WB2, se observó en la curva de disociación la generación de productos específicos a una  $T_m$  de 80.2° C con el control positivo IPNV, a diferencia del resto de controles negativos, en donde, no hubo la generación de productos específicos. Si bien el programa utilizado para el análisis de resultados marca un valor de  $T_m$  de 65°C en los controles negativos estos se consideran inespecíficos debido a que son bajos (de 65 a 72°C), y deben haberse producido por la presencia de ADN inespecífico producto de haber utilizado oligos(dT) y hexámeros al azar en la retro transcripción.

Con los resultados obtenidos de Ct y  $T_m$  se puede observar que los primers WB1 y WB2 permiten detectar la presencia del virus de IPN mediante la técnica RT-PCR en tiempo real, diferenciándolo incluso de cepas virales relacionadas como son rotavirus y el virus de la

enfermedad de la Bursa (IBDV), que contienen genomas ARN doble hebra segmentados y siendo este último perteneciente a la misma familia del virus de IPN. La especificidad de la prueba se determinó en 100%, lo cual puede observarse en las figuras 4 y 5, donde se observa la  $T_m$  del producto específico de 80.2°C. Con la interpretación de los resultados, no existe la necesidad de la realización de procesos posteriores a la prueba de PCR para demostrar la presencia de ARN viral en las muestras, por lo que no es necesaria la realización de una electroforesis.

La sensibilidad de un RT-PCR convencional revelado en gel de agarosa usando los primer WB1 y WB2 fue de 100% en una concentración de  $10^1$  TCDID<sub>50</sub>/ml (Williams *et al.*, 1999), usando los cultivos celulares infectados como muestras. En el presente trabajo se realizó un RT-PCR en tiempo real utilizando muestras de tejido de bazo y riñón de truchas las cuales fueron inoculadas con cantidades decrecientes de virus inactivado, obteniendo una sensibilidad de 100% a una concentración de IPNV de  $10^2$  TC DI<sub>50</sub>/ml. Esto puede ser debido a la alta concentración de ARNm de células que se obtienen en el primer paso del RT-PCR en donde usamos oligos(dT) y hexámeros al azar, confirmado al producirse las misma cantidad de los ADNc totales a pesar de utilizarse menos ARN viral (cuadro 6).

La prueba obtuvo valores predictivos positivo y negativo del 100%. El valor predictivo positivo refleja la probabilidad de encontrar enfermedad al existir un resultado positivo (Fletcher *et al.*, 1998), por lo tanto, un resultado positivo mediante la prueba de RT-PCR en tiempo real utilizando los primers WB1 y WB2 refleja la presencia de la enfermedad. El valor predictivo negativo indica la ausencia de falsos negativos en los resultados del muestreo de campo, es decir, la ausencia de enfermedad ante un resultado negativo (Fletcher *et al.*, 1998), por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio reflejan la seguridad de que todas las muestras son verdaderamente negativas.

La técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) es considerada una prueba útil en la evaluación rutinaria del IPNV por ser de rápida y fácil ejecución y poseer una alta sensibilidad. Rodríguez *et al.* (2001) reportaron valores de sensibilidad de IFI de 26.7% a 100% en títulos de  $10^2$  y  $10^3$  DITC<sub>50</sub>/ml respectivamente. Esto indica que la prueba de IFI puede ser altamente sensible en títulos más altos. La necesidad de muestras y reactivos de calidad, la reacción cruzada de los anticuerpos, así como los títulos utilizados son los principales inconvenientes para el común uso de esta técnica (Rodríguez *et al.*, 2001). Además requiere de personal altamente capacitado en la lectura de las láminas debido a que pueden darse tinciones inespecíficas (Rodríguez *et al.*, 2001) que podrían conllevar a una interpretación errónea por parte de operadores inexpertos. En el presente trabajo se optó por

utilizar esta técnica como prueba tamiz para una primera evaluación del estado de las muestras de campo, resultando todas (121 muestras) negativas a la prueba, de las cuales 14 muestras presentaron una tinción inespecífica, que podrían ser expresados como positivos por un técnico inexperto. Esta subjetividad es eliminada con la utilización de la técnica de RT-PCR tiempo real.

La alta sensibilidad de la técnica de RT-PCR tiempo real sobre la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) se puede explicar por la capacidad del RT-PCR de detectar un genoma específico a títulos muy bajos de  $10^1$  DITC<sub>50</sub>/ml (Williams *et al.*, 1999; Bowers *et al.*, 2008), sin embargo, esta técnica no puede evaluar la viabilidad de las partículas virales.

La técnica de RT-PCR tiempo real, para la detección del virus ha demostrado ser una técnica rápida que detecta el virus con precisión y en bajos títulos (10 DICT<sub>50</sub>/ml) (Bowers *et al.*, 2008), logrando una sensibilidad del 100%, lo que la hace una técnica comparable al cultivo celular. Sin embargo, el aislamiento del virus en cultivo celular continúa siendo la prueba de oro para la detección del virus para la OIE utilizando las líneas celulares establecidas y además, se requiere una optimización extensa para la validación de la prueba de RT-PCR tiempo real para la aplicación clínica.

