



José G. Olveira Hermida

Tesis Doctoral

Diseño y evaluación de técnicas moleculares para diagnóstico de birnavirus acuáticos

Departamento de Microbiología y Parasitología
Instituto de Acuicultura

Juan L. Barja y **Carlos P. Dopazo**, Profesores del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada **“Diseño y evaluación de técnicas moleculares para diagnóstico de birnavirus acuáticos”** que presenta D José G. Olveira Hermida para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en el Departamenteo de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, bajo nuestra dirección y, considerando que se haya concluida, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Santiago de
Compostela a 15 de Febrero de 2006.

Fdo: José G. Olveira
Doctorando

Fdo. Dr. Juan L. Barja
Dir. Tesis

Fdo: Dr. Carlos P. Dopazo
Dir Tesis

En este tipo de trabajos siempre existen, en mayor o menor número, aportaciones de diversa índole que contribuyen de una u otra forma al término del mismo. Es ahora el momento de reflejar y agradecer estas contribuciones. Vayan por delante mis disculpas por los no citados y que nadie se sienta ofendido por mi pésima memoria.

En primer lugar debo agradecer a Alicia E. Toranzo y Juan L. Barja su apoyo a la hora de iniciar este trabajo en el departamento. A mis directores de tesis, Juan L. Barja y Carlos P. Dopazo, y especialmente a este último, por sus continuas muestras de apoyo y siempre acertados consejos, así como por estar siempre ahí en cuanto los he necesitado.

A todos los compañeros que han pasado por el grupo durante la realización de este trabajo, muchos de los cuales ya se han ido..

A Isa, que no para ni un momento, y que no se como hemos podido sobrevivir sin ella hasta su vuelta, ¡un milagro!!!!; A Juanma, por su constante ayuda en todo lo que he necesitado, por su brevedad, concreción y rápidas respuestas a todas mis incógnitas...

A Alian, Carmen y Johnny, por su apoyo constante y desinteresada ayuda, y por hacer todo este tiempo más llevadero. A Susana, que se nos ha ido, y espero que todo le vaya bien. A Ysa, Sol, Bea, Sandra y Carlos Osorio; a todos ellos gracias por todo.

A mis padres, por su apoyo incondicional y constante, sin el cual este trabajo no habría sido posible.

Y por último, y no menos importante, a Mary y Ainara, que tienen una parte muy importante en todo esto, y que han sido sobre todo el estímulo más importante para finalizar este trabajo

INDICE

<u>Capítulo I: INTRODUCCION</u>	1
Principales grupos virales de importancia en acuicultura.	6
• Familia <i>Rhabdoviridae</i> .	6
• Familia <i>Nodaviridae</i> .	7
• Familia <i>Retroviridae</i> .	7
• Familia <i>Reoviridae</i> .	8
• Familia <i>Herpesviridae</i> .	9
• Familia <i>Iridoviridae</i> .	9
• Familia <i>Paramyxoviridae</i> .	10
• Familia <i>Orthomyxoviridae</i> .	11
• Familia <i>Birnaviridae</i> .	11
Familia <i>Birnaviridae</i> .	11
Propiedades biofísicas de IPNV.	16
Características del virión.	16
Estructura y expresión génica.	17
Proteínas virales.	19
Características antigénicas de IPNV.	21
Replicación viral y susceptibilidad celular.	24
Transmisión y patologías.	26
Estado actual del diagnóstico y prevención del virus IPN.	28
Identificación de IPNV.	30
Técnicas tradicionales de diagnóstico.	31
Microscopía electrónica.	31
Aislamiento en cultivo celular.	32

Técnicas Serológicas.	33
Seroneutralización.	33
Inmunoensayo enzimático (ELISA).	34
Inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa.	35
Inmunodot.	36
Técnicas moleculares.	36
Análisis Electroforético.	37
Hibridación de ácidos nucleicos.	37
Reacción en cadena de la polimerasa, PCR.	38
<u>OBJETIVOS</u>	41
<u>Capítulo II: VALORACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE RNA</u>	45
INTRODUCCION.	47
MATERIAL Y METODOS	49
Líneas celulares y condiciones de cultivo.	49
Virus y propagación viral.	50
Titulación Viral.	50
Extracción del genoma viral	51
Proteinasa K/Fenol-Cloroformo	51
Trizol LS Reagent (Invitrogen)	52
RNeasy® Mini Kit (Qiagen)	52
Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel)	53
Perfect RNA™ Eukaryotic Mini (Eppendorf)	54
Evaluación de la capacidad de Extracción.	54
Cálculo espectrofotométrico de la concentración.	55
Electroforesis en Geles de poliacrilamida.	55
RT-PCR.	56
RESULTADOS	56

Valoración de la concentración y pureza del ácido nucleico mediante	
Espectrofotometría.	56
Electroforesis en Geles de Acrilamida	60
RT-PCR	60
DISCUSION	63
<u>Capítulo III: OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE IPNV</u>	
INTRODUCCION.	69
MATERIAL Y METODOS.	70
Cepas virales y propagación de virus.	70
Optimización de la RT-PCR “in Vitro”	72
Evaluación de sistemas comerciales de RT-PCR	72
GeneAmp® RNA PCR kit, Applied Biosystem.	73
GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent Kit, Applied Biosystem.	73
PCR Reagent System, Invitrogen.	74
<i>Tth</i> DNA Polimerasa, Promega.	75
Access RT-PCR system, Promega	76
SuperScript™ II One-Step RT-PCR con Platinum® <i>Taq</i> , Invitrogen.	76
SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System, Invitrogen	77
Titan One Tube RT-PCR System, Roche Diagnostic GmbH.	77
SuperScript III Reversotranscriptasa.	78
Evaluación de cebadores.	79
Selección de cebadores.	79
Obtención del RNA Viral.	81
RT-PCR.	82
Evaluación de la especificidad de la RT-PCR.	82
Preparación y marcaje de las sondas de cDNA	82
Southern Blot (SB).	83
Hibridación de ácidos nucleicos.	83

Evaluación de la sensibilidad: Cinética de detección <i>in vitro</i> .	84
Determinación de la MOI límite.	84
Determinación del título viral y tiempo mínimo detectables.	85
Evaluación de la sensibilidad: Cinética de detección <i>in vivo</i> .	87
Inoculación experimental de virus IPNV	87
Cinética de detección “ <i>in vivo</i> ”.	88
Evaluación de la sensibilidad de la RT-PCR.	90
RESULTADOS.	91
Optimización de la RT-PCR <i>in vitro</i> .	91
Evaluación de sistemas comerciales de RT-PCR.	91
Gene Amp® RNA PCR Kit /RNA PCR Core Kit, Applied Biosystems.	91
GeneAmp® Gold RNA PCR reagent Core kit, Applied Biosystems.	93
PCR Reagent System, Invitrogen.	93
<i>Tth</i> DNA Polimerasa, Invitrogen.	94
Access RT-PCR System, Promega.	96
SuperScript™ II One-Step RT-PCR con Platinum® Taq y SuperScript™ III Platinum®	
One-Step Quantitative RT-PCR System, Invitrogen.	96
Titan One Tube RT-PCR System, Roche Diagnostic GmBH.	97
SuperScript III Reversotranscriptasa.	97
Evaluación de Cebadores.	98
Cebadores para el segmento A	98
Cebadores correspondientes al segmento B	99
Evaluación de la especificidad.	100
Evaluación de la sensibilidad: Cinética de detección <i>in vitro</i> .	101
Curva de replicación en cultivos celulares.	101
Tiempo mínimo para detección de RNA viral en cultivos celulares mediante RT-PCR.	102
Optimización de la RT-PCR <i>in vivo</i> .	107
Detección mediante RT-PCR.	114
Limite de detección.	137
DISCUSION.	116

Capítulo IV: OPTIMIZACIÓN Y VALORACIÓN DE LA HAN PARA DETECCIÓN DE IPNV	123
INTRODUCCIÓN.	125
MATERIAL Y METODOS.	127
Cepas virales.	127
Cultivo celular y propagación de virus.	128
Extracción y purificación del RNA Viral.	129
Obtención y purificación de las sondas de cDNA.	130
Marcaje de las sondas de cDNA.	132
Marcaje con radiactivo.	132
Marcaje con digoxigenina (DIG).	133
Dot-Blot de las muestras problema.	133
Hibridación de ácidos nucleicos. Condiciones de hibridación.	134
Hibridación con sondas de cDNA marcadas con $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP.	134
Hibridación con sondas de cDNA marcadas con digoxigenina.	135
Análisis de las placas autorradiográficas.	136
Experimentos de Cinética de detección.	136
Ensayos <i>in vitro</i> .	136
Ensayos <i>in vivo</i> .	137
Evaluación de la sensibilidad.	138
RESULTADOS	140
Sondas de cDNA.	140
Evaluación inicial de las condiciones de hibridación	141
Condiciones de estringencia.	141
Selección del tipo de marcaje..	142
Evaluación de las sondas de cDNA: especificidad para la detección de RNA de IPNV.	142
Límite de detección.	142
Especificidad.	143
Cinética de detección <i>in vitro</i> .	146

Cinética de detección <i>in vivo</i> .	148
DISCUSIÓN.	151
<u>CONCLUSIONES</u>	157
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	161

CAPITULO I:
Introducción

La cría de especies piscícolas es conocida desde tiempos inmemoriales. Se tienen referencias de esta práctica desde hace siglos en China (año 470 a.C.), antiguo Egipto, en el Imperio Romano y en diferentes países de Asia, siendo poco a poco introducida en Europa Occidental y desarrollándose durante la Edad Media preferentemente en monasterios y abadías.

El auge de la acuicultura en nuestra era se podría datar entre los siglos XVIII y XIX en Francia, con el desarrollo y primeros ensayos de aplicación de la fecundación artificial de huevos de peces. A mediados del siglo XIX, en España, Graells (1864) publica el Manual Práctico de Piscicultura y se constituye el Laboratorio Ictiogénico de La Granja de San Ildefonso, apareciendo simultáneamente la primera piscifactoría privada de trucha en el Monasterio de Piedra (Aragón). Desde estos comienzos hasta nuestros días la acuicultura ha experimentado una expansión espectacular, situándose nuestro país entre los 12 primeros productores mundiales y uno de los primeros a nivel Europeo, suponiendo un 3% de la producción mundial y un 25% de la producción europea. Esta explosión ha sido posible, en gran parte, a los avances en conocimientos biológicos, nutrición y control de patologías.

De todos los problemas que afectan a la acuicultura, son las patologías uno de los más importantes. Al igual que otras especies animales en producción intensiva, los principales problemas sanitarios que afectan a los organismos acuáticos se atribuyen a una amplia variedad de agentes microbianos que engloban bacterias, virus, parásitos y hongos.

De todas las enfermedades de origen microbiano, las infecciones virales son las de mayor trascendencia, debido a la ausencia de tratamientos efectivos y a que los peces supervivientes de una epizootia viral pueden convertirse en portadores asintomáticos de la enfermedad, favoreciendo así el mantenimiento y la diseminación de la enfermedad,

así como la emergencia continua de nuevos agentes infecciosos. De hecho, siendo los agentes primarios de numerosas enfermedades, tienen la facultad de facilitar el desarrollo de agentes infecciosos secundarios.

La primera referencia en Occidente sobre enfermedades virales en peces la debemos a Bruno Hofer, que en 1904 cita en su libro a Gesner, un zoólogo medieval que hace 4 siglos describió una afección en carpa, que por su sintomatología podría ser la enfermedad de la viremia primaveral de la carpa. Con anterioridad, en manuscritos chinos de hace 3.000 años, se describía la existencia de patologías en cultivos de carpa que, también por su sintomatología, podrían corresponder a afecciones virales descritas en la actualidad (Wolf, 1988).

En la primera mitad de este siglo se describió una serie de enfermedades de animales acuáticos, para alguna de las cuales se sospechaba una etiología viral. Este es el caso de la “linfocistis”, enfermedad descrita por Weisseberg a principios de siglo (Plehn, 1924), y la “hinchazón infecciosa del riñón”, más tarde conocida como septicemia hemorrágica viral (Shäperclaus, 1938). Es también el caso de la enteritis catarral aguda, enfermedad originalmente descrita por M’Gonigle en 1941, que se cree que corresponde a la que en la actualidad es considerada como una de las mayores plagas en acuicultura: la necrosis pancreática infecciosa.

La confirmación de la etiología viral de estas enfermedades no sería posible hasta los años 50, en que la virología de animales acuáticos experimentó un importante impulso debido tanto a la gran cantidad de recursos implicados en ella como a los avances tecnológicos. Más que ningún otro factor, influyó en ello el desarrollo de los métodos de cultivo celular y de tejidos, lo cual permitió el aislamiento y propagación de los diferentes virus. En esta década se publicó la primera revisión sobre virus de peces, llevada a cabo en 1952 por Nigrelli y en la que se incluyeron 6 enfermedades de etiología viral, entre las cuales todavía no estaba la necrosis pancreática infecciosa (IPN).

El desarrollo de cultivos celulares (Clem y col., 1961, 1965; Wolf, 1965; Wolf y Quimby, 1962a, 1962b, 1966, 1969) pronto produjo importantes avances en la Virología, y más concretamente en la virología de peces, permitiendo la confirmación de la etiología viral de afecciones conocidas previamente, así como el aislamiento de nuevos virus.

Durante 1955, el examen histológico de truchas que presentaban síntomas de una enteritis catarral aguda reveló que ningún parásito ni bacteria estaba implicada en la enfermedad, sin embargo, en el páncreas mostraban necrosis similares a las producidas por el virus coxsackie (Wood y col., 1955); este trabajo sentaría las bases de lo que se conocería como la necrosis pancreática infecciosa, cuya etiología viral sería demostrada por Wolf y col. en 1959. Pocos años después, Ross y col. (1960) informan que alevines de salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) estaban sujetos a epizootias en las cuales estaba implicado un agente filtrable; veinte años más tarde, esta enfermedad se denominaría “necrosis hematopoyética infecciosa”.

En los 60, Jensen (1963, 1965) aísla el virus Egtved, agente etiológico de la septicemia hemorrágica vírica, y en 1966 Wolf y col. aíslan el virus de la linfocistis. También en esta década se comienzan a realizar los primeros estudios biofísicos y de biología molecular de los virus, lo cual permite la caracterización y clasificación de numerosos agentes etiológicos virales. El virus de la linfocistis y el virus de la IPN pronto reciben la atención de los investigadores; Moss y Gravel (1969) caracterizan el virus de la necrosis pancreática infecciosa, y sus trabajos llevan a Dobos y col. (1977) a la proposición de una nueva familia vírica, la familia *Birnaviridae*. En 1964, Wolf describe las características de los virus conocidos. Estos virus, junto con su enfermedad asociada (17 etiologías) serían tratados en revisiones posteriores (Malsberger y Wolf 1966; Wolf, 1966).

Diferentes revisiones se suceden en estas tres últimas décadas, en paralelo con el aislamiento de nuevos virus y el descubrimiento de otros mediante su visualización al

microscopio electrónico. Concretamente, a principios de los años 80 ya se habían aislado 17 agentes virales distintos, y otros 15 habían sido puestos de manifiesto por medio de microscopía electrónica (Wolf y Mann, 1980). En una revisión posterior, Wolf (1984) incluye 50 entidades virales conocidas, y 4 años más tarde, en 1988, este mismo autor publicó un libro en el que se recogían 34 aislamientos y 25 detecciones por microscopía electrónica (Wolf, 1988). Transcurridos 5 años desde esa última revisión se describieron otros 35 agentes virales que afectan a animales acuáticos y que pertenecen a gran variedad de grupos taxonómicos (Hetrick y Hedrick, 1993).

Principales grupos virales de importancia en acuicultura.

Se ha descrito un gran número de agentes virales incluidos en una gran variedad de grupos taxonómicos. Sin embargo, la mayoría, o al menos los de mayor relevancia por ser causa de las mayores pérdidas en acuicultura, se encuentran distribuidos en los siguientes grupos:

- Familia *Rhabdoviridae*.

Constituye uno de los grupos virales que incluye un mayor número de virus aislados de peces teleósteos y ha adquirido gran importancia debido al creciente número de aislamientos en la última década, tanto a partir de peces como crustáceos. Se trata de virus envueltos, cuyo genoma está constituido por RNA de cadena sencilla y presenta 5 proteínas estructurales. Al microscopio electrónico presentan una característica forma de bala, mostrando un tamaño de 100 a 430 nm de longitud y de 40 a 100 nm de espesor. Se encuentran asociados a epizootias, causando graves pérdidas en peces juveniles y adultos en todo el mundo.

Los dos virus más estudiados son el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), los cuales están asociados a enfermedades de salmónidos en Europa y América

del Norte; sin embargo, al menos en el caso del VHSV el virus se ha diseminado a otras áreas de Estados Unidos y al resto del mundo debido a la importación de peces y huevos contaminados.

Otros rhabdovirus a destacar son: el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV), adscrito a Europa, el rhabdovirus de alevines de lucio (PFRV), también en Europa, y el rhabdovirus de anguila (EVA).

- Familia *Nodaviridae*.

Esta familia está constituida por dos géneros: los alfanodavirus, que afectan a insectos, y los betanodavirus, que afectan a peces. Los betanodavirus son virus de morfología icosaédrica, no envueltos, de 25 a 34 nm de diámetro, con genoma compuesto por RNA de cadena sencilla y bisegmentado, compuesto por dos moléculas de 3,1 y 1,4 Kda. (Tidona, 2002; Mayo y col., 2005).

Las afecciones causadas por nodavirus son, sin duda alguna, unas de las más importantes que han aparecido en los últimos años en la acuicultura mundial. Su rango de hospedadores comprende diversos insectos y peces, e incluso se ha demostrado que determinadas cepas pueden provocar parálisis seguida de mortalidad en ratones lactantes. En larvas y juveniles de un amplio espectro de peces (salmónidos, rodaballo, mero, dorada, lubina, fletán y lenguado) provocan un síndrome conocido como VNN (“viral nervous necrosis”), caracterizado por la aparición de vacuolizaciones a nivel del tejido nervioso central (encefalomielopatías), acompañadas de una elevada mortalidad, en ocasiones superior al 90 %.

- Familia *Retroviridae*.

La aparición de procesos tumorales en poblaciones de peces es algo que se conoce desde hace tiempo y que tiene una alta incidencia en acuicultura. Sin embargo, hasta el momento se conocen pocos retrovirus de animales

acuáticos; los conocidos desde más antiguo son: el sarcoma de walleye (Yamamoto y col., 1976), el linfosarcoma de lucio (Papas y col., 1976) y el fibrosarcoma de salmón atlántico (Duncan, 1978).

Otra enfermedad retroviral es la leucemia plasmocítica, diagnosticada desde 1987 en distintas explotaciones de salmón Chinook en Canadá (Newbound y col., 1991); su naturaleza retroviral fue puesta de manifiesto con la detección de actividad transcriptasa inversa en fracciones obtenidas en gradiente de sacarosa a partir de tejidos de animales infectados.

Mediante microscopía electrónica han podido verse partículas virales de tipo lentivirus en el interior de las vacuolas citoplasmáticas en cortes de secciones de fibromas o fibrosarcomas de *Agonus cataphractus* (Anders y col., 1991).

- Familia *Reoviridae*.

Durante la última década del siglo XX, se ha aislado un creciente número de virus pertenecientes a esta familia, a partir de una gran variedad de animales acuáticos, incluyendo moluscos y crustáceos. Estos aislados presentan unas características diferentes a las de los géneros de reovirus aislados de homeotermos, por lo que recientemente el *Comité Internacional de Nomenclatura Virica* (ICTV) ha aprobado la creación del género *Aquareovirus* para los reovirus aislados de animales poiquilotermos, denominación sugerida previamente por Winton (1989).

Se trata de virus icosaédricos de unos 60-80 nm de diámetro, que presentan dos cubiertas proteicas. Su genoma está constituido por 11 segmentos de RNA bicatenal (Lupiani y col., 1995). En cultivos celulares produce un efecto citopático (ECP) caracterizado por la formación de sincitios.

De entre todos los aquareovirus descritos hasta ahora, cabe destacar el reovirus del rodaballo (TRV) y el aquareovirus de la dorada (SBA), ambos

aislados en Galicia (Lupiani y col., 1989; Bandín y col., 1995), además del CSV, aislado por Winton y col. (1981) en Japón, el CRV, aislado por Hedrick y col. (1984) a partir de pez gato en U.S.A., el LSV (Hsu y col., 1989), el CSR (Winton y col., 1989), el SRV (Marshall y col., 1990), el SBR (Baya y col., 1990) y el ASR (Moore y McMenemy., 1988b). Importante citar el reovirus de la carpa herbívora (GRV) aislado por Chen y Jiang (1984) y causante de una enfermedad hemorrágica y que provoca mortalidad en distintas especies de carpa (Li y col., 1997; Rangel y col., 1999; McEntire y col., 2003).

- Familia *Herpesviridae*.

Se trata de virus envueltos, con genoma compuesto por DNA bicatenal. Inducen enfermedades de consideración variable, desde infecciones subclínicas hasta graves hemorragias acompañadas de mortalidades importantes. En su mayoría se encuentran asociados a proliferaciones celulares de la epidermis y se ha demostrado el carácter oncogénico de determinados herpesvirus de salmónidos y ciprínidos (Hedrick y Sano, 1989).

El primer herpesvirus aislado fue el CCV (el virus del pez gato, *Ictalurus punctatus*), que provocaba abundantes mortalidades en larvas y alevines de menos de 4 meses. Posteriormente se aislaron herpesvirus de salmónidos, de carpa y de walleye. También se han detectado otros virus, aunque solamente por microscopía electrónica, como el *Herpesvirus scophthalmi*, encontrado en rodaballo (Buchanan y Madeley, 1978; Buchanan y col., 1978; Hellberg y col., 2001).

- Familia *Iridoviridae*.

Esta familia contiene virus que han sido aislados de invertebrados (principalmente insectos) y de vertebrados poiquilotermos, entre los que se encuentran los peces. Se trata de virus de simetría icosaédrica, de 130 a 360 nm de diámetro, con un DNA de doble cadena de gran tamaño.

Causan problemas a nivel de la dermis (virus de la linfocistis) y también desórdenes a nivel sanguíneo (virus de la necrosis eritrocitaria, o virus VEN), llegando a provocar mortalidades de hasta el 100% en poblaciones de alevines. Recientemente ha sido relacionado con mortalidades en explotaciones de rodaballo en Corea (Kim y col., 2005).

- Familia *Paramyxoviridae*.

El primer aislamiento de un paramixovirus en animales acuáticos fue realizado por Winton y col. en 1985 a partir de salmón Chinook, aunque hasta el momento no se ha demostrado su patogenicidad. Los componentes de este grupo se caracterizan por su apariencia pleomórfica al microscopio electrónico, con un tamaño entre 125 y 250 nm, y porque son los únicos virus capaces de hemaglutinar eritrocitos de peces, mamíferos y aves.

En 1989, Miyazaki y col. describieron un paramixovirus que causaba una necrosis epidérmica en larvas de pargo japonés (*Acanthopagrus schelgeli*). Aparecían, al microscopio electrónico, partículas esféricas de aproximadamente 300-370 nm de diámetro situadas en el citoplasma de las células. En infecciones naturales la enfermedad transcurre en 25-30 días y puede llegar a provocar el 100% de mortalidad.

Cepeda y col. (1993) describieron, por primera vez en Galicia, un nuevo síndrome que, provocado por un virus tipo paramixovirus, era causante de altas mortalidades en piscifactorías de rodaballo. Esta enfermedad, en su momento causante de importantes pérdidas en la acuicultura gallega, se caracterizó porque los peces afectados presentaban hemorragias tanto en la base como en las propias aletas y en otros puntos de la musculatura, cabeza, opérculo y cavidad oral; internamente la cavidad peritoneal presenta acumulación de líquido ascítico, y la masa visceral muestra un aspecto pálido y hemorrágico.

- Familia *Orthomyxoviridae*.

Se trata de virus envueltos de naturaleza entre esférica y pleomórfica, de 80 a 130 nm de diámetro, con genoma compuesto por 7-8 fragmentos de RNA monocatenal, según el género de que se trate.

El agente etiológico más importante de esta familia, en lo que a la acuicultura se refiere, es el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), de un tamaño entre 100 y 130 nm, envuelto, con un genoma de polaridad negativa compuesto por 8 fragmentos de RNA monocatenal (Falk y col., 1997; Mjaaland y col., 1997). Provoca uno de los síndromes más importantes que afectan a salmónidos hoy en día con una sintomatología que consiste en anemia, ascitis, hemorragias en ojos, congestión y alargamiento de hígado, bazo y mucosa intestinal, degeneración hepática y necrosis, y hemorragias en riñón (Dannevig y Falk, 1994; Nylund y col., 1995).

Está asociado a mortalidades en piscifactorías marinas. La primera descripción de una epizootia data de 1984 en Noruega (Thorud y Djupvik, 1988), y hasta la actualidad ya se han descrito epizootias en Escocia, Irlanda, U.S.A. y Canadá (Office Internacional des Epizooties, 2003).

- Familia *Birnaviridae*.

Esta familia se describe con más detalle a continuación, dado que es el virus objeto de este estudio.

Familia *Birnaviridae*.

En 1941, el médico canadiense M'Gonigle describe una enfermedad desarrollada en salmónidos juveniles, caracterizada por natación errática y en espiral, enfermedad que él denominó “enteritis catarral aguda” y que estaba relacionada con altas mortalidades en alevines y peces jóvenes. Los análisis microbiológicos no revelaban presencia de bacterias, pero en el intestino de los peces enfermos aparecía un protozoo flagelado del

género *Hexamita*, al que en un primer momento se consideró causante del síndrome. M'Gonigle demostró que la enteritis catarral aguda se producía sin que el protozoo estuviese presente. Probablemente este síndrome se corresponde con la primera descripción de lo que luego se llamaría “necrosis pancreática infecciosa” (IPN).

En 1958 se describe el primer aislamiento del virus causante de este síndrome, el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), siendo el primer virus de peces cultivado *in vitro* (Wolf y col., 1959); más tarde se depositaría en la ATCC (American Type Culture Collection) la primera cepa de IPNV con la denominación de VR-299; esta cepa pronto sería considerada la cepa prototipo de este grupo de virus, categoría que luego perdería a favor de la cepa West Buxton (WB).

Hasta la creación de la familia *Birnaviridae*, al virus IPNV se le ha colocado en diversos grupos virales. En un principio, Malsberger y Cerini (1963) consideraron que este virus debía pertenecer a la familia *Picornaviridae*. La demostración de que su ácido nucleico era RNA bicatenario llevó a Moss y Gravell (1969) a proponer que el IPNV era un reovirus. Sin embargo, posteriores estudios de caracterización molecular de este virus y de otros semejantes como el DXV (virus X de la drosophila) y el IBDV (birnavirus de pollo), llevaron a la proposición de una nueva familia que incluiría a todos los virus con cápside icosaédrica y RNA bicatenal distribuido en dos segmentos (Dobos y Rowe, 1977; Dobos y col., 1977, 1979). En la reunión del ICTV de 1984, quedó establecida definitivamente la familia *Birnaviridae* (Brown, 1986), la cual comprendería tres géneros: *Aquabirnavirus*, que incluiría a todos los birnavirus aislados de animales acuáticos (cepa tipo: IPNV); *Avibirnavirus* (IBDV), que incluiría a todos los birnavirus aislados de aves y *Entombirnavirus* (DXV) que incluiría a birnavirus aislados de insectos (Tidona, 2002; Mayo y col., 2005) (Tabla I-1).

El virus IPNV es el prototipo de birnavirus; no sólo dentro de la familia Birnaviridae, sino incluso entre todos los virus de peces. Los birnavirus de animales

acuáticos forman el grupo más numeroso de la familia, siendo uno de los agentes etiológicos de mayor relevancia en peces cultivados en todo el mundo. El virus IPNV provoca una de las infecciones virales que implica mayores pérdidas en cultivos intensivos de salmónidos, así como de otras especies de animales poiquilotermos. Aunque el virus afecta principalmente a alevines, se ha aislado también a partir de peces

Tabla I.1.- Clasificación de la Familia *Birnaviridae* (Mayo y col., 2005)

Género	Especie	Tipo	Cepas tipo	Hospedador	Patogenicidad
<i>Aquabirnavirus</i>	Virus de la necrosis pancreática infecciosa	IPNV	WB VR-299 Jasper	Peces, moluscos, crustáceos	Elevada
<i>Avibirnavirus</i>	Virus de la enfermedad de la bursa del pollo	IBDV	002-72 STC	Aves	Elevada
<i>Entomobirnavirus</i>	Virus X de la drosófila	DXV		Insectos	Nula

adultos que no presentaban sintomatología aparente (Yamamoto, 1975a y 1975b; Reno y col., 1978; Wolf, 1988; Cahlawat y col., 2004; Munro y col., 2004); lo cual, unido al hecho demostrado de que la transmisión puede ser tanto horizontal como vertical, hace pensar que los individuos supervivientes de una epizootia pueden convertirse en portadores asintomáticos del virus (Ahne y Negele, 1985; Dorson y Torchy, 1985; McAllister y col., 1993), con el consiguiente riesgo que ello implica. En peces salmónidos, la enfermedad cursa como una gastroenteritis aguda acompañada de destrucción pancreática en forma de necrosis focales durante la fase de alevinaje; pasado un tiempo, a partir de los seis meses de vida, la enfermedad se convierte en asintomática, sin mortalidades aparentes. Los signos clínicos más importantes durante la fase aguda de la enfermedad son oscurecimiento de la piel, exoftalmia, hinchazón abdominal y con frecuencia se observa natación errática. Este virus también ha sido asociado con hemorragias craneales y en el líquido ascítico, además de nefritis y necrosis hematopoyética en peces no salmónidos (Sano y col., 1981; Castric y col.,

1987; Reno 1999).

Es un virus que presenta una distribución prácticamente a nivel mundial (fig. I.1). Desde que en 1955 fue aislado por primera vez por Wood y col. en los Estados Unidos a partir de *Salvelinus fontinalis*, se ha referenciado en un gran número de países de los cinco continentes. Así, en América, además de en EEUU, se ha aislado en Canadá (Mackelvie y Artsob, 1969), Chile (McAllister y Reyes, 1984), y Méjico (Ortega y col., 2001; Guerrero y col., 2002); en Australia (Crane y col., 2000); en Asia se ha aislado en Japón (Sano, 1971), Taiwan (Hedrick y col., 1983), Corea del Sur (Hah y col., 1984), Tailandia (Wattanavijjan y col., 1988), y China (Jiang Yulin, 1996); en Africa solamente se ha aislado en Sudáfrica (Bragg y Combrick, 1987).