La totalidad de muestras de campo (n=121) tomadas de las dos piscigranjas del departamento de Junín resultaron negativas a la prueba, es decir, el IPNV no ha sido evidenciado en las piscigranjas muestreadas mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Por lo tanto, estas piscigranjas se pueden considerar libres de IPNV bajo esta técnica de diagnóstico molecular.

El presente estudio busca adaptar la técnica de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de IPNV en nuestro medio; esta prueba ha demostrado ser altamente específica, sensible, fácil de reproducir y rápida en la detección del virus, requiriendo de al menos un día para su realización. El RT-PCR en tiempo real en sí requiere de aproximadamente 5 a 6 horas para obtener un resultado, sin embargo, se debe tener en cuenta los procesos previos a esta prueba a partir de una muestra de tejido como son el procesado mediante la técnica de machacado y el posterior paso de extracción de ARN, procesos que, para este estudio, se realizaron en diferentes días con el objeto de reducir riesgos de contaminación al manejar un amplio número de muestras.

El hallazgo de ciertas lesiones permiten orientar el diagnóstico de diversas enfermedades, sin embargo, en enfermedades de peces, muchos signos clínicos y lesiones son inespecíficas, es decir, pueden ser compatibles con enfermedades causadas por diversos agentes. Algunas lesiones halladas durante las necropsias pueden ser compatibles con IPN como son, por ejemplo, el hallazgo de petequias a nivel hepático y cecal. Si bien la presencia del agente IPNV ha sido descartada mediante la técnica de RT-PCR tiempo real, se recomendaría, en las piscigranjas muestreadas y de la zona, el descarte de otros agentes infecciosos como, por ejemplo, *Renibacterium salmoninarum*, *Flavobacterium sp* y, *Aeromonas sp.*, cuya presencia ha sido evidenciada en nuestro medio y cuyas lesiones también son compatibles a las halladas en la necropsia.

## VI. CONCLUSIONES

- La técnica de RT-PCR a tiempo real mediante la utilización del set de primers WB1-WB2 evaluada en el laboratorio representa una técnica altamente sensible para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) alcanzando valores del 100% en concentraciones de  $10^2$  UFP/ml.
- La técnica de RT-PCR a tiempo real utilizando el set de primers WB1-WB2 representa una técnica altamente específica en la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), ya que permite reconocerlo distinguiéndolo incluso de cepas virales relacionadas a éste (Rotavirus y Virus de Gumboro).
- No ha sido detectada la presencia de IPNV en las piscigranjas El Edén y Arco Iris del departamento de Junín mediante la técnica de RT-PCR a tiempo real.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahne W, Negele RD. 1985. Studies on the transmission of IPNV via eyed eggs and sexual products of salmonid fish. In: Ellis AE, ed. *Fish and Shellfish Pathology*. Academic Press, London. p 260–269.
2. Ahne W, Vestergard-Jorgensen PE, Olesen NJ, Fischer-Scherl T, Hoffmann R. 1989. Aquatic birnaviruses: Virus of the serogroup II isolated from an IPN outbreak in brook trout. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 9:14–16.
3. Ahne W. 1981. Serological techniques currently used in fish virology. *Dev. Biol. Stand.* 49:3–27.
4. Amos KH. 1985. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. In: *Fish Health Section*. 3rd ed. Bethesda. *American Fisheries Society* 1985:114.
5. Barja JL, Toranzo AE, Lemos ML, Hetrick FM. 1983. Influence of water temperature and salinity on the survival of IPN and IHN viruses. *Bulle. Euro. Assoc. of Fish Patholog.* 3:47–50.
6. Blake SL, Schill WB, McAllister PE, Lee MK, Singer JT, Nicholson BL. 1995. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 33:835–839.
7. Bootland LM, Dobos P, Stevenson RMW. 1995. Immunization of adult brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchell), fails to prevent the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) carrier state. *Journal of Fish Diseases* 18:449–458.
8. Bootland LM, Stevenson RMW, Dobos P. 1986. Experimental induction of the carrier state in yearling brook trout: A model challenge protocol for IPNV immunization. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12:365–372.
9. Bowers RM, LaPatra SE, Dhar AK. 2008. Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *Journal of Virological Methods* 147: 226-234.

10. Bullock GL, Rucker RR, Amend D, Wolf K, Stuckey HM. 1976. Infectious pancreatic necrosis transmission with iodine treated and no treated eggs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish. Res. Board Can.* 33:1197–1198.
11. Bustin SA, Benes B, Nolan T, Pfaffl MW. 2005. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34: 597-601.
12. Bustin SA, Nolan T. 2004. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* Vol 15(Issue 3): 155-166.
13. Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169–193.
14. Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29, 23–39.
15. Bustin SA. 2005. Real-Time PCR. In: Podda M, Fuchs J, eds. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*. Marcel Dekker. New York. p 1117-1125.
16. Calvert JG, Nagy E, Soler M, Dobos P. 1991. Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 2:2563–2567.
17. Castric J, Baudin-Laurencin F, Coustans MF, Auffret M. 1987. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus, Ab serotype, from an epizootic in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 67:117–126.
18. Caswell-Reno P, Reno PW, Nicholson BL. 1986. Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus: Analysis of viral epitopes and comparison of different isolates. *J. Gen. Virol.* 67:2193–2205.
19. Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. 1992. Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* 20: 1717–1723.
20. Christie KE, Ness S, Djupvik HO. 1990. Infectious pancreatic necrosis virus in Norway: Partial serotyping by monoclonal antibodies. *J. Fish Dis.* 13:323–327.
21. Cohen J. 1975. Ribonucleic acid polymerase activity in purified infectious pancreatic necrosis virus of trout. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62:689–695.
22. Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(5): 299-305.
23. Couve E, Kiss J, Kuznar J. 1992. Infectious pancreatic necrosis virus internalization and endocytic organelles in CHS-214 cells. *Cell Biol. Int. Rep.* 16:899–906.
24. Crane MS, Hardy-Smith P, Williams LM, Hyatt AD, Eaton LM, Gould A, Handlinger J, Kattenbelt, J, Gudkovs N. 2000. First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia. *Dis. Aquat. Org.* 43:1–14.

25. Desautels D, Mac Kelvie RM. 1975. Practical aspects of survival and destruction of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Res. Board Can.* 32:523–531.
26. Dieffenbach CW, Dveksler GS. 2003. PCR primer: a laboratory manual. CSHL Press, 2<sup>nd</sup> Edition. 164 p.
27. Dobos P, Hill BJ, Hallett R, Kells DTC, Becht H, Teninges D. 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented dsRNA genomes. *J. Virol.* 32:593–605.
28. Dobos P, Rowe D. 1977. Peptide map comparison of infectious pancreatic necrosis virus-specific polypeptides. *J. Virol.* 24:805–820.
29. Dobos P. 1993. *In vitro* guanylation of infectious pancreatic necrosis virus polypeptide VP1. *Virology* 193:403–413.
30. Dobos P. 1995a. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annu. Rev. Fish Dis.* 5:25–54
31. Dobos P. 1995b. Protein primed RNA synthesis *in vitro* by the virion associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 208:19–25.
32. Dominguez J, Hedrick RP, Sanchez-Vizcaino JM. 1990. Use of monoclonal antibodies for detection of infectious pancreatic necrosis virus by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Dis. Aquat. Org.* 8:157–163.
33. Dorak T. 2006. Real Time PCR (Advanced Methods Series). Oxford: Taylor & Francis. [Internet], [10 setiembre 2009]. Disponible en: <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>
34. Dorson M, Torchy C. 1981. The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, caused by a European strain of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 4:213–221.
35. Dorson M, Torchy C. 1985. Experimental transmission of infectious pancreatic necrosis virus via the sexual products. *In: Ellis AE, ed. Fish and Shellfish Pathology.* Academic Press, London. p 251–259.
36. Dorson M. 1977. Vaccination trials of rainbow trout fry against infectious pancreatic necrosis. *Bull. Off. Epizoot.* 87:405.
37. Dorson M. 1982. Infectious pancreatic necrosis of salmonids: Present status of knowledge concerning the viruses and the possibilities of controlling the disease. *Bull. Franc. Piscicult.* 305:61–66.
38. Duncan R., Dobos P. 1986. The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large open reading frame encoding a precursor polyprotein. *Nucleic Acids Res.* 14:5934.

39. Duncan R, Nagy E, Krell PJ, Dobos P. 1987. Synthesis of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and the fine structure mapping of the genome segment A coding regions. *J. Virol.* 61:3655-3664.
40. Duncan R, Mason CL, Nagy E, Leong JC, Dobos P. 1991. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: A putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology* 191:541–552.
41. Eckert KA, Kunkel TA. 1991. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods and Applications* 1:17–24.
42. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252:1643-1651.
43. Espinoza, J. C., and Kuznar, J. 1997. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) does not require acid compartments for entry into cells. *Arch. Virol.* 142:2303–2308.
44. Faisal M, Ahne W. 1980. Use of immunoperoxidase technique for detection of fish virus antigens. *In: Ahne W, ed. Fish Diseases.* Springer-Verlag, New York. p 186–192.
45. Fauquet C, International Committee on Taxonomy of Viruses. 2005. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. 2<sup>nd</sup> Ed. London: Elsevier Academic Press. p 561-570.
46. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagne EH. 1998. Epidemiología clínica: aspectos fundamentales. 2° Ed. España: Elsevier Doyma. p 48-63.
47. Frantsi C, Savan M. 1971. Infectious pancreatic necrosis virus: Comparative frequencies of isolation from feces and organs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish Res. Board Can.* 28:1064–1065.
48. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. *BioTechniques* 26:112-125.
49. Frost P, Havarstein LS, Lygren B, Stahl S, Endresen C, Christie KE. 1995. Mapping of neutralization epitopes on infectious pancreatic necrosis viruses. *J. Gen. Virol.* 76:1165–1172.
50. Frost P, Ness A. 1997. Vaccination of Atlantic salmon with recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to a multivalent vaccine, suppresses viral replication following IPNV challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 7:609–619.
51. Gardner PS. 1986. Immunofluorescence. *In: Specter S, Lancz GJ, eds. Clinical Virology Manual.* Elsevier Science, New York. p 95–109.
52. Ghittino P, Schwedler H, De Kinkelin P. 1984. The principal infectious diseases of fish and their general control methods. *In: De Kinkelin P, ed. Symposium on Fish Vaccination.* Office International des Epizooties, Paris, France. p 5–38.