En Europa el primer brote que se conoce se da en Francia a mediados de los años 60 (Besse y de Kinkelin, 1965). A partir de aquí comienza a aparecer en otros estados

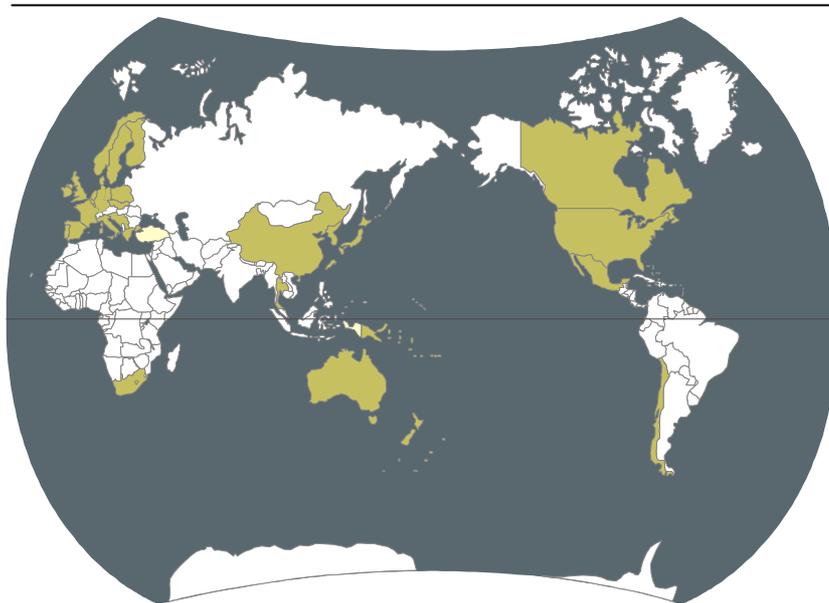


Fig. I.1.-Distribución geográfica de birnavirus acuáticos

Europeos; así, se aísla en Dinamarca (Jorgensen y Bregnballe, 1969), Escocia (Ball y col., 1971), Italia (Ghittino, 1972), Suecia (Ljungberg y Jorgensen, 1973), la Antigua Yugoslavia (Fijan, 1974), Alemania (Schlotfeldt y col., 1975), Noruega (Harstein y Krogssud, 1976), Inglaterra (Hill, 1982), la antigua Checoslovaquia (Pospisil y col., 1986), Grecia (Wolf, 1988) y en Portugal (Sousa y col., 1996). Además de estos aislamientos también existen noticias de otros en los Países Bajos y en Polonia (Antychowicz, 2000).

En España los birnavirus afectan fundamentalmente al cultivo de salmónidos (Ledo y col., 1990; Rodríguez y col., 1991, 1993), aunque han aislado también a partir de rodaballo (Novoa y col., 1993) y de moluscos marinos, los cuales podrían estar actuando como reservorios (Rivas y col., 1993).

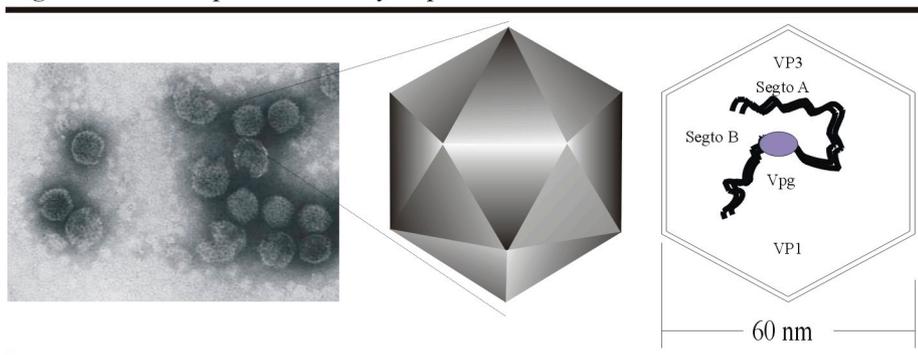
El rango de hospedadores comprende una treintena de familias de peces, 11 especies de moluscos (entre bivalvos, gasterópodos y cefalópodos) y 4 especies de crustáceos. Aunque en su origen se consideró que los birnavirus eran específicos de salmónidos (Parisot y col., 1963; Wolf y Pettijohn, 1970; Yamamoto, 1974; McAllister, 1983), otros muchos autores han descrito su presencia en peces no salmónidos, tanto de aguas continentales como marinos, y tanto salvajes como cultivados: lucio, lubina, rodaballo, bacalao, lenguado, anguila, dorada, limanda, carpín dorado, seriola, rémora, halibut, etc. (Sonstegard y col., 1972; Munro y col., 1976; Ahne, 1977; Castrick y Chastel, 1980; Stephens y col., 1980; Bonamy y col., 1983; Hedrick y col., 1983a; Hah y col., 1984; McAllister y Reyes, 1984; Schutz y col., 1984; Sorimachi y Hara, 1985; Olesen y col., 1988; Mortensen y col., 1990; Rodríguez y col., 1997). También se ha descrito su aislamiento a partir de moluscos, como la *Tellina tenuis* (Hill, 1976), almeja (Lo y col., 1988), vieira (Mortensen y col., 1990; Mortensen, 1993), mejillón (Rivas y col., 1993) y crustáceos (Bovo y col., 1984; Hill y Alderman, 1979), a partir de protozoos (Moewus-Kobb, 1965), e incluso se ha detectado por RT-PCR en zooplancton marino (Kitamura y col., 2003), postulándose su papel como reservorios.

Propiedades biofísicas de IPNV.

Características del virión.

La visualización al microscopio electrónico del virus purificado, revela que el IPNV es un virus icosaédrico no envuelto, con una única cápside hexamérica isométrica de un diámetro de 55 a 75 nm (Dobos y col., 1977; Todd y McNulty, 1979), aunque el tamaño más frecuente es de 60 nm (Fig. I.2). El virus tiene un peso molecular de 55×10^6 Da, con un coeficiente de sedimentación de 435 S y una densidad de flotación en CsCl de $1,33 \text{ gr/cm}^3$. La cápside proteica representa el 91,3% del peso total de la partícula viral, presenta un número de triangulación de 9 y está formada por 180 subunidades, estructuradas en 92 capsómeros (Cohen y col., 1971).

Fig. I.2.- Microscopia electrónica y esquema de un Birnavirus acuático



El ácido nucleico viral es RNA bicatenal, cuyo peso molecular de $4,8 \times 10^6$ Da representa el 8.7% del peso total del virión (Dobos, 1976); presenta un coeficiente de sedimentación de 14 S y un porcentaje de pares G-C del 54% (Cohen y Col., 1973). El genoma está constituido por dos segmentos, que se denominan A y B, de peso molecular $1,95$ a $2,6 \times 10^6$ y $1,72$ a $2,3 \times 10^6$ Da, respectivamente (Dobos, 1976; Dobos y col., 1979). Es necesario resaltar la gran

estabilidad de este virus, tanto en su medio natural (es menos estable en agua dulce que en agua de mar, donde la pérdida de título viral es muy baja), como en condiciones de laboratorio (Desautels y MacKelvie, 1975; MacKelvie y Desautels, 1975; Toranzo y Hetrick, 1982; Toranzo y col., 1983); conserva la infectividad durante meses en soluciones tamponadas, incluyendo medio de cultivo, a temperaturas inferiores a 4°C, y puede conservarse congelado a -70°C durante varios años. Por ser un virus sin envuelta lipídica, es resistente al tratamiento con éter o cloroformo, aunque pierde virulencia a pH extremo.

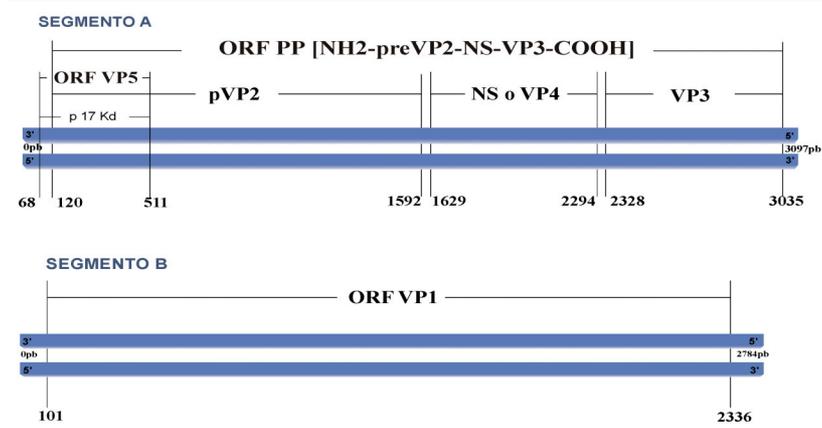
Estructura y expresión génica.

El conocimiento de las secuencias genómicas de algunas cepas ha permitido la construcción del mapa genómico de IPNV. La expresión génica es un tanto peculiar para un virus RNA: mientras uno de los segmentos es de naturaleza monocistónica (segmento B), el otro es funcionalmente bicistónico (segmento A). El mapa genómico de los birnavirus acuáticos es, en general, idéntico al de las cepas tipo de los otros dos géneros de la familia *Birnaviridae*.

El segmento A, de unos 3000 pb (3096 para la cepa Jasper), presenta dos marcos de lectura abierta (secuencias ORF); el mayor y más conocido (ORF PP) codifica una poliproteína de 106 KDa (NH₂-pVP2-NS-VP3-COOH), la cual es precursora de las proteínas estructurales VP2, NS (o VP4) y VP3, mediante modificación cotraduccional gracias a la actividad autoproteolítica de la región NS (Dobos y col., 1977; Magyar y Dobos, 1994; Birghan y col., 2000; Petit y col., 2000). El segundo ORF, que solapa con las secuencias iniciales del anterior, codifica una pequeña proteína de 17 KDa rica en arginina (Magyar y Dobos, 1994; Dobos, 1995); algunos autores proponen la denominación de VP5 para este polipéptido de 17 KDa, ante la posibilidad de que forme parte del virión (Havarstein y col., 1990; Dobos, 1995) (Fig I.3).

El segmento B (de 2748 pb, en la cepa Jasper) presenta un único ORF que codifica una proteína minoritaria, la VP1, presente en el interior de la cápside.

Fig. I.3-. Mapa genómico de la cepa Jasper de IPNV



Los dos segmentos contienen, a ambos extremos de la molécula, regiones no codificadoras de considerable tamaño; parece ser que estas secuencias tienen importancia en el reconocimiento de la polimerasa, la iniciación de la traducción y también, posiblemente, en el empaquetamiento del genoma (Duncan y col., 1991).

Existe una cierta homología entre las secuencias que se encuentran entre las regiones codificadoras: 32 de los 50 nucleótidos del extremo 5' están conservados, mientras que en el extremo 3' son de 29 a 50 los nucleótidos conservados. Ambos segmentos contienen secuencias repetidas e invertidas de 14 nucleótidos localizadas en los extremos 3'; secuencias del mismo tipo, aunque de 20 nucleótidos, se han encontrado en los extremos 5' del segmento A, pero no se ha encontrado este tipo de secuencias en el segmento B. Aunque todavía no se ha determinado la función de estas secuencias repetitivas, se sospecha que están implicadas en la regulación de la expresión del ORF de menor tamaño en relación

con el ORF mayor, a nivel del proceso de traducción (Dobos, 1995).

Proteínas virales.

Se ha descrito hasta un total de 10 polipéptidos diferentes en IPNV (Tabla I.2), de los cuales los denominados VP1, VP2, VP3 y VP4 (o NS) corresponden a las proteínas estructurales y los demás son no estructurales (Chang y col., 1978; Dobos y col., 1979; Hedrick y col., 1983b). Solamente 2 de los polipéptidos se corresponden con productos génicos primarios: la proteína VP1 (de 94 KDa), codificada por el segmento B, y la VP5 (de 17 KDa), codificadas por el segmento A; las demás proteínas virales se obtienen por modificación co-traduccional y post-traduccional a partir de la proteína PP (poliproteína pVP2-NS-VP3, de 105 KDa).

Tabla I.2- Proteínas de IPNV

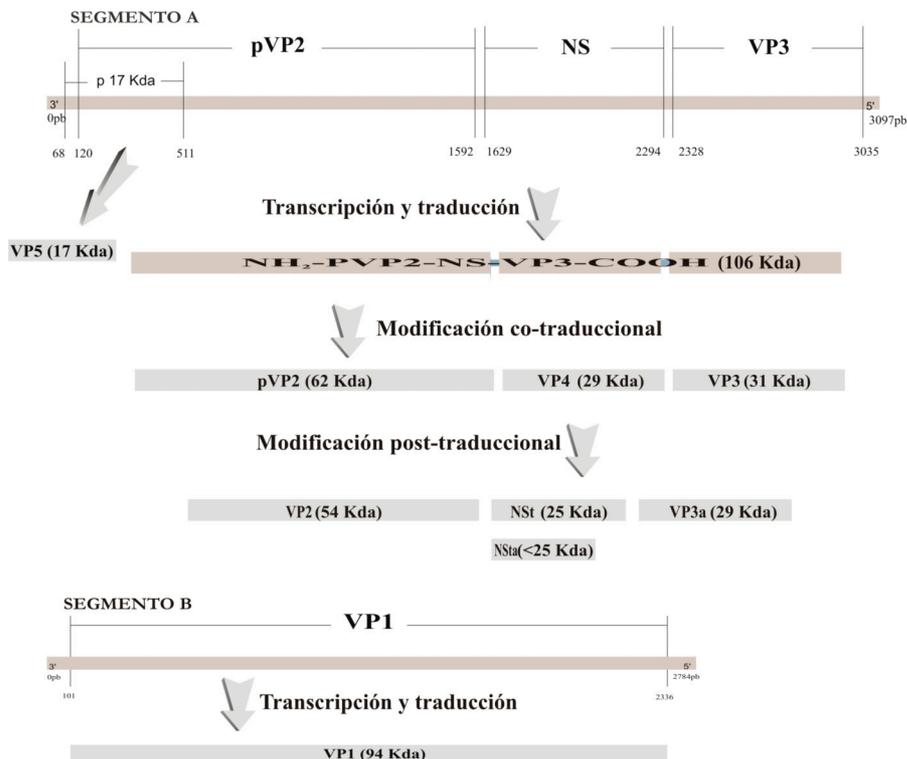
Nombre	Peso molecular ^a		% Masa ^d	n° molec/virión	Localización
	PAGE ^b	Secuencia ^c			
PP	101	106,6	-	Desconocido	Desconocido
VP1	105-90	94,44	4	22	Interna
pVP2	62-58	57-54	-	-	-
VP2	57-54	54	64	544	Externa
VP3	31-29	31	28	550	Interna/Externa
VP3a	29-27	27	6	122	Interna
VP4(NS)	29-27	29	<<1	Desconocido	Interna
NSt	25	25	-	-	Desconocido
NSta	>25	>25	-	-	Desconocido
VP5	17	17,350	<<1	Desconocido	Interna

^aPesos moleculares expresados en Kda; ^bPesos moleculares calculados mediante geles de acrilamida-SDS; ^cPesos moleculares calculados en función de la secuencia de aminoácidos para la proteína componente (datos obtenidos de Dobos, 1995). ^dPorcentaje de masa respecto a la masa del virión.