53. Giglio S, Monis PT, Saint CP. 2003. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research* 31: e136.
54. Hamor T. 1996. Practical approach to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) disinfection using gaseous formaldehyde. *J. Appl. Aquacult.* 6:1–10.
55. Havarstein LS, Kalland KH, Christie KE, Endresen C. 1990. Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: A comparison with other birnaviridae. *J. Gen. Virol.* 71:299–308.
56. Hedrick RP, Okamoto N. 1983. Biochemical and antigenic characteristics of eel virus European compared to selected strains of infectious pancreatic necrosis virus. *In: Compans BW, Bishop DHL, eds. Double-Stranded RNA Viruses. Elsevier, New York.* p 245–251.
57. Heid CA, J Stevens, K J Livak, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.
58. Hill BJ, Dorson M, Dixon PF. 1980. Studies on immunization of trout against IPN. *In: Ahne W, ed. Fish Diseases. Third COPRAQ Session, Springer- Verlag, Berlin.* p 29–36.
59. Hill BJ, Way K. 1995. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annu. Rev. Fish Dis.* 5:55–77.
60. Hill BJ. 1977. Present status of IPN virus. *In: Proceedings of the International Symposium on Diseases of Cultured Salmonids. Tavolek, Inc., Seattle, WA.* p 116–119.
61. Hill BJ. 1982. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. *In: Roberts RJ, ed. Microbial Diseases of Fish. Academic Press, New York.* p 91–114.
62. Hong JR, Gong HY, Wu JL. 2002. IPNV VP5, a novel antiapoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression. *Virology* 295:217–229.
63. Hunt AG, Xu R, Addepalli B, Rao S, Forbes KP, Meeks LR, Xing D, Mo M, Zhao H, Bandyopadhyay A, Dampanaboina L, Marion A, Von Lanken C, Li Q. 2008. Arabidopsis mRNA polyadenylation machinery: Comprehensive analysis of protein-protein interactions and gene expression profiling. *BMC Genomics* 9: 220. doi:10.1186/1471-2164-9-220.
64. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. 1990. *PCR protocols: A guide to methods and applications.* Academic Press. San Diego, CA.
65. Jarp J, Gjerve AG, Olsen AB, Bruheim T. 1994. Risk factors in furunculosis, infectious pancreatic necrosis and mortality in post-smolt of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 18: 67–78.
66. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J. 1988. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Research* 16: 10953–10971.

67. Joh SJ, Heo GJ. 1999. Genetic analysis of the VP2/NS junction region on segment A of marine birnavirus isolated from rockfish (*Sebastes schlegeli*) cultured in Korea. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists* 19:190–195.
68. Jørgensen PEV, Kehlet NP. 1971. Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout: Their serological and pathogenic properties. *Nord. Vet. Med.* 23:568–575.
69. Jung SJ, Kitamura S, Kawai K, Suzuki S. 1999. Isolation of different types of birnavirus from ayu *Plecoglossus altivelis* and amago salmon *Oncorhynchus rhodurus* cultured in the same geographic area. *Dis. Aquat. Org.* 38:87–91.
70. Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* (6): 257-260.
71. Kudo S, Kurosawa D, Kunimeni I, Nobusawa K, Kobayashi S. 1973. Electron microscopic observations of the pancreas and liver in the fingerling rainbow trout with symptoms of IPN. *Jpn. J. Ichthyol.* 20:163–177.
72. Kuznar J, Soler M, Farias G, Espinoza JC. 1995. Attachment and entry of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) into CHSE-214 cells. *Arch. Virol.* 140:1833–1840.
73. LaPatra SE, Groff JM, Patterson TL, Shewmaker WD, Casten M, Siple J, Hauck AK. 1996. Preliminary evidence of sturgeon density and other stressors on manifestation of white sturgeon iridovirus disease. *J. Appl. Aquacult.* 6:51–58.
74. Lee NS, Nomura Y, Miyazaki T. 1999. Gill lamellar pillar cell necrosis, a new birnavirus disease in Japanese eels. *Dis. Aquat. Org.* 37:13–21.
75. Lightner D, Post G. 1969. Morphological characteristics of infectious pancreatic necrosis virus in trout pancreatic tissue. *J. Fish. Res. Board Can.* 26:2247–2250.
76. Lillehaug A. 1997. Vaccination strategies in seawater cage culture of salmonids. *Dev. Biol. Stand.* 90:401–408.
77. Lipipun V, Caswell-Reno P, Reno PW, Hsu YL, Wu JL, Nicholson BL. 1992. Antigenic variation of aquatic birnavirus isolates. In: Shariff M, Subasinghe R, Arthur JR, eds. *Proceedings of first Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*. Asian Fisheries Society, Manila. p 237–245.
78. Lo CF, Hong YW, Huang SY, Wang CH. 1998. The characteristics of the virus isolated from the gill of clam, *Meretrix lusoria*. *Fish Pathol.* 23:147–154.
79. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene.* 93(1):125-8.
80. Lorenzen E, Carstensen B, Olesen NJ. 1999. Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis. Aquat. Org.* 37:81–88
81. Magyar G, Dobos P. 1994a. Expression of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and VP1 in insect cells and the detection of the polyprotein in purified virus. *Virology* 198:437–445.