Como se muestra en la figura I.4, la modificación co-traduccional de la proteína PP genera las proteínas virales pre-VP2 (62 KDa) y NS (29 KDa), que algunos autores denominan VP4 (Cohen y col., 1973; Dobos y Rowe, 1977; Chang y col., 1978; Huang y col., 1986; Magyar y Dobos, 1994), y la proteína estructural VP3 (de 31 KDa). Dos de estas tres proteínas sufren

modificación post-traduccional; así, VP3 se modifica a VP3a, y pVP2 sufre una proteólisis parcial que da lugar a la proteína VP2, de 55 KDa, mayoritaria de la cápside; en ocasiones se genera también una proteína no estructural de 57 KDa. Estudios de mapas trípticos de los péptidos de IPNV demuestran que VP1, VP2, VP3 y VP4 son diferentes, mientras que VP3 y VP3a se solapan. Hace unos años, Havarstein y col. (1990) propusieron la existencia de una quinta proteína estructural, la VP5, detectada en autorradiogramas de geles de

Fig. I.4.- Expresión génica y modificación co- y post-taduccional



proteínas de virus IPN purificado; esta proteína se correspondería con la proteína de 17 KDa codificada por el ORF de menor tamaño del segmento A.

VP2 representa el 62% de la masa total del virión, con 544 unidades proteicas por virión, siendo la proteína mayoritaria de la cápside y responsable de la producción de anticuerpos monoclonales contra el virus. La proteína VP3 es la proteína más abundante en número de unidades por virión (550 por virión), aunque representa un 28% de la masa de la partícula viral; VP3a es una de las proteínas minoritarias (6 %), con 122 unidades; ambas se encuentran en el interior del virión, aunque algunos estudios parecen indicar que la VP3 podría encontrarse también en la superficie del virión (Caswell-Reno y col., 1986; Nicholson, 1993, Dobos, 1995). La proteína VP1 se corresponde con la polimerasa viral que, con 22 unidades por virión, representa el 4% de la masa total del virus; está localizada en el interior del virión, tanto en forma libre como asociada covalentemente a ambos segmentos genómicos, uniéndolos por su extremo 5' (Dobos, 1976; MacDonald y Dobos, 1981; Manley y col., 1986). Aunque en birnavirus no acuáticos se encuentra en grandes cantidades, en el caso de IPNV la proteína VP4 ha sido puesta de manifiesto en mínimas cantidades en el interior del virión (Magyar y Dobos., 1994), aunque se detecta fácilmente en células infectadas.

Características antigénicas de IPNV.

Este es uno de los aspectos que entraña una mayor complejidad, debido a que el virus IPNV es altamente heterogéneo a nivel serológico y a que todos los aislados muestran una cierta interrelación.

Originalmente, MacDonald y Gower (1981) describieron 3 serotipos diferentes aunque antigénicamente relacionados: uno americano, correspondiente

a la cepa VR-299, y dos europeos, correspondientes a las cepas Abild (Ab) y Spjarup (Sp), originalmente aislados por Jørgensen y Kehlet (1971). La caracterización de estos tres tipos había sido realizada en base a estudios de neutralización con anticuerpos policlonales, en caracteres fenotípicos y en características biofísicas (tamaños de los segmentos genómicos y de las proteínas virales).

La aplicación de la técnica de seroneutralización cruzada a una mayor variedad de cepas, y la utilización de la tasa de reacción cruzada, permitieron a Hill y Way (1983) proponer el establecimiento de 2 serogrupos (Serogrupos I y II), antigénicamente distintos, que mostraban una tasa de reacción cruzada superior a 10. El serogrupo I estaría constituido por 9 serotipos distintos, con una tasa de reacción cruzada inferior a 10 (Ishiguro y col., 1984; Okamoto y col., 1983).

En su última revisión, Hill y Way (1995) propusieron una nueva nomenclatura para denominar a los serogrupos y serotipos de IPNV, pasando a denominarse serogrupos A y B, de tal manera que el serogrupo A estaría constituido por los serotipos A₁ a A₉ y el serogrupo B por un único serotipo, el serotipo B₁ (Tabla I.3).

Así, el serotipo A estaría constituido correspondientemente por las cepas WB, Sp, Ab, He, Te, C1, C2, C3 y Jasper, mientras que el serotipo B estaría constituido únicamente por la cepa TV-1. Existe además una serie de aislados que no se pueden integrar en estos serotipos, y que se denominan comúnmente como MaB (marine birnavirus), lo que ha llevado a algunos autores a postular la existencia de un tercer serogrupo e incluso de un cuarto (Riji John y Richards, 1999; Dixon y col, 2001).

Tabla I.3.- Clasificación serológica de IPNV, según Hill y Way (1995).

Nomenclatura	Especie	Referencia	Origen	Cepa tipo	
<i>Serogrupo I</i>					
Serotipos	A ₁	<i>O. mykiss</i>	Lientz y Springer, 1973	USA	WB
	A ₂	<i>O. mykiss</i>	Jørgensen y Bregnballe, 1969	Europa	Sp
	A ₃	<i>O. mykiss</i>	Jørgensen y Grauballe., 1971	Europa	Ab
	A ₄	<i>Esox lucius</i>	Ahne, 1978	Europa	He
	A ₅	<i>Tellina tenuis</i>	Hill, 1976	Europa	Te
	A ₆	<i>Salmo salar</i>	MacDonald y col., 1983	Canadá	C1
	A ₇	<i>O. mykiss</i>	MacDonald y col., 1983	Canadá	C2
	A ₈	<i>S. trutta lacustris</i>	MacDonald y col., 1983	Canadá	C3
	A ₉	<i>O. mykiss</i>	Yamamoto, 1974	Canadá	Jasper
<i>Serogrupo II</i>					
B ₁	<i>Tellina tenuis</i>	Underwood y col., 1977	Europa	TV-1	

No existe, actualmente, una relación entre serotipos y distribución geográfica clara. De hecho serotipos de origen Europeo se han encontrado en América y viceversa (McAllister y Reyes., 1984; Novoa y col., 1993), probablemente tanto debido a los flujos migratorios de poblaciones de peces naturales como a los movimientos de peces de cultivo entre las diversas áreas (Dopazo y Bandín, 2006). De todas formas se puede decir que mayoritariamente los birnavirus más frecuentemente aislados en EE.UU. son de tipo WB, en Canadá de los tipos Canadian (C₁, C₂, C₃) y Jasper (serotipos A₆ a A₉), y en Europa son cepas tipo Ab y Sp (serotipos A₂ y A₃); mientras que en Asia, aunque se aíslan los serotipos A₁, A₂ y A₃ (tipo Sp, Ab y WB), predomina la cepa Ab (Hedrick y col., 1985). En Africa, hasta el momento solo se han aislado birnavirus pertenecientes al serotipo A₁ (cepa WB).

Replicación viral y susceptibilidad celular.

El virus IPNV replica en el citoplasma de las células a las que infecta, en las que el efecto citopático (ECP) que provoca se caracteriza por redondeamiento y deformación celular, con aparición de prolongaciones dendríticas; en las últimas fases de la replicación, el tapiz se rompe irregularmente, destruyéndose totalmente en pocas horas.

IPNV es capaz de replicar a un amplio rango de temperaturas, de 4°C a 37,5°C (Scherrer y Cohen, 1974; Scherrer y col., 1975), aunque replica mejor entre 10 y 25°C, siendo su temperatura óptima de 15-20°C. A 22°C un ciclo completo de replicación tarda en llevarse a cabo de 16 a 20 horas (Malsberger y Cerini, 1963), y a 15°C puede durar hasta 24 horas (Lannan y col., 1984). Las bajas temperaturas de replicación son una característica intrínseca del virus y no como resultado de que las células hospedadoras no puedan crecer a temperaturas más altas, sino debido a que los distintos procesos biosintéticos del virus requieren de esas bajas temperaturas (Roberts y Dobos, 1982).

La entrada del virus en la célula se produce por medio de un proceso de endocitosis mediada por un receptor de membrana (Granzow y col., 1997), poco después de la penetración, partículas virales son detectables en el interior de compartimentos citoplasmáticos vesiculares (Couve y col., 1992). A partir de las 4-6 horas p.i. mRNA virales, y polipéptidos de origen viral ya son detectables en el citoplasma, y a las 14 horas ya se puede detectar RNA bicatenal viral (Somogyi y Dobos, 1980; Villanueva y col., 2004). Finalmente, la progenie vírica se puede ver libre en el citoplasma o de forma agregada, como pseudocristales; también se observan estructuras tubulares citoplasmáticas con un diámetro similar al del virus (Granzow y col., 1997). No se ha observado ningún mecanismo de exocitosis u otra vía de expulsión; a medida que la infección avanza las células terminan por lisarse, saliendo los viriones al medio.

Se conoce una amplia variedad de líneas celulares, tanto de peces salmónidos como no salmónidos, en las cuales los virus IPNV tienen la capacidad de replicar y provocar un efecto citopático característico (Tabla I.4).

Tabla I.4.- Líneas celulares susceptibles a IPNV

<i>Línea</i>	<i>Origen</i>	<i>Referencia</i>	<i>Morfología</i>	<i>T^a</i>
CHSE-214	Embrión de salmón Chinook	Nims y col., 1970	epitelial	4-27/21
RTG-2	Gónada de trucha arcoiris	Wolf y Quimby, 1962a	fibroblástica	4-26/20
BF-2	Pedúnculo de "bluegill"	Wolf y Quimby, 1966	fibroblástica	15-33/21-25
EPC	Epitelioma papuloso de carpa	Tomasec y Fijan, 1971	epitelial	4-35/25-30
BB	Tronco caudal de pez gato	Wolf y Quimby, 1969	fibroblástica	4-39/25-30
FHM	Tronco caudal de "Fathead Minnow"	Gravell y Malsberger, 1965	epitelial	4-36/30-34

*Temperatura de cultivo: rango de crecimiento / temperatura óptima

En un principio la línea celular más utilizada para la multiplicación del virus fue la RTG-2 (gónada de trucha arcoiris), por su alta sensibilidad al virus y por ser en la que IPNV desarrollaba ECP con rapidez. Tiene en su contra la producción de altos niveles de interferón, lo que le impide el desarrollo de los altos títulos infectivos (10^6 - 10^7 pfu/ml) (MacDonald y Kennedy, 1979) característicos de estos virus en otras líneas celulares.

Actualmente la línea celular más utilizada es la CHSE-214, que presenta una sensibilidad semejante a la línea RTG-2 en cuanto a tiempo necesario para el desarrollo de ECP. Tiene la ventaja de que la producción de interferón es muy baja o nula, consiguiéndose títulos del orden de 10^8 pfu/ml (MacDonald y Kenedy, 1979);

además son muy adaptables y fáciles de manipular en el laboratorio, lo que las hace muy adecuadas para la replicación de este tipo de virus (Kelly y col., 1978).

Una tercera línea celular que en los últimos años se ha comenzado a emplear para la replicación de este virus es la BF-2; aunque algunos autores, e incluso la Unión Europea, la proponen como sustituto de la línea CHSE-214, otros han demostrado que determinadas cepas de IPNV no replican en estas células (Rivas, 1991). Otras líneas celulares de interés son la FHM (tronco caudal de “fathead minnow”), EPC (epitelioma papuloso de carpa) y BB (tronco caudal de pez gato) (Bovo y col., 1985; Nicholson y Byrne, 1973), aunque éstas son poco utilizadas por ser poco susceptibles para la multiplicación del virus.

Según algunos autores, la variabilidad en la capacidad de replicación de estos virus en líneas celulares depende, en cierta forma, de factores relacionados tanto con las células como con el virus; así, está demostrado que la capacidad de estos virus para replicar en las células depende de la especificidad de adsorción viral sobre los receptores celulares (Darragh y MacDonald, 1982). El espectro de hospedadores puede alterarse; así, cepas de IPNV adaptadas a la replicación en RTG-2 pueden originar mutantes víricos con capacidad de replicar en la línea celular FHM, que presentaba poca o nula susceptibilidad a IPNV, reteniendo aún la capacidad de replicación en RTG-2; esta mutación alteraría las características de la superficie vírica, lo que permitiría una mayor eficacia en la adsorción y penetración del virus en la célula (Scherrer y Cohen, 1975).

Transmisión y patologías.

El virus IPNV está ampliamente distribuido a nivel geográfico, habiéndose aislado prácticamente en todo el mundo. Provoca una enfermedad sistémica, contagiosa y aguda, que afecta a alevines y juveniles de peces salmónidos, en los que

provoca mortalidades superiores al 80%, siendo poco frecuente la sintomatología en peces adultos. Estudios recientes han revelado que el virus afecta a un amplio rango de peces no salmónidos, encontrándose también en crustáceos y moluscos.

Los individuos supervivientes de una epizootia pueden convertirse en portadores crónicos y asintomáticos, diseminando el virus y provocando el contagio a peces sanos (Wolf y col., 1963; Yamamoto, 1975b; Munro y col., 2004). Este estado de portador puede durar años y parece que va decreciendo con el tiempo, pudiendo afectar al 90% de los supervivientes (Roselund, 1977; Reno y col., 1978; Yamamoto y Kilistoff, 1979); en el caso de reproductores portadores, los alevines obtenidos a partir de ellos pueden experimentar mortalidades de hasta el 100 %.

Existen dos formas de transmisión de esta enfermedad: la vía horizontal, que es la vía de contagio más frecuente, a través del medio acuático (por la orina y las heces), por contacto través de las agallas, o bien por ingestión (Halder y Ahne, 1988; Mortensen 1993), y la vía vertical, a través de fluido seminal y ovárico, así como de huevos embrionados procedentes de reproductores infectados (Ahne, 1983; Ahne y Negele, 1985; Dorson y Torchy., 1985; Bootland y col., 1991). Se ha comprobado que este virus se adsorbe a la superficie del huevo, y además está presente en el fluido ovárico (Wolf y col., 1963). Por otro lado, tanto animales homeotermos como poiquilotermos pueden actuar como vectores mecánicos de este virus (Eskildsen y Jørgensen, 1973), demostrándose que el virus se mantiene infectivo tras el pase por el intestino de algunas aves marinas; asimismo, se ha demostrado la persistencia del virus en moluscos bivalvos y crustáceos durante largos periodos de tiempo, los cuales podrían actuar como reservorios (Rivas y col., 1993).

Los síntomas característicos de esta enfermedad son: oscurecimiento de la pigmentación, distensión abdominal, exoftalmia, hemorragias intestinales, defecaciones mucosas que hacen que los individuos afectados arrastren hilos fecales; los peces afectados muestran natación errática, con violentos movimientos rotatorios.

Internamente, aunque la denominación de la enfermedad hace referencia a la histopatología, con necrosis en las células acinares del páncreas, las alteraciones necróticas se suelen presentar más frecuentemente en otros órganos. Así, algunos autores observan la presencia de necrosis focales en el tejido hematopoyético renal y en la mucosa intestinal, apareciendo palidez en hígado y bazo; estómago e intestino no presentan alimentos y están llenos de fluido mucoso. Aparecen cambios patológicos a nivel de los tejidos pancreático, hepático, renal y mucosa intestinal. Las células pancreáticas acinares, y a veces también los islotes, presentan necrosis. El píloro y ciego pilórico presentan necrosis extensas, formándose un exudado mucoso blanquecino debido al desprendimiento del epitelio intestinal (Yasutake, 1970; Kudo y col., 1973; McKnight y Roberts, 1976). Se pueden detectar partículas virales en los tejidos pancreático, hepático, renal y esplénico (Kudo y col., 1973; Yamamoto, 1975a; Mulcahy y Fryer, 1976).