82. Magyar G, Dobos P. 1994b. Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus. *Virology* 204:580–589.
83. Manning DS, Leong JC. 1990. Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 179:16–25.
84. McAllister PE, Owens WJ. 1992. Recovery of infectious pancreatic necrosis virus from the faeces of wild piscivorous birds. *Aquaculture* 106:227–232.
85. McAllister PE, Schill WB, Owens WJ, Hodge DL. 1993. Determining the prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in asymptomatic brook trout *Salvelinus fontinalis*: A study of clinical samples and processing methods. *Dis. Aquat. Org.* 15:157–162.
86. Melby HP, Christie KE. 1994. Antigenic analysis of reference strains and Norwegian field strains of aquatic birnaviruses by the use of six monoclonal antibodies produced against the infectious pancreatic necrosis virus N1 strain. *J. Fish Dis.* 17:409–415.
87. Mora CP. 2006. Diagnóstico de enfermedad viral en la cría de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* en piscigranjas de la región Cusco. En: II Congreso Nacional de Acuicultura. Lima. Universidad Nacional Agraria La Molina.
88. Morris T, Robertson B, Gallagher M. 1996. Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *Journal of Clinical Microbiology* 34:2933–2936.
89. Mortensen SH, Nilsen RK, Hjeltnes B. 1998. Stability of an infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolate stored under different laboratory conditions. *Dis. Aquat. Org.* 33:67–71.
90. Mulcahy D, Pascho R. 1984. Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish viruses. *Science* 225:333–335.
91. Nicholson B. 1993. Use of monoclonal antibodies in identification and characterization of fish viruses. *Ann. Rev. Fish Dis.* 3:241–257.
92. Nicholson BL, Caswell P. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Clin. Microbiol.* 16:469–472.
93. O'Connell J. 2002. RT-PCR Protocols. In: O'Connell J, ed. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 193. Humana Press. New Jersey. 4p
94. [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2006. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. 5° Ed. París, Francia. p 73-87.
95. [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2006. Necrosis pancreática infecciosa. París, Francia: OIE. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos .p 190-199.
96. Okamoto N, Shirakura T, Nagakura Y, Sano T. 1993. The mechanism of interferon with fish viral infection in the RTG-2 cell line. *Fish Pathol.* 18:7–12.

97. Oye AK, Rimstad E. 2001. Inactivation of infectious salmon anaemia virus, viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus in water using UVC irradiation. *Dis. Aquat. Org.* 48:1–5.
98. Ozel M, Gelderblom H. 1985. Capsid symmetry of viruses of the proposed birnavirus group. *Arch. Virol.* 84:149–161.
99. Pérez-Prieto S, Rodríguez S, García-Rosado E, Castro D, Vilas MP, Borrego JJ. 2001. Antigenic properties and experimental transmission of a marine birnavirus isolated from sole (*Solea senegalensis*) to several fish species. *Vet. Microbiol.* 82:11–25.
100. Pfeffer U, Fecarotta E, Vidali G. 1995. Efficient one-tube RT-PCR amplification of rare transcripts using short sequence-specific reverse transcription primers. *BioTechniques* 18:204-206.
101. Pilcher RS, Fryer JL. 1980. The viral diseases of fish: A review through 1978. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 7:287–363.
102. PRODUCE. 2008. La Acuicultura en el Perú. Dirección General de Acuicultura. Lima, Perú: Ministerio de Producción. [Internet], [10 julio 2008]. Disponible en: <http://www.produce.gob.pe/pesqueria>
103. Reno PW. 1999. Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: Woo PT, Bruno DW, eds. *Fish Diseases and Disorders, Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, CAB Publishing. Wallingford. p 1–55.
104. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154-160.
105. Rodger HD, Muir F, Millar S. 1997. Isolation of an aquatic birnavirus from sea bream (*Sparus aurata*). *Bulletin of The European Association of Fish Pathol.* 17:134–136.
106. Rodríguez S, Borrego JJ, Pérez Prieto SI. 2001. Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of aquabirnaviruses in fish. *J. Virol. Methods* 97(1–2):23–31.
107. Rodríguez S, Vilas MP, Alonso M, Pérez SI. 1995a. Study of a viral-dual infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by seroneutralization, Western blot and polymerase chain reaction assays. *Microbiol. SEM* 11:461–470.
108. Rodríguez S, Vilas MP, Gutiérrez MC, Pérez SI. 1995b. *In vitro* quantitative kinetic study of infectious pancreatic necrosis viral antigen by flow cytometry. *Fish Pathol.* 30:1–5.
109. Rodríguez S, Vilas P, Palacios M, Pérez S. 1991. Detection of infectious pancreatic necrosis virus in a carrier population of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), by flow cytometry. *J. Fish Dis.* 14:545–553.

110. Rodríguez S, Vilas P, Gutiérrez MC, Pérez-Prieto SI, Sarasquete MC, Rodríguez RB. 1997. Isolation and preliminary characterization of a birnavirus from the sole *Solea senegalensis* in southwest Spain. *J. Aquat. Anim. Health* 9:295–300.
111. Rodríguez Saint-Jean S, Borrego JJ, Pérez-Prieto SI. 2003. Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Biology, Pathogenesis, and Diagnostic Methods. *Advances in Virus Research* 62:113-165.
112. Rodríguez-Saint-Jean S, Pérez Prieto SI, Vilas Minondo MP. 1992. Flow cytometric analysis of necrosis pancreatic virus attachment to fish sperm. *Dis. Aquat. Org.* 15:153–156.
113. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucl. Acids Res.*, 18(21):6409-6412.
114. Sadasiv E. 1995. Immunological and pathological responses of salmonids to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annu. Rev. Fish Dis.* 5:209–223.
115. Santi N, Song H, Vakharia VN, Evensen Ø. 2005. Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence. *J. Virol.* 79:9206-9216.
116. Sano M, Fukuda H, Sano T. 1990. Isolation and characterization of a new herpesvirus from eel. In: Perkins TO, Cheng TC, eds. Pathology in Marine Sciences. Academic Press, New York. p 15–31.
117. Sano M, Okamoto N, Fukuda H, Saneyoshi M, Sano T. 1992. Virulence of IPNV is associated with the larger RNA segment (RNA segment A). *J. Fish Dis.* 15:283–293.
118. Sano T, Tanaka K, Fukuzaki S. 1981. Immune response in adult trout against formalin killed concentrated IPNV. *Deve. Biol. Stand.* 49:63–70.
119. Sano T. 1971. Studies on viral diseases of Japanese fishes. I. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: Pathogenicity of the isolates. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 37:499–503.
120. Smail DA, McFarlane LA, Bruno DW, McVicar AH. 1995. The pathology of an IPN-Sp sub-type (Sh) in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland. *J. Fish Dis.* 18:631–638.
121. Smith G, Bebak PE, McAllister 2000. Experimental infectious pancreatic necrosis infections: Propagative or point-source epidemic? *Prev. Vet. Med.* 47:221–241.
122. Snieszko SF. 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.* 6:197–208.
123. Somogyi P, Dobos P. 1980. Virus-specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 33:129–139.
124. Sonstegard RA, McDermott LA, Sonstegard KS. 1972. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from white suckers (*Catostomus commersoni*). *Nature* 236:174–175.
125. Sorimachi M, Hara T. 1985. Characteristics and pathogenicity of a virus isolated from yellowtail fingerlings showing ascites. *Fish Pathol.* 19:231–238.

126. Stephens EB, Newman NW, Zachary AL, Hetrick FM. 1980. A viral etiology for the annual spring epizootics of Atlantic menhadem *Brevortia tyrannus* L, in Chesapeake Bay. *J. Fish Dis.* 3:387–398.
127. Swanson RN, Gillespie JH. 1979. Pathogenesis of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish. Res. Board Can* 36:587–591.
128. Swanson RN, Gillespie JH. 1982. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from the blood components of experimentally infected trout. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39:225–228.
129. Swanson RN. 1981. Use of indirect fluorescent antibody test to study the pathogenesis of infectious pancreatic necrosis virus infection in trout. *In: Anderson DP, Hennessen W, eds. Proceedings of the International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines.* National Fish Health Research Laboratory, S. Karger, Basel. p 71–77.
130. Taksdal T, Stangeland K, Dannevig BH. 1997. Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in Atlantic salmon *Salmo salar* and brook trout *Salvelinus fontinalis* by bath challenge of fry with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) serotype Sp. *Dis. Aquat. Org.* 28:39–44.
131. Toranzo AE, Barja JL, Lemos ML, Hetrick FM. 1983. Stability of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in untreated, filtered and autoclaved estuarine water. *Bull. of The Eur. Assoc. Fish Patholo.* 3:51–53.
132. Toranzo AE, Hetrick FM. 1982. Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters. *J. Fish Dis.* 5:223–231.
133. Tu K, Spendlove R, Goede R. 1974. Immunofluorescent cell assay infectious pancreatic necrosis virus. *Applied Microbiol.* 593–599.
134. Valasek MA, Repa JJ. 2005. The power of real-time PCR. *Adv in Physiol Educ* 29: 151-159.
135. Walker NJ. 2002. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 296: 557-559.
136. Wedemeyer GA. 1970. The role of stress in the disease resistance of fishes. *Am. Fish. Soc. Special Publ.* 5:30–35.
137. Williams K, Blake S, Sweeney A, Singer JT, Nicholson BL. 1999. Multiplex Reverse Transcriptase PCR Assay for Simultaneous Detection of Three Fish Viruses. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 37(12): 4139–4141.
138. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130–138.
139. Wolf K, Quimby M. 1971. Salmonid viruses: Infectious pancreatic necrosis virus. *Arch. Gesamte Virusfors.* 34:144–156.
140. Wolf K, Quimby MC, Bradford AD. 1963. Egg-associated transmission of IPNV of trouts. *Virology* 21:317–321.