Los signos clínicos externos difieren de unas especies a otras. Así en el rodaballo aparecen hemorragias musculares a lo largo de la espina dorsal y la cabeza, acompañado de aletargamiento (Castric y col., 1987), mientras que en lenguado se ha descrito oscurecimiento de la piel acompañada de hiperactividad (Rodríguez y col., 1997). Se han descrito también afecciones en moluscos: En *Tellina* el virus causa un edema generalizado con infiltraciones hemocitarias y necrosis del tejido conjuntivo (Hill y Aderman, 1979); en almeja, *Meretrix lusoria*, el signo más evidente es la necrosis branquial (Chou y col., 1994); en vieira, *Pecten maximus*, aparecen vacuolizaciones y necrosis en el hepatopáncreas (Mortensen, 1993)

Estado actual del diagnóstico y prevención del virus IPN.

En la actualidad, el diagnóstico de IPNV implica el aislamiento del virus en cultivos celulares, seguido de la aplicación de la técnica de seroneutralización con antisueros específicos y otras técnicas serológicas; la utilización de estas

técnicas requiere de un tiempo bastante largo para obtener un resultado. Se han aplicado técnicas serológicas más rápidas, como el inmunodot, inmunofluorescencia o el ELISA (Nicholson y Henchal, 1978; Ahne, 1981; Dixon y Hill, 1983; Gahlawat y col., 2004), con el inconveniente de que generalmente es necesario propagar previamente el virus en cultivos celulares, lo que ralentiza el proceso. Además otro inconveniente de estas técnicas es que pueden presentar problemas de reacciones inespecíficas, sobre todo al aplicarlas sobre tejidos infectados.

En los últimos años se está utilizando una serie de técnicas moleculares, de mayor rapidez y fiabilidad que las técnicas de diagnóstico tradicional (Dopazo y Barja, 2002). Se trata de la utilización de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (Rimstad y col., 1990; Dopazo y col., 1994) y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Lopez-Lastra y col., 1994; Blake y col., 1995; Wang y col., 1997), con las cuales se están obteniendo resultados muy satisfactorios.

En la actualidad todavía no se ha obtenido una vacuna efectiva contra el virus, debido a sus heterogéneas características serológicas. Varios laboratorios desarrollan en este momento programas con el objeto de obtener una vacuna eficaz, que debería inducir protección en épocas tempranas del desarrollo del animal, prevenir la diseminación del virus y dar protección contra el máximo de serotipos posible. Se han empleado sistemas tradicionales usando virus inactivados con formol o virus atenuados con relativa eficacia por vía intraperitoneal (Dorson, 1977, 1983 y 1988; Hill y col., 1980, Leong y Fryer., 1993), aunque debido a que la enfermedad afecta principalmente a alevines, este tipo de vacunación no es practicable. Ensayos de vacunación por inmersión con virus inactivado y atenuados no han dado como resultado ninguna vacuna eficaz que proporcione niveles altos y uniformes de protección contra el virus (Bootland y col., 1986; Christie, 1997).

En la actualidad la gran esperanza está en las vacunas obtenidas con técnicas recombinantes, mediante la expresión de una o más proteínas virales en sistemas bacterianos (Lawrence y col., 1989; Hah y col., 1992). Esta metodología, además de estar proporcionando resultados prometedores, elimina los riesgos de reversión a la cepa patógena y de presencia de agentes contaminantes que presentan los sistemas tradicionales. Así se ha conseguido demostrar que recombinantes de la proteína VP2 podrían estimular la respuesta inmune y proteger al huésped contra dosis letales del virus (Manning y Leong, 1990).

Aunque los resultados obtenidos en los experimentos de vacunación están siendo prometedores, lo cierto es que no se ha demostrado su eficacia para todos los serotipos de IPNV y, hoy por hoy, todavía el protocolo a seguir en el momento de presentarse una epizootia con mortalidades masivas sigue siendo la eliminación de los lotes afectados. Todos los equipos deben someterse a programas de limpieza y descontaminación. El empleo de desinfectantes químicos (formalina, cloro) parece dar buenos resultados; el tratamiento con radiación ultravioleta es ineficaz, ya que no asegura por si solo la inactivación de la totalidad del virus (Maise y col., 1980). El tratamiento del agua con ozono se ha revelado como el único capaz de inactivar la totalidad del virus en pocos minutos (Grotmol y Totland, 2000).

Identificación de IPNV.

Dado la inexistencia de tratamientos efectivos contra este tipo de agentes en la actualidad, y la poca eficacia de las medidas preventivas, el control de los birnavirus acuáticos recae fundamentalmente en el diagnóstico. En este sentido el primer paso en el diagnóstico de una enfermedad es el análisis de la sintomatología que aparece en los individuos afectados. En cualquier caso esta observación no puede representar más que un mero apoyo al diagnóstico, ya que solamente en algunos casos muy

puntuales se puede llegar a la identificación del agente infeccioso y a que de esta forma no es posible la detección de casos asintomáticos. El diagnóstico propiamente dicho, requiere de la identificación del virus o bien de la detección de componentes específicos del propio virus o de la respuesta específica del sistema inmune.

Existen diversas metodologías de diagnóstico que se emplean para la detección de birnavirus; la utilidad de una u otra técnica dependerá de la fase en que se encuentre la infección viral, así como del objetivo del procedimiento de control. Así, por ejemplo, durante la fase aguda de la enfermedad se hace necesario un método de diagnóstico rápido, aún a costa de perder sensibilidad, mientras que en el caso de certificaciones sanitarias, por ejemplo para importaciones o exportaciones e incluso para la detección de animales asintomáticos, se hacen necesarios método de diagnóstico de alta sensibilidad, aún a costa de que se ralentice el proceso, que nos permitan detectar el agente viral en muy bajas concentraciones. No obstante, lo ideal sería disponer de métodos de diagnóstico rápidos, sensibles, fiables y económicamente asequibles para la detección del virus.

A continuación abordaremos algunas de las metodologías más empleadas, que estructuraremos en: técnicas tradicionales, técnicas serológicas y técnicas moleculares.

Técnicas tradicionales de diagnóstico.

Microscopía electrónica.

Se trata de una herramienta de gran utilidad e importancia, que muchos laboratorios utilizan como primer paso en el diagnóstico, aunque su utilización en la actualidad ha quedado restringida debido a que no se acepta más que como un diagnóstico presuntivo. Algunos autores reivindican la mayor

eficacia de esta técnica frente a la del aislamiento en cultivos celulares, debido a que, aún en la actualidad, existen virus que no han podido ser aislados en líneas celulares. También se puede emplear como una técnica de apoyo al diagnóstico, puesto que nos permite determinar la ultraestructura de un virus aislado mediante cultivo celular.

Además permite conocer cuál es el lugar de maduración y el mecanismo de liberación en el ciclo de replicación viral, lo que nos puede dar una idea de qué tipo de virus es. Tiene, sin embargo, varias limitaciones: su baja sensibilidad, siendo necesario un total de 10^6 - 10^7 viriones por mililitro para la visualización de las partículas virales (Kudo y col., 1973), y por otro lado el necesitar de un aparataje de elevado coste, el cual no está al alcance de la mayoría de los laboratorios.

Aislamiento en cultivo celular.

Se trata de la técnica de diagnóstico más ampliamente utilizada por tratarse de una técnica sencilla y de bajo coste, y por ser de una adecuada sensibilidad, además de no requerir un aparataje especial. En el diagnóstico de virus de peces se ha descrito una gran variedad de líneas celulares obtenidas a partir de peces (Wolf y Mann, 1980). Aunque por norma general se recomienda usar una línea celular derivada de la especie huésped del virus, o de otra genéticamente próxima (Hetrick, 1989), ello no siempre es aplicable, de forma que el empleo de líneas celulares no procedentes de la especie infectada puede conducir a que algunas infecciones virales no sean detectables.

Cada grupo viral provoca un ECP característico y por ello su estudio nos puede dar una idea del tipo de virus de que se trata; sin embargo, distintos tipos virales pueden presentar un mismo ECP, por lo que la caracterización del

ECP no puede considerarse como una técnica de diagnóstico concluyente, sino como una técnica de apoyo, de forma que una vez aislado el virus es necesaria la utilización de otras técnicas de identificación. El mayor inconveniente de esta técnica es el tiempo, relativamente largo, necesario para completar un diagnóstico.

En el diagnóstico de birnavirus de origen acuático se utilizan normalmente las líneas celulares BF-2, RTG-2 y CHSE-214, cubriendo entre todas ellas un amplio rango de susceptibilidad viral, suficiente para aislar cualquier cepa de este virus (Kelly y col., 1978; Dopazo, 1991; Lorenzen y col., 1999).

Técnicas Serológicas.

Como ya comentamos anteriormente, el virus IPNV es serológicamente muy heterogéneo, presentando al menos 10 serotipos los cuales presentan en alguna medida reacciones cruzadas. De ahí que para el diagnóstico de IPNV por medio de estas técnicas requiera del uso de antisueros polivalentes (Finlay y Hill, 1975).

Seroneutralización.

Esta técnica se emplea fundamentalmente para la identificación y tipado de virus previamente aislados en cultivos celulares. Se basa en que las proteínas (antirreceptores) que el virus utiliza para adsorberse a la superficie de las células susceptibles son también proteínas antigénicas; de este modo, en presencia de un antisuero específico, los anticuerpos se unen a estos antirreceptores impidiendo la unión virus-célula, con lo cual el virus no se adsorbe a la célula y no desarrolla ECP (Ahne, 1981). Para la identificación se emplea una batería de antisueros específicos, aquel antisuero que inactive la

entrada del virus en la célula, es decir, que lo neutralice y por lo tanto no desarrolle efecto citopático, nos indicará de qué virus se trata.

Esta prueba es, según diversos autores, la que proporciona la identificación más específica de virus IPNV (Dorson y col., 1978; MacDonald y Grower, 1981, Kusuda y col., 1993; Nakajima y Sorimachi, 1994). No obstante, uno de los problemas que presenta esta técnica es la presencia de partículas no infectivas que pueden interferir en los resultados (Mcmichael y col, 1975), al igual que el protocolo de obtención de los antisueros, que puede afectar tanto a la sensibilidad como a la especificidad de la técnica (Hill y col., 1981; Hill y Way, 1995). Por otro lado, puesto que ésta es una técnica complementaria al aislamiento en células, su sensibilidad y tiempo de diagnóstico van a depender de éstas.

Inmunoensayo enzimático (ELISA).

El ELISA es una técnica rápida, específica y sensible, que permite el diagnóstico rápido y fidedigno de un gran número de muestras simultáneas, e incluso con posibilidades de automatización (Dixon y Hill, 1983). La muestra viral absorbida en pocillos de una placa de microtitulación se hace reaccionar con antisueros contra distintos virus conocidos; si alguno de estos antisueros es homólogo al virus problema, los anticuerpos se unirán a los antígenos virales. Estos anticuerpos deben estar unidos a un enzima (complejo que recibe el nombre de conjugado), que en presencia del sustrato específico produce una reacción fácilmente identificable.

Esta modalidad de la técnica, que recibe el nombre de ELISA directo, presenta el inconveniente de que aunque existen conjugados comerciales para la mayoría de los virus de homeotermos, no ocurre lo mismo con los de peces,

por lo que han de obtenerse en el laboratorio, lo cual es una tarea bastante laboriosa. Por ello existe una variante, el ELISA indirecto, en la que el antisuero específico no está marcado; el complejo antígeno-anticuerpo se hace reaccionar con una anti-inmunoglobulina que es la que está ligada al enzima.

Esta técnica se utiliza tanto para el diagnóstico como para la identificación del virus IPNV. Se trata de una técnica rápida, específica y sensible, siendo capaz de detectar el virus por encima de $10^{3.5}$ TCID₅₀/ml, (Nicholson y Caswell, 1982; Dixon y Hill, 1983; Gahlawat y col., 2004).

Inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa.

La técnica de inmunofluorescencia se puede utilizar tanto sobre cultivos celulares como sobre tejidos, con la única condición de que éstos tienen que ser frescos o congelados recientemente. Se trata de una técnica muy semejante al ELISA, con la que comparte un mismo fundamento, aunque en este caso se emplea un antisuero específico marcado con un compuesto (iso-tiocianato de fluoresceína) que bajo luz ultravioleta emite fluorescencia. Se puede realizar de dos formas: sobre el suero del pez, detectando anticuerpos (Piper y col., 1973; Jørgensen, 1974; Ahne, 1981), o bien sobre cultivos celulares infectados previamente con el virus.

La técnica de inmunoperoxidasa es semejante, aunque presenta la ventaja de que se puede utilizar un microscopio óptico normal, puesto que utiliza como marcador un enzima, y la reacción específica tiñe las células de negro; además las muestras, una vez teñidas, se pueden conservar durante largo tiempo.

Ambas técnicas tienen el inconveniente de que pueden producir reacciones cruzadas, además de la interferencia con la autofluorescencia o con la peroxidasa endógena de los tejidos de los peces, en diagnóstico *in situ*.

Inmunodot.

Se trata de una técnica muy sensible, con el mismo fundamento que los anteriores. A diferencia del ELISA, el soporte sólido al que se adsorben las muestras virales es una membrana de nitrocelulosa y no se necesita un aparataje específico para detectar el cambio de color; además tiene la ventaja de que se pueden conservar para una posterior medición. En el caso de IPNV puede detectar 20 ng/ml o 10^5 TCID₅₀/ml de virus (Hsu y col., 1989, Schultz y col., 1989).

Técnicas moleculares.

Aunque los ensayos serológicos son rápidos y sensibles, no lo son suficientemente para detectar portadores asintomáticos del virus, o para detectar la presencia del virus en huéspedes que no estén en fase aguda de la enfermedad. Es por ello que desde hace unos años se vienen ensayando y aplicando una serie de técnicas de biología molecular para la identificación y caracterización de IPNV (Dopazo y Barja, 2002).

Normalmente se asocia el término “técnicas moleculares” con aquellas que están basadas en la utilización de ácidos nucleicos, como pueden ser la hibridación de ácidos nucleicos o la reacción en cadena de la polimerasa, aunque deberían abarcar a todas aquellas técnicas cuyo objetivo fuese la detección o caracterización tanto del genoma como de las proteínas virales.

Análisis Electroforético.

La separación electroforética tanto de genoma como proteínas virales supone una importante herramienta para el diagnóstico y caracterización de determinados virus, aunque requiere el previo aislamiento viral en cultivos celulares. Así, el análisis de los electroferotipos (EFTs) genómicos ha sido ampliamente utilizado para comparación, tanto de diferentes cepas de un mismo virus, como para identificación y tipado de nuevos aislados virales de IPNV. Mediante electroforesis se puede llegar a diferenciar pequeñas variaciones de masa molecular entre los segmentos de diferentes cepas, llegando algunos autores a proponer el uso de estos patrones electroforéticos para la identificación de los principales serotipos de IPNV (Hedrick y col., 1985; Kusuda y col., 1993; Ganga y col., 1994). Sin embargo otros autores concluyen que esta técnica no se puede utilizar para serotipar las cepas de IPNV, ya que varios serotipos presentan el mismo electroferotipo (Cutrín, 1998; Cutrín y col., 2000); es más, estos mismos autores, en trabajos posteriores, demuestran que el análisis de los EFTs genómicos pueden dar resultados de tipado erróneos (Cutrín y col., 2004).

Hibridación de ácidos nucleicos.