141. Wolf K, Snieszko SF, Dunbar CE, Pyle E. 1960. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104:105–108.
142. Wolf K. 1988. Infectious pancreatic necrosis. In: *Fish Viruses and Fish Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, NY, U.S.A. p. 115–157.
143. Wood EM, Snieszko SF, Yasutake WT. 1955. Infectious pancreatic necrosis in brook trout. *Am. Med. Assoc. Arch. Pathol.* 60:26–28.
144. Wu JL, Hong JR, Chang CY, Hui CF, Liao CF, Hsu YL. 1998. Involvement of serine proteinase in infectious pancreatic necrosis virus capsid protein maturation and NS proteinase cleavage in CHSE-214 cells. *J. Fish Dis.* 21:215–220.
145. Yamamoto T. 1974. Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carriers and antibody production in a population of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Microbiol.* 21:1343–1347.

## VIII. ANEXOS

**Anexo 1.** Protocolo de Inmunofluorescencia Indirecta para el diagnóstico de IPNV mediante el kit IPNV-FluoroTest Indirecto™ de BIOS Chile™

Reactivos:

- **Reactivo Oligoclonal (200X):** mezcla de anticuerpos monoclonales altamente específicos para IPNV. El anticuerpo está concentrado en una solución, que además contiene albúmina de bovino y 0.1% azida de sodio como estabilizadores. El anticuerpo debe ser diluido 1:200 con la Solución de Dilución antes de usar. Por ningún motivo se debe diluir por sobre lo recomendado, ya que una mayor dilución puede afectar tanto la sensibilidad, como la especificidad del ensayo.
- **Conjugado-FITC (100X):** Solución de anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato fluoresceína (FITC). Contiene 0,1% azida de sodio. El conjugado deber ser diluido antes de usarlo.
- **Solución de Lavado (25X):** solución amortiguadora-salina a pH 7,5 y concentrada 25 veces. Antes de usar se debe diluir 25 veces con agua destilada. La solución diluida tiene un pH alrededor de 7,5 y es estable por al menos 1 año a una temperatura de 4°C.
- **Solución de Dilución:** solución proteica opalescente para la dilución del Reactivo Oligoclonal y del Conjugado-FITC.

Procedimiento:

1. Agregue sobre cada frotis 100 µL del Reactivo Oligoclonal, previamente diluido 1:200 con la Solución de Dilución e incube los portaobjetos a temperatura ambiente por 30 minutos en una cámara húmeda cerrada. Evite que se seque la solución del anticuerpo.
2. Para lavar, traslade los portaobjetos a un recipiente adecuado el cual debe contener abundante Solución de Lavado previamente diluida 1:25 y déjelos reposar por 3-5 minutos. Repita este procedimiento tres veces más. Remueva los portaobjetos del recipiente y elimine el exceso de solución evitando que el tejido se seque.

3. Agregue sobre cada frotis 100  $\mu$ L del Conjugado-FITC, previamente diluido 1:100 con la Solución de Dilución. Incube los portaobjetos a temperatura ambiente por 30 minutos en una cámara húmeda cerrada y en oscuridad.
4. Repita el procedimiento de lavado descrito en el paso 2.
5. Ponga 10 a 20  $\mu$ L de solución de montaje, cubra la muestra con un cubreobjeto evitando la formación de burbujas, y tome la precaución de sellar el cubreobjeto con algún adhesivo disponible comercialmente. Las muestras se deben examinar en un microscopio de fluorescencia con un aumento de 1000X e inmersión para realizar el diagnóstico.

#### Resultados:

- Se considerará a una muestra como positiva al presentar una fluorescencia verde difusa específica en el citoplasma de las células infectadas.
- Una muestra se considerará negativa por ausencia de fluorescencia en las células.

**Anexo 2.** Protocolo de Extracción y Purificación de ARN mediante el Kit Purelink™ Micro-To-Midi Total RNA Purification System - Invitrogen

Reactivos:

- Solución de Lisis RNA
- Buffer de Lavado I
- Buffer de Lavado II
- Agua libre de nucleasas
- 2-mercaptoetanol (no proveído en el kit)
- Etanol 96-100% (no proveído en el kit)
- Etanol 70% (no proveído en el kit)

Preparaciones previas:

1. Buffer de Lavado II

El kit proporciona 15ml de Buffer de Lavado II, el cual al ser utilizado por primera vez debe prepararse con alcohol absoluto:

60 ml de etanol 96-100%

15 ml de Buffer de Lavado

\* Marcar en el cuadrado del recipiente al agregar el alcohol.

2. Solución de Lisis

Preparar la solución de Lisis con 2-mercaptoetanol al 1% en el volumen necesario para las muestras a extraer en un tubo estéril.

Agregar 1% de 2-mercaptoetanol 100% al Buffer de Lisis:

<b>Componente</b>	<b>Volumen/muestra</b>	<b>Nº de muestras (X)</b>
Buffer de Lisis	1.2ml	1.2X ml
2-mercaptoetanol (100%)	12ul	12X ul

Procedimiento:

1. En un tubo de microcentrífuga de 2ml agregar:
  - Para muestras a partir de machacado de tejido:  
250ul de muestra  
1.2 ml de Buffer de Lisis (anexo 1).
  - Para muestras a partir de cultivo celular:  
600ul de muestra  
600ul de Buffer de Lisis (anexo 1).  
Agitar por 45 segundos.
2. Centrifugar a 2600g por 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Transferir 750ul del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 2ml libre de nucleasas (autoclavado).
4. Agregar 750ul de etanol al 70%.
5. Mezclar y agitar brevemente en un vórtex.
6. Transferir 700ul de muestra al cartucho preinsertado al tubo de colección (proporcionado por el kit).
7. Centrifugar a 12000 g por 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar fluido presente en el tubo.
8. Agregar 700ul de Buffer de Lavado I (proporcionado en el kit) sobre el cartucho. Centrifugar a 12000g por 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar el fluido del tubo (y el tubo).
9. Colocar el cartucho en el tubo de lavado proporcionado por el kit.
10. Añadir 500ul de Buffer de Lavado II con etanol (anexo 1).
11. Centrifugar a 12000g por 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar el fluido del tubo.
12. Repetir pasos 10 y 11 (añadir 500ul B. Lavado II + etanol. Centrifugar a 12000g por 15 segundos y descartar fluido).
13. Centrifugar a 12000g por un minuto.
14. Descartar el tubo con fluido y colocar el cartucho en un tubo de recuperación del kit.
15. Eluir el ARN agregando 75ul de agua libre de nucleasas. Incubar por un minuto.
16. Centrifugar por 2 minutos a 12000g a temperatura ambiente.
17. Colectar el eluido en el mismo tubo. Alicuotar a 25ul en viales de microcentrífuga estériles.
18. Guardar a  $-80^{\circ}$  C previa identificación.

**Anexo 3.** Protocolo de la Técnica de RT-PCR en tiempo real mediante El Kit “Sybr® Greener™ Two-Step Qrt-Pcr Kit Universal” – Invitrogen

El kit permite la realización de la técnica en 2 pasos:

- SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix, para la síntesis de ADNc a partir de ARN (paso de RT).
- SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal, para la realización de la técnica de PCR a partir del ADNc obtenido.

**1ºMódulo: Protocolo General para la Síntesis de ADNc  
“SuperScript™ III First-Strand Synthesis Supermix”**

Reactivos:

1. Mix Enzima RT
2. Mix 2X RT Reaction (incluye oligo (dT), hexámeros).
3. RNasa H (E. coli)
4. Agua libre de nucleasas (no proveído en el kit)

Procedimiento:

1. Combinar los componentes del kit en la siguiente proporción (para múltiples reacciones preparar una mezcla común en la misma proporción):

<b>Componentes</b>	<b>Volumen/muestra</b>	<b>Nº de muestrasX</b>
2X RT Reaction Mix	10ul	10X ul
RT Enzyme Mix	2ul	2X ul
ARN (muestra extraída)	1ul	
Agua libre de nucleasas	7ul	7X ul
<b>Total Volumen/muestra</b>	<b>20ul</b>	

2. Programación del Termociclador:  
Programar el termociclador con el siguiente perfil térmico:
  - 25°C por 10 minutos
  - 50°C por 30 minutos
  - 85°C por 5 minutos
  - Mantener a 4°C.
3. Agregar 1ul de RNasa H (proveído por el kit) e incubar a 37°C por 20 minutos, luego mantener a 4°C.
4. El ADNc obtenido puede utilizarse inmediatamente o almacenarse a -20°C hasta su utilización.

**2° Módulo: Protocolo General de la Técnica de PCR**  
**“SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal”**

Reactivos:

1. Mix “SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal”.
2. Colorante de referencia ROX
3. Agua libre de nucleasas (no proveído en el kit)

Procedimiento:

1. Programación del Termociclador:

El perfil térmico indicado es el siguiente:

50°C por 2 minutos

95°C por 10 minutos

40 ciclos de:

95°C por 10 segundos

60°C por 1 minuto

Luego mantener a 4°C

2. Preparación de la mezcla de Reacción:

El volumen de reacción a utilizarse es de 20ul donde la cantidad de templado es de 1ul. La mezcla de los componentes (sin incluir templado) ha de prepararse en un vial de microcentrífuga estéril libre de nucleasas y mezclar ligeramente en un vórtex. Para múltiples reacciones, preparar un mix común en la proporción adecuada según el siguiente cuadro:

Proporción de los componentes del Mix de reacción (volumen de reacción de 20ul)

<b>Componentes</b>	<b>Volumen/muestra</b>	<b>N°de muestrasX</b>
SYBR®GreenER™qPCR SuperMix Universal	10ul	10X ul
Primer Forward, 10uM	0.4ul	0.4X ul
Primer Reverse, 10uM	0.4ul	0.4X ul
ROX 1:10 (colorante de referencia)	1ul	1X ul
Templado (ADNc)	1ul	
Agua libre de nucleasas	7.2ul	7.2X ul
<b>Total Volumen/muestra</b>	<b>20ul</b>	

3. Preparación de la Microplaca de PCR:
  - Colocar 19ul de la mezcla en cada pocillo de la microplaca de PCR. Corroborar que la mezcla se encuentre en el fondo del pocillo.
  - Colocar 1ul de templado en cada pocillo completando los 20ul de volumen de reacción. Pipetear ligeramente para corroborar que el templado se ha mezclado con los demás componentes. Tapar los pocillos.
4. Llevar la microplaca al termociclador e iniciar el proceso. Colectar y analizar los resultados.