Se trata de una técnica de gran sensibilidad, que permite la detección de entre 10^2 y 10^3 virus por gramo de muestra (Rimstad y col., 1990; Winton, 1991; Lupiani y col., 1993; Dopazo y col., 1994).

Una sonda de diagnóstico es un fragmento de cDNA, correspondiente a una región específica del genoma de un virus, que solamente rehibridará con el genoma del virus a partir del cual se ha obtenido. Para su obtención se utilizó originariamente la técnica de clonación, aunque en la actualidad ha sido

sustituída frecuentemente por la PCR. Aunque algunos autores, como Rimstad y col. (1990), han publicado la utilización de sondas de tan solo 20-30 pb y otros, en cambio, optan por sondas de gran tamaño, el tamaño normal para las sondas de ácidos nucleicos se encuentra entre los 200 y 800 pb.

Aunque tradicionalmente se ha empleado el marcaje isotópico, de alta sensibilidad, en la actualidad se están ensayando otros tipos de marcaje no isotópico que, presentando todavía alta sensibilidad, no entrañarían los peligros de un marcaje radiactivo. La utilización de sustratos quimioluminiscentes para la fosfatasa alcalina, ha permitido aumentar la señal emitida por estos tipos de marcaje, aumentando enormemente su poder de resolución.

Para esta técnica las muestras deben ser sometidas a un tratamiento de extracción del ácido nucleico viral, el cual se desnaturaliza y se fija a una membrana de nylon; sobre esta membrana se aplica la sonda marcada específica para un virus conocido. Si el virus es homólogo se producirá hibridación, lo cual se revelará mediante película de rayos X, en el caso de marcaje radiactivo, o bien a través de un proceso enzimático en el caso de marcaje no radiactivo.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es una técnica de alta sensibilidad y especificidad. Aunque ampliamente utilizada en clínica, hasta el momento su uso no estaba muy extendido en acuicultura debido al alto coste que originalmente representaba, y a las dudas que se plantean sobre su eficacia y seguridad, para los no expertos en esta tecnología.

La reacción en cadena de la polimerasa se basa en la amplificación de un fragmento de ácido nucleico comprendido entre dos regiones de secuencia conocida de un DNA patrón. En este proceso, dos oligonucleótidos son utilizados como cebadores para llevar a cabo una serie de reacciones en cadena catalizadas por una DNA polimerasa. En la actualidad se conocen secuencias del genoma de algunos virus de animales acuáticos, a partir de las cuales es factible la selección y síntesis de pares de cebadores específicos para cada genoma viral. Estos oligonucleótidos son complementarios a cada una de las hebras de la doble cadena de DNA y entre ambos comprenden el fragmento de DNA que se pretende amplificar.

Para el diagnóstico del virus IPNV, se extrae el ácido nucleico, el cual se somete a una reacción de transcripción inversa y posteriormente a PCR utilizando parejas de cebadores específicas. Dado que los cebadores son específicos para este virus, no se obtendrá producto de amplificación si en la muestra a analizar hay un virus distinto o no hay ningún virus (López-Lastra y col., 1994; Blake y col., 1995).

El poder de amplificación de esta técnica es enorme, permitiendo obtener millones de copias a partir de una única inicial. Esta propiedad es causa de su alta sensibilidad, pero en ella también radica su mayor problema, debido a la posibilidad de contaminaciones durante el proceso, lo cual puede alterar la interpretación del resultado de la amplificación.

En los últimos años, ha aparecido una nueva evolución del PCR que permite al mismo tiempo ver la cinética de amplificación del cDNA amplificado y confirmar su especificidad; se trata de la PCR en Tiempo Real. Este método está basado en la detección y cuantificación de un marcador fluorescente, de forma que la señal se incrementa de forma proporcional al producto de amplificación, permitiendo una detección específica (sobre todo

con la utilización de oligosondas), sensible y rápida. Existen varios tipos, cada uno con sus ventajas y desventajas, que van desde la utilización de sondas marcadas con un compuesto fluorescente (sondas TaqMan® y “Molecular Beacons”) cuya secuencia, de unos 20-30 pb, es complementaria a un pequeño fragmento en el interior del amplicón, o bien la utilización de agentes intercalables fluorescentes (SYBR®, bromuro de etidio, etc.) (Lewin y col., 1999; Overturt y col., 2001; Munir y Kibenge, 2004).

OBJETIVOS:

En el sector de la acuicultura, los problemas derivados de patologías virales son de gran preocupación, por lo que se hacen necesarias estrategias de control epidemiológico basadas fundamentalmente en el diagnóstico eficiente y rápido. Por ello, nuestro laboratorio -como muchos otros- lleva tiempo empleando técnicas moleculares de detección e identificación de diversos virus de interés, entre ellos el que es objeto de este trabajo: el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). No obstante, se hacía necesario llevar a cabo un estudio completo de estandarización y validación de estas técnicas con el objeto de facilitar su oficialización a medio plazo en organismos como la OIE (Organización Internacional de Epizootias).

Por ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido la **optimización y validación de dos técnicas moleculares para la detección del virus IPNV: la RT-PCR y la Hibridación de Ácidos Nucleicos**. La primera orientada a su uso en laboratorios especializados y la segunda destinada a su utilización a pie de planta por técnicos de las propias empresas.

CAPITULO II:

**Valoración de Métodos de Extracción
de RNA**

INTRODUCCION.

En todas las técnicas de diagnóstico y caracterización que utilizan el genoma viral como diana, el primer paso, la extracción de ácido nucleico (A.N.), es crítico (Dopazo y Barja, 2002). De hecho, el mayor obstáculo para la eficiente aplicación de técnicas moleculares es la obtención del ácido nucleico en las mejores condiciones posibles, tanto en concentración como en pureza.

Hay una diversidad de métodos utilizados en la preparación de las muestras para la extracción de A.N., cuya selección depende en gran medida de la naturaleza del tejido sobre el que se va a actuar. Así las diferentes técnicas de extracción pueden ir de un simple hervido a métodos más elaborados que implican la utilización de soluciones de lisis en tampones salinos, en presencia de detergentes, o de enzimas, seguidos de una extracción en solventes orgánicos y precipitación con alcohol, o bien la utilización de complejos sistemas comerciales, basados en la captación específica/elución del A.N (Chomczynski y Sacchi, 1987; Wilde y col; 1990; De Leon y col., 1992; Jiang y col., 1992; Fanson y col., 2000).

Cualquiera que sea el método empleado, cada uno de los pasos del protocolo lleva implícito una pérdida porcentual, que implica una disminución en la concentración del A.N. finalmente extraído, lo cual se conoce como “capacidad de recuperación”, expresado en porcentaje. Las cantidades de A.N. viral disponibles en una muestra viral son siempre inferiores a los valores obtenidos con otros tipos de microorganismos; estos valores son incluso inferiores cuando la muestra es un tejido infectado –si se compara con los niveles de carga viral encontrados en cultivos celulares infectados- y caen hasta valores extremadamente bajos en infecciones asintomáticas y crónicas. Por ello, en el diagnóstico de virus es crucial disponer de un método de extracción de A.N. que minimice las pérdidas, optimizando en la medida de lo posible los rendimientos de recuperación.

El otro dato que define la eficiencia de un método de extracción es el índice de pureza del A.N. extraído, o lo que es lo mismo, el porcentaje de A.N. respecto a la presencia de componentes contaminantes. Cualquier tipo de contaminante presente en una solución de A.N. puede interferir -e incluso inhibir- las reacciones (enzimáticas o no) de cualquier método molecular de diagnóstico. Este riesgo se agudiza cuando se trata de extraer el RNA viral a partir de tejidos infectados, máxime si este RNA se pretende emplear como patrón para una transcripción inversa seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), ya que las reversotranscriptasas son muy susceptibles a la influencia de sustancias inhibitoras (Wilde y col., 1990). Hay una serie de sustancias contaminantes e inhibitoras que pueden acompañar al A.N. en soluciones extraídas. Así se ha demostrado que la presencia de componentes orgánicos (Kreader, 1996), polisacáridos (Shieh y col., 1995), glicoproteínas (Schwab y col., 1993, 1995), y componentes inorgánicos como metales y sales (Arnal y col., 1999; Shieh y col., 1995) interfieren en el desarrollo de reacciones enzimáticas como pueden ser las implicadas en la PCR. Asimismo, se ha descrito el efecto inhibitor desarrollado en muestras ricas tanto en proteínas como en ácido nucleico (Gouvea y col., 1990; Wiedbrauk y col., 1995), con presencia de sales, de restos de fenoles, o detergentes como el SDS, pudiendo todos estos componentes interferir en las reacciones de amplificación.

Existen diversos métodos para la eliminación de estas sustancias inhibitoras; así, la utilización de columnas de Sephadex permite la eliminación eficiente de sales y proteínas de bajo peso molecular (Wilde y col., 1990; Hale y col., 1996); por otro lado, la utilización de componentes como el CTAB (bromuro de cethyltrimethylamonio) hace posible la eliminación de contaminantes de tipo polisacáridos (Jiang y col., 1992; Straub y col., 1994). En general, la eliminación de inhibidores de diverso tipo implica la combinación de varios procesos; esto puede llevar a la pérdida de concentración de ácido nucleico, por lo que, a menos que las muestras estén muy contaminadas, su uso no suele ser aconsejable e incluso es inaceptable. Por ello es preferible el diseño y

optimización de métodos de extracción que aseguren buenos índices de pureza y altas capacidades de recuperación.

El **objetivo** del presente capítulo ha sido llevar a cabo una evaluación de la eficacia – en términos de recuperación y pureza- de una serie de métodos tradicionales y sistemas comerciales de extracción de A.N., con el fin de establecer el/los métodos óptimos para su aplicación en el desarrollo posterior del trabajo experimental de esta tesis doctoral.

MATERIAL Y METODOS:

Líneas celulares y condiciones de cultivo.

En este estudio se utilizó, para la replicación viral, una única línea celular de cultivo continuo, la CHSE-214, de morfología epitelial y derivada de embrión de salmón chinook (Nims y col., 1970), debido a su alta sensibilidad para IPNV y a que posibilita la obtención de títulos virales elevados (Dopazo, 1991; Dobos, 1995).

Los tapices celulares se cultivaron en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) suplementado con un 10% de suero bobino fetal (FBS), penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), a una temperatura de 15°C. Para el mantenimiento de las monocapas confluentes, el medio de cultivo se sustituyó por EMEM con FBS al 2 %, manteniendo la misma temperatura de incubación.

Para el subcultivo de las monocapas celulares se utilizó tripsina al 1% en tampón diluyente (NaCl 0,14 M; KH₂PO₄ 1,47 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; Na EDTA 0,54 mM; rojo fenol 0,1%; pH 7,0) siguiendo el procedimiento estándar descrito por Kuchler (1977).

Con el fin de evitar interferencias debidas a contaminaciones por microorganismos tanto bacterianos como fúngicos, se realizaron controles rutinarios de los cultivos de células y de los medios de cultivo. Para ello todas las soluciones empleadas para el cultivo celular se ensayaron mediante inoculación en tubos de tioglicolato (Oxoid) e incubación a 25 y 37°C durante 48 horas.

Virus y propagación viral.

Para este ensayo se utilizó una única cepa viral de IPNV, el aislado 533, obtenido en nuestro laboratorio a partir de una explotación de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Para ello a los tapices confluentes de CHSE-214, de tres frascos de cultivo de 75 cm² se les retiró el medio de crecimiento y se le añadieron 200 µl de suspensión viral; tras una hora de incubación a temperatura ambiente y en agitación, se vació el resto de inóculo y fue sustituido por MEM suplementado con un 2% de FBS. La incubación se realizó a 15 °C hasta la aparición de ECP generalizado. El virus crudo resultante de los 3 frascos se recogió, se mezcló y se conservó a -80°C hasta su utilización.

Titulación Viral.

La titulación de los virus se llevó a cabo por el método de Reed y Muench (1938). Brevemente: Diluciones seriadas del virus problema, preparadas en tampón Earle's o en EMEM suplementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µgr/ml), se inocularon (por triplicado), en placas de microtitulación de 96 pocillos con monocapas confluentes de células susceptibles (CHSE-214 o RTG-2). La lectura se llevó a cabo a los 7 y 12 días de incubación a 15°C, y los títulos se expresaron como la mayor dilución del virus que produce ECP en la mitad de los pocillos y se expresaron como TCID₅₀/ml.

Extracción del genoma viral

Para evaluar los métodos de extracción del RNA viral, se empleó la suspensión de virus crudo (con un título aproximado de 10^6 TCID₅₀/ml obtenida según se ha descrito anteriormente, aplicando un mínimo de 3 réplicas por ensayo, y repitiendo el ensayo del modo siguiente: dos veces por el mismo técnico en distintos días de ejecución (A y C en la tabla II.1) y otras dos por distintos técnicos en el mismo momento de ejecución (B y C). Para ello se emplearon distintas alícuotas de 300, 225 y 71 μ l que, extrapolando por la relación número de células/volumen de origen, se corresponderían con pocillos de placas de cultivo de 24 (2 cm²), 48 (1 cm²) y 96 (0,32 cm²) pocillos. Para la extracción del RNA viral se ensayaron los siguientes métodos: Proteínasa K/Fenol-Cloroformo/Etanol, Trizol LS Reagent (Invitrogen), RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen), Nucleospin RNA II (Machery-Nagel) y Perfect RNA[™] Eukaryotic Mini (Eppendorf).

Proteínasa K/Fenol-Cloroformo.

En este caso, para la extracción del RNA viral, el virus crudo se trató con 2 μ g/ μ l de proteínasa K (Sigma) y SDS al 0,05 %, durante 1,5 a 4 horas a 37°C. A continuación se procedió a una extracción fenol-cloroformo, para lo cual se añadió 1 volumen de cloroformo y 1 volumen de fenol y se mezcló vigorosamente; se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C y la fase acuosa se transfirió a un nuevo vial, añadiéndole a continuación dos volúmenes de cloroformo; tras agitar y centrifugar de nuevo durante 5 minutos a 12.000 x g, se transfirió la fase acuosa a un nuevo vial. Seguidamente, el A.N. se precipitó con etanol, para lo cual, a la fase acuosa se le añadió acetato sódico a una concentración final de 0,3 mM y 3 volúmenes de etanol absoluto; tras 15 minutos a -80°C se centrifugó 30

minutos a 12.000 x g a 4°C y el precipitado se lavó con etanol 70% para eliminar el exceso de sales; el precipitado final se secó 5 minutos en un concentrador a vacío Speed-Vac (SpeedVac AS160, Savant) y se resuspendió en 50 µl de agua libre de enzimas (NF-H₂O, Promega).

Trizol LS Reagent (Invitrogen)

La alícuota correspondiente de virus crudo se transfirió a un vial eppendorf y se mezcló con 750 µl de Trizol; se incubó de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 200 µl de cloroformo. La mezcla se agitó vigorosamente, se centrifugó a 13.400 x g durante 20 minutos y la fase acuosa se transfirió a un nuevo vial.

A esta fase acuosa se le añadieron 500 µl de isopropanol. Tras incubar de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 13.400 x g durante 15 minutos; tras eliminar el sobrenadante, al precipitado se le añadieron 1000 µl de etanol al 75% y se centrifugó 10 minutos a 13.400 x g. Finalmente se vació el etanol, se secó el precipitado en un concentrador a vacío y el RNA se resuspendió en un volumen de 30 a 50 µl de NF-H₂O. El RNA extraído se conservó a -20°C hasta su utilización.

RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen)

El volumen correspondiente de virus crudo se transfirió a un vial eppendorf, se le añadieron 350 µl de tampón de lisis RLT, suplementado con β-mercaptoetanol (a una concentración final de 0,14 M), y se homogenizó pipeteando. A continuación se añadieron 350 µl de etanol al 70%; la mezcla se transfirió a la columna RNeasy Spin (suministrada por el fabricante) y se centrifugó a 9300 x g durante 15 segundos. Tras descartar el filtrado, se lavó

el A.N de la columna añadiendo 700 µl de tampón RW1 y repitiendo la centrifugación. Se cambió el tubo colector, se añadieron 500 µl de tampón RPE (suplementado con 4 volúmenes de etanol absoluto) y se repitió de nuevo la centrifugación. Se descartó el filtrado, nuevamente se añadieron 500 µl de tampón RPE y se centrifugó 2 minutos a 13.400 x g. Se cambió el tubo colector, se añadieron entre 30 y 50 µl de NF-H₂O, se incubó 30 segundos a temperatura ambiente y se centrifugó un minuto para eluir el RNA, que se conservó a -20°C hasta su uso.

Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel)

El volumen correspondiente de virus crudo se transfirió a un vial eppendorf, se añadieron 400 µl de solución de lisis RA1 suplementada con β-mercaptoetanol (a una concentración final de 0,14 M) y se agitó fuertemente en un vórtex; la suspensión celular lisada se transfirió a una unidad de filtración NucleoSpin y se centrifugó durante 1 minuto a 13.000 x g. Al lisado homogenizado se le añadieron 300 µl de etanol y se mezcló en vórtex. El homogenado se transfirió a una columna NucleoSpin, se centrifugó a 8.000 x g durante 30 segundos, se transfirió la columna a un nuevo tubo colector y se centrifugó de nuevo (para secar la columna) 1 min a 13.000 x g. Para eliminar los restos de DNA celular, 95 µl de la solución de DNasa I (suministrada por el fabricante) se aplicaron directamente en el centro de la columna. Tras incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 500 µl de solución RA2, se centrifugó 30 seg a 8.000 x g, se descartó el filtrado, se añadieron 600 µl de solución RA3 y se repitió la centrifugación. A continuación, se vació el líquido filtrado, se añadieron 250 µl de solución RA3 y se centrifugó a 13.000 x g durante 2 minutos, para secar la membrana completamente.

La columna se transfirió a un vial eppendorf, se añadieron 50 µl de NF-H₂O directamente sobre la membrana y se centrifugó 1 minuto a 13.000 x g para eluir el RNA. La suspensión de RNA extraído se conservó a -20°C.

Perfect RNA™ Eukaryotic Mini (Eppendorf)

El volumen correspondiente de virus crudo se transfirió a un vial eppendorf, se le añadieron 350 µl de solución de lisis suplementada con β-mercaptoetanol (a una concentración final de 0,14 M), e inmediatamente se mezcló agitando vigorosamente y por pipeteados sucesivos. La mezcla se centrifugó a 13.000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo vial. A continuación se añadieron 350 µl de etanol al 70% y 200 µl de solución “binding matrix”; se cargó la suspensión en columnas RNA Mini Spin y se centrifugó a 13.000 x g durante 30 segundos; se descartó el filtrado y se lavó la columna añadiendo 700 µl de “solución de lavado 1” y centrifugando 30 segundos a 13.000 x g; tras descartar el filtrado, se repitió el pulso de centrifugación para eliminar restos de la solución de lavado. Se llevó a cabo un segundo lavado con 500 µl de la “solución de lavado 2” (suplementada con etanol al 95%) y se centrifugó a 13.000 x g durante 15 segundos; a continuación se repitió este último lavado, centrifugando durante 30 segundos para eliminar posibles restos de solución.

El RNA se eluyó añadiendo a la columna 50 µl de NF-H₂O, incubando durante 5 minutos a 50°C y centrifugando durante 2 minutos a 13.000 x g. El RNA extraído se conservó a -20°C hasta su uso.

Evaluación de la capacidad de Extracción.

Para la valoración de la capacidad de extracción de A.N. se utilizaron tres

parámetros: Cálculo espectrofotométrico de la concentración, visualización en geles de poliacrilamida y detección del genoma viral por RT-PCR.

Cálculo espectrofotométrico de la concentración.

Para la medición de las concentraciones de RNA total obtenidas con los distintos métodos se utilizó un espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia-Biotech), empleando cubetas de cuarzo para 60 μl (cubetas QS 1000, Hellma®) o para 7 μl (Spectros II, Pharmacia-Biotech) de volumen de medición. La concentración fue calculada en base a la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (teniendo en cuenta que a una $\lambda=1$ le corresponde una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$). La relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm da una estimación de la pureza: El RNA puro debe presentar un ratio de 2; sin embargo, ratios entre 1,7 y 2 se consideran correspondientes a RNA altamente puro (Ausubel y col., 2003).

Electroforesis en Geles de poliacrilamida.

Los productos de extracción se sometieron a electroforesis en geles de 12,5% de poliacrilamida Gene Excel (Pharmacia-Biotech), empleando el sistema de electroforesis horizontal en acrilamida GenePhor (Pharmacia-Biotech). Para ello, una alícuota de 4 μl de RNA extraído se mezcló con 2 μl del tampón de muestra recomendado por el fabricante; se trató 5 minutos a 95-100°C, transfiriéndose a continuación a un baño de hielo y se cargó en el gel. La electroforesis se realizó a 500 voltios durante 0,5 h. Para la visualización de las bandas, el gel se sometió a tinción nitrato de plata, empleando el kit Silver Stain Plus (Biorad). Para usar este método como evaluación de la eficacia de la extracción de RNA, se comparó la intensidad

de las bandas de RNA obtenidas con los distintos métodos de extracción y volúmenes de partida.

RT-PCR

Los productos obtenidos en la extracción se sometieron a RT-PCR utilizando el kit *SuperScript™ II One-Step RT-PCR con Platinum® Taq* (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante, y empleando la pareja de cebadores IPNJAV₁₋₂, que amplifican un fragmento del genoma de IPNV de 607 pb comprendido entre las bases 1737 y 2344 en la región NS-VP3 del segmento A de la cepa Jasper (IPNJAV₁ 5'- GCA GTC ATC TTT CCT GTG TG-3'; IPNJAV₂ 5' TGG AGT TCT GGG TCC ATC CC- 3'). Para la amplificación se utilizó un termociclador Master Cycler, de Eppendorf.

Para la visualización de los productos de amplificación, 10 µl de los productos de RT-PCR se cargaron en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X (Tris 40 mM, de ácido acético 20 mM, EDTA-Na 2 mM) y se sometieron a electroforesis durante 1 a 1,5 horas a 100 V. La visualización de las bandas se realizó mediante tinción con bromuro de etidio; como estándar de pesos moleculares se utilizó DNA de fago Φx174 cortado con Hae III (Invitrogen).

RESULTADOS

Valoración de la concentración y pureza del AN mediante Espectrofotometría.

El primer paso para evaluar los distintos métodos de extracción fue la medición espectrofotométrica de las concentraciones del RNA extraído mediante cada método. El primer dato relevante que debemos citar es el de los altos

coeficientes de variación (CV) obtenidos por cualquier método (tabla II.1). A primera vista el Trizol LS Reagent se muestra como el mejor método de extracción, con concentraciones medias de RNA extraído que rondan los 126 ng/cm² de tapiz celular, en los tres volúmenes y repeticiones ensayadas (tabla II.1, A+B+C), sin embargo, los valores de desviación también fueron muy elevados, presentando un CV medio del 176%. Por superficies, fue la de 0,32 cm² en la que se obtuvieron los valores más altos en cantidad de RNA extraído, con 99 ng de media, aunque con elevados CV para cualquiera de las 3 superficies ensayadas (104, 85 y 71%, respectivamente). Con este método no se obtuvo una correlación definida entre la cantidad de RNA extraído y la superficie de partida. Es interesante hacer notar que los valores obtenidos en la estimación de la pureza (expresados como el ratio entre los valores de absorbancia a 260 y 280 nm) fueron altos, superiores siempre al 80%, y con un coeficiente de variación de alrededor de un 13 %.

Debemos resaltar que el otro método basado también en extracción con fenol-cloroformo presentó altos valores medios en cuanto a concentración de RNA extraído (26,8 ng/cm²), aunque las desviaciones fueron, al igual que en el anterior caso, elevadas en conjunto. Sin embargo, en una lectura más detenida se nos muestra como un método en que las cantidades de RNA extraído son proporcionales a las superficies de partida. Por otro lado, el origen de los altos valores de desviación están generados en su mayor parte por la repetición C, con unos valores de RNA extraído extremadamente bajos en relación a las repeticiones A y B, de forma que no teniendo en cuenta los resultados de C los valores de coeficiente de variación no superarían en ningún caso el 45%. En cuanto a los niveles estimados de pureza, fueron en todos los casos superiores al 70%, y con unos CV inferiores al 10%.

El resto de los métodos, todos ellos basados en filtración por membranas o

resinas de sílice, presentaron valores medios sensiblemente menores en cuanto a la concentración de RNA extraído, aunque con mejores valores de reproducibilidad (menores CV) que con Trizol.

El sistema que presentó mejores valores de concentración de RNA extraído fue el de Eppendorf, con valores medios de 22 ng/cm², y un CV de un 85%. No se mantuvo proporcionalidad entre la cantidad obtenida en la extracción y la superficie de partida, aunque las discrepancias no alcanzaron el nivel obtenido con el Trizol. Los CV obtenidos con este método fueron claramente inferiores que con los anteriores.

Le sigue en efectividad el sistema Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel), con el que los valores medios de extracción fueron un poco menores (entre 7 y 8 ng para las tres superficies) que en el caso anterior, pero con unos coeficientes de variación más elevados (entre 37 y 65%). Al igual que en los casos anteriores no se observó proporcionalidad entre la cantidad de RNA extraído y la superficie de partida en ninguna de las tandas.

Con RNeasy Mini Kit, de Qiagen, se obtuvieron resultados similares al sistema de Macherey-Nagel, con unos valores medios de 11 ng/cm² de RNA extraído (CV = 88%).

En cuanto al valor estimado de pureza de estos 3 sistemas basados en filtración por membrana, es necesario destacar que el que mejores valores presentó fue el RNeasy Mini Kit, con valores medios superiores al 82% en todas las superficies, mientras que los otros dos sistemas (Nucleospin RNA II y Perfect RNATM Eukaryotic Mini) mostraron valores que oscilaron entre el 63 y el 78 %, siendo Nucleospin el de mejores coeficientes de variación (inferiores al 10%), seguidos del sistema de Eppendorf, y finalmente de RNeasy con valores de variación inferiores del 15 %.

Tabla II.1.- Análisis de la eficacia de diverso métodos de extracción de RNA: Valoración de la concentración y pureza.

		^a Ensayo n°:				A				B				C				A+B+C			
		RNA (ng)		Pureza		RNA(ng)		Pureza		RNA(ng)		Pureza		RNA (ng)		Pureza					
Proteínasa K	b cm ²	0,32	21,9±0,37 (2)	66±0,94 (1)	14,5±8,26 (57)	66,5±4,8 (7)	2,4±1,14 (48)	ND	11,3±9,79 (87)	66,4±3,7 (6)											
		1	57,7±5,26 (9)	73±0,82 (1)	39,6±18,9 (48)	79,3±2,8 (3)	1,42±0,45 (32)	ND	28,2±27,3 (97)	76,6±3,8 (5)											
		2	80,01±2,97 (4)	74±0,94 (1)	40,5±12,3 (30)	82,5±7,6 (9)	1,64±1,14 (21)	ND	34,2±33,6 (98)	78,7±7,2 (9)											
		ARN/cm ²	55±12,1 (22)	71±3,4 (5)	35±21,7 (62)	76,1±8,8 (12)	3,2±3,7 (113)	ND	26,8±26 (95)	74±7,45(10)											
Trizol LS® Reagent	cm ²	0,32	83,8±23,94(29)	93±3,56 (4)	68,06±54,9 (81)	89,3±18,9 (21)	126,6±132 (105)	ND	99±102,9 (104)	91,2±13,7 (15)											
		1	112±8,96(8)	90±12,8 (14)	33,4±7,44 (22)	87,3±8,99 (10)	19,8±3,99 (20)	ND	48,6±41,5 (85)	88,7±11,1 (13)											
		2	50,3±27(54)	85±9,39 (11)	57,3±28,3 (49)	86,7±13,9 (16)	19,7±7,91 (40)	ND	38,3±28,5 (71)	86±11,8 (14)											
		ARN/cm ²	133±107 (81)	89,4±9,9 (11)	92±131 (143)	87,8±14,5 (16)	142±299 (211)	ND	126±221 (176)	88,6±12,5(14)											
RNeasy Mimi Kit	cm ²	0,32	2±0 (0)	90±5,7 (6)	6,62±3,56 (54)	82±14 (17)	8,0±2,24 (28)	ND	6,15±3,63 (59)	84,6±12,8 (15)											
		1	2±0,82 (41)	93±4,7 (5)	9,41±4,56 (48)	78±13 (16)	9,42±3,33 (35)	ND	7,93±4,89 (62)	82,8±12,8 (15)											
		2	1,43±0,42 (29)	99±1,4 (1)	14,1±3,66 (26)	91±17 (19)	8,18±2,59 (32)	ND	9,6±5,86 (61)	93,2±14,5 (16)											
		ARN/cm ²	3±2,4 (81)	94,1±5,7 (6)	12±9,4 (76)	83,8±15,5 (19)	13±10 (78)	ND	11±9,4 (88)	86,9±14,2(16)											
Perfect RNA™ E.M.	cm ²	0,32	16,8±2,01 (12)	65±1,2 (2)	12,8±2,64 (21)	62±5,6 (8)	15,2±1,3 (9)	ND	14,9±2,81 (19)	62,7±4,8 (8)											
		1	9,33±0,94 (10)	77±2,4 (3)	11,3±2,9 (26)	66±8,2 (3)	7,43±0,42 (6)	ND	9,36±2,52 (27)	69,8±8,4 (12)											
		2	9,4±1,13 (12)	75±3,6 (5)	28,6±5,04 (18)	80±14 (1)	19,27±10,07 (52)	ND	19,09±10,8 (57)	78,1±11,5 (15)											
		ARN/cm ²	22±21,9 (99)	72,1±5,9 (8)	22±13,9 (64)	69,2±12,4 (18)	22±18,8 (87)	ND	22±18 (85)	70,2±10,7 (15)											
Nucleospin RNA II	cm ²	0,32	5,33±0,94 (18)	62±0,8 (1)	5,7±1,28 (22)	65±0,5 (9)	10,6±1,1 (10)	ND	7,85±2,92 (37)	63±1,4 (2)											
		1	3,7±3,75 (101)	66±2,9 (4)	5,63±2,73 (49)	67±2 (4)	12,2±2,01 (17)	ND	8,07±4,93 (61)	66,4±2,6 (4)											
		2	2,33±0,66 (28)	71±5,8 (8)	4,9±3,14 (64)	72±5,5 (7)	11,8±1,23 (10)	ND	7,33±4,8 (65)	71,2±5,6 (8)											
		ARN/cm ²	7,2±7,3 (102)	66,3±5,3 (8)	8,6±7,2 (84)	67,7±4,5 (6,6)	17±11,9 (70)	ND	12±11 (89)	66,9±5 (7)											

^aEnsayos realizados, con cada sistema de extracción, por un mismo técnico en dos días distintos (A y C), o por dos técnicos en un mismo momento (B y C), repitiendo el ensayo un mínimo de 3 veces. ^bSuperficie de partida para las extracciones de RNA, en cm². ^cValores medios de concentración de RNA expresados en ng/cm². ^dCantidad de RNA, calculado tras cuantificación espectrofotométrica, expresado en ng/cm², y como “media±σ[desviación típica](C.V. [coeficiente de variación])”. ^eEstima de pureza; calculada como la relación entre los valores de absorbancia a 260 y 280 nm, y expresada como “media±σ(C.V.)”. ^fNúmero de repeticiones.

Electroforesis en Geles de Acrilamida

Un segundo parámetro a valorar fue la visualización de la intensidad de las bandas correspondientes al genoma viral en geles de poliacrilamida-SDS.

El resultado obtenido fue sorprendente en cuanto a que únicamente con uno de los métodos se consiguió visualizar los segmentos genómicos de IPNV en la solución de RNA extraído; este fue el Nucleospin RNA II, de Macherey-Nagel, que mostró cantidades proporcionales a la superficie de pocillo de extracción (figura II.1). No se visualizó RNA en el caso de los otros métodos de extracción.

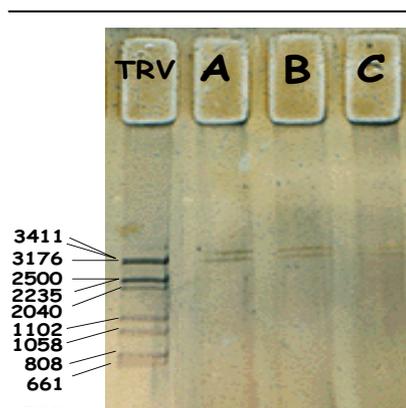


Fig. II.1.-Gel de poliacrilamida Gene Excell mostrando el RNA extraído con Nucleospin RNA II, a partir de superficies celulares infectadas de 2, 1 y 0,32 cm² (Calles A, B, y C respectivamente). El RNA del virus TRV se empleó como estandar de masas moleculares.

RT-PCR

El tercer ensayo para analizar la eficacia del método de extracción fue la RT-PCR. En este caso, se ha evaluado la capacidad de cada método para obtener un producto adecuado para su utilización en el diagnóstico de IPNV mediante RT-PCR.

Los resultados obtenidos con Trizol LS Reagent no fueron lo optimos que se esperaba teniendo en cuenta las concentraciones medias obtenidas; así, como se muestra en la figura II.2, para las tres superficies se obtuvieron bandas de

amplificación específica de muy baja intensidad, y con amplificaciones proporcionales a la superficie de extracción de partida, de forma que la banda correspondiente a una superficie de 0,32 cm² fue difícilmente visualizable, y en ocasiones no visualizable, en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

El resultado fue más satisfactorio con el método tradicional de extracción con Proteinasa K (Figura II.2.B). Nuevamente, se visualizaron bandas de amplificación específica proporcionales a la superficie de extracción, bandas por otro lado perfectamente definidas, incluso con los productos de extracción a partir de la superficie más pequeña, 0,32 cm². No obstante, en ocasiones se obtuvieron, en la alícuota de mayor tamaño, bandas inespecíficas además de la esperada.

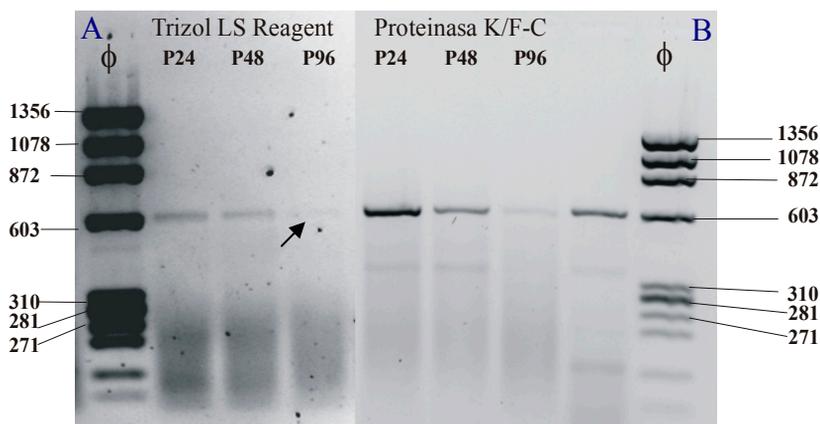


Figura II.2- Productos de amplificación obtenidos utilizando como patrón el RNA extraído con los métodos Trizol LS Reagent y Proteinasa K/Fenol-Cloroformo, aplicado a superficies de placas de microtitulación de 24, 48 y 96 pocillos (calles P24, P48 y P96, respectivamente). Como estándar de pesos moleculares se empleó DNA de Fago Φx174 cortado con Hae III (calle Φ). La flecha muestra la presencia de la bandas menos visibles.

El kit RNeasy[®] de Qiagen proporcionó bandas de amplificación poco definidas (figura II.3.A), e incluso no presentó bandas de amplificación en el caso de productos de extracción a partir de los pocillos de 0,32 cm². Sin embargo, es

interesante indicar que, cuando se emplearon geles de acrilamida teñidos con nitrato de plata se visualizaron bandas de amplificación a partir de todas las superficies (resultados no mostrados).

Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) y Perfect RNA™ (Eppendorf) fueron los sistemas que mejores resultados aportaron, proporcionando bandas de amplificación específica nítidas y de alta intensidad, sin bandas inespecíficas

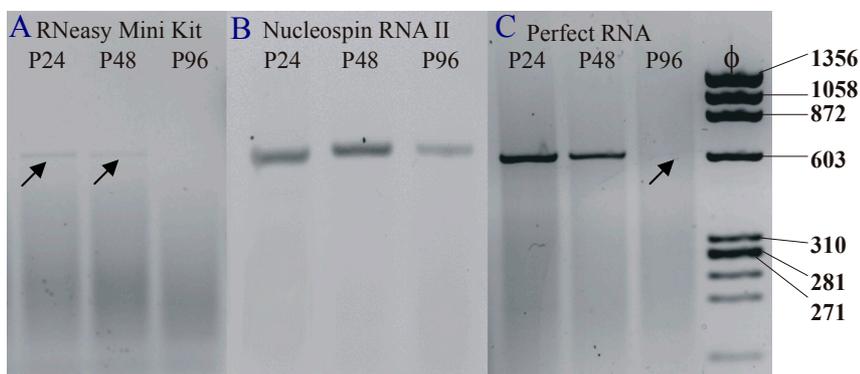


Figura II.3.-Productos de amplificación obtenidos utilizando como patrón el RNA obtenido con los métodos Rneasy® Mini Kit, Nucleospin RNA II y Perfect RNA™ Eukaryotic Mini, aplicado a superficies equivalentes a pocillos de placas de microtitulación de 24, 48 y 96 pocillos (calles P24, P48 y P96, respectivamente). Como estandar de pesos moleculares se empleó DNA de Fago Φ x174 cortado con Hae III (calle Φ). Las flechas marcan la posición de las bandas poco visibles

apreciables; sin embargo, en el caso de Nucleospin RNA II no se apreció relación entre la intensidad de las bandas y la superficie de extracción de partida (Fig II.3.B). Con este kit se intentó llegar más lejos, realizándose extracción a partir de superficies de 0,16 y 0,008 cm², y en ambos casos se obtuvo producto de amplificación, de baja intensidad en geles de agarosa, aunque fácilmente apreciables en geles de acrilamida (resultados no mostrados).

DISCUSION

Desde hace varias décadas hemos venido asistiendo a un gran desarrollo del diagnóstico molecular dentro de la virología de peces. Estos métodos de diagnóstico incluyen un paso de extracción de ácidos nucleicos seguido de una detección específica del mismo, mediante técnicas como la PCR o la hibridación de ácidos nucleicos (Welnicki y Hiruki, 1992; Dopazo y col., 1994; Le Guyader, 1994; Blake y col., 1995; Arnal y col., 1999; Xiang y col., 2001). En gran medida, la sensibilidad y eficacia de estas técnicas de diagnóstico va a depender de la eficiencia de los métodos utilizados para extraer el ácido nucleico (Dopazo y Barja, 2001, 2002). La elección de una técnica de extracción para ser utilizada de rutina en diagnóstico vendrá dado por su rendimiento (capacidad de extracción de ácido nucleico, eliminación de inhibidores de enzimáticos, repetibilidad), laboriosidad, rapidez, coste y posibilidades de estandarización (Arnal y col., 1999; Burgener y col., 2003; Ribao y col., 2004).

En los últimos años han aparecido una serie de soluciones comerciales que permiten realizar extracciones de RNA de una forma eficaz y rápida (desde 20 minutos hasta 1 hora) a partir de diferentes sustratos. En el presente estudio se han evaluado 5 métodos de extracción de RNA a tres niveles: Espectrofotométricamente (concentración y pureza del RNA), electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y RT-PCR.

Estudios realizados por otros autores (Xiang y col., 2001; Verhayden y col., 2003) basados en mediciones espectrofotométricas de la concentración de ácido nucleico extraído ya muestran considerables diferencias de concentración media entre métodos basados en resinas de sílice y aquellos más tradicionales basados en separación utilizando fenol/cloroformo (ProteinasaK/Fenol-Cloroformo y Trizol), y con muy baja repetibilidad. En nuestros ensayos esta tendencia también se mantuvo, tanto Trizol como Proteinasa K seguida de separación fenol/cloroformo presentaron las medias de concentración más altas, con una escasa repetibilidad, en contraposición con los basados en resinas de sílice (Nucleospin, Perfect RNA y Rneasy) que, mostrando menos

capacidad de recuperación, tuvieron una más alta repetibilidad. Esta discrepancia ya ha sido descrita por otros autores (Xiang y col., 2001; Verheyden y col., 2003), que explicaron el resultado basándose en la poca afinidad que tienen las resinas de sílice por fragmentos de RNA inferiores de 200 pb, y en que, en la extracción con fenol el pH del mismo influye sobre la eficacia del DNA o del RNA. Sin embargo, en nuestro caso hemos trabajado con ácidos nucleicos de tamaño muy por encima de estos 200 pb y, por otro lado, se empleó el pH ácido aconsejable para la extracción de RNA, por lo que se hace necesario buscar otras teorías. En este sentido, al tratarse de una extracción de RNA total a partir de células infectadas, estarían presentes RNAs mensajeros de pequeño tamaño o fragmentados y otros RNAs de pequeño tamaño como RNA 5,8S, RNA 5S y tRNAs, que serían descartados por los sistemas comerciales basados en membranas de retención, y que podrían explicar en alguna medida las altas concentraciones obtenidas con los métodos basados en extracción con fenol.

En cuando a RT-PCR, prácticamente todos los métodos se mostraron adecuados para la amplificación, sobre todo a partir de las superficies más altas, aún presentado diferencias de concentración apreciables entre los diferentes sistemas, explicable porque tras 30 ciclos de replicación se produce cantidad suficiente de cDNA (del orden de 2^{28} veces), para hacer indistinguibles estas diferencias de recuperación de RNA (Donald, 1984; Xiang y col., 2001). Es en las superficies más bajas, cuanto más nos acercamos al límite de detección, cuando observamos diferencias ente los diferente métodos (Fanson y col., 2000), mostrándose ProteinasaK/Fenol-Cloroformo, Nucleospin RNA II y Perfect RNA como las de elección en estas superficies, siendo el primero el único que presentó bandas de amplificación incluso con fracciones de la superficie menor de partida.

Por último, a modo de conclusión, por eficacia en el diagnóstico, rapidez y eficiencia en todas las superficies ensayadas Nucleospin RNA II es el método aconsejable, aunque tiene en contra su elevado coste económico, por los que no se puede descartar el uso de la ProteinasaK/Fenol-Cloroformo, que aunque más laborioso, es de eficacia similar y

económicamente más rentable, seguido del Trizol LS cuando partimos de superficies mayores de 0,32 cm² (>320000 células).

CAPITULO III:

**Optimización y validación de la RT-PCR
para la detección del virus IPNV**

INTRODUCCION.

La PCR es una técnica de diagnóstico molecular de demostrada eficacia en términos de sensibilidad, especificidad y repetibilidad (Dopazo y Barja, 2002), razón por la cual su uso en acuicultura se está volviendo rutinario (Blake y col., 1995; Taksdal y col, 2001), aunque por el momento ni la UE ni la OIE (Organización Internacional de Epizootias) la consideran como herramienta oficial de diagnóstico *per se* (OIE, 2003).

Al igual que el resto de las técnicas de diagnóstico molecular, la RT-PCR se basa en la premisa de que cada organismo patógeno posee una única y específica secuencia de ácido nucleico que la diferencia del resto de los organismos, característica que es la base de la gran especificidad de esta técnica. Por otro lado, la PCR se basa en la amplificación de una secuencia patrón, amplificación que, siendo de magnitud exponencial, implica la potenciación de la capacidad de detección del ácido nucleico; de hecho, 35 ciclos de amplificación permitirían aumentar el número de moléculas hasta 10^{10} , a partir de una única molécula patrón (López-Galíndez, 1993).

Son precisamente estas dos características de la RT-PCR las que deben tenerse en cuenta a la hora de optimizar esta técnica para el diagnóstico de virus de interés en acuicultura, y entre ellos, también el virus IPNV, el objeto de nuestro estudio. El virus IPNV muestra una gran diversidad serológica (Hill y Way, 1995) y genotípica (Blake y col, 1995; Cutrín y col., 2004); por ello, la alta especificidad de la PCR podría incluso significar la detección selectiva de unos u otros tipos virales, con el consiguiente riesgo que esto entrañaría en un diagnóstico oficial.

Por otro lado, la alta sensibilidad puede provocar que, contaminaciones durante el proceso de manipulación, puedan dar lugar a la aparición de casos de falsos positivos. Esta característica intrínseca de la PCR ha sido utilizada por los detractores de esta técnica aduciendo que puede dar lugar a errores en el diagnóstico; incluso, en determinados foros (OIE, 2000) ha llegado a afirmarse que la alta sensibilidad pueda

dar lugar a la detección de ácido nucleico libre cuya presencia se deba a infecciones antiguas, afirmación poco plausible habida cuenta de la baja estabilidad del A.N. desnudo, especialmente el RNA en muestras de tejidos. Finalmente, es admisible otra de las vías de ataque a esta técnica, puesto que la detección viral mediante esta técnica no tiene necesariamente por qué implicar que el virus esté activo o sea virulento.

Por todo ello, para asegurar la eficacia de la PCR como técnica de diagnóstico es fundamental la optimización de todos y cada uno de los pasos protocolarios, con el fin de cumplir las dos premisas básicas en toda técnica de diagnóstico (Dopazo y Barja, 2002)

- i. Si el virus está presente, debe ser detectado (*sensibilidad*).
- ii. El virus sólo será detectado si está presente (*especificidad*).

En el presente capítulo hemos evaluado la utilización de la técnica de RT-PCR para el diagnóstico del virus de la necrosis pancreática infecciosa, tanto a partir de cultivos celulares inoculados como de peces infectados.

MATERIAL Y METODOS.

Cepas virales y propagación de virus.

Para este estudio se utilizaron 20 cepas virales de IPNV, 9 cepas de referencia y 11 cepas aisladas en nuestro laboratorio a partir de reservorios y de peces cultivados en piscifactorías de Galicia. La elección de estas 20 cepas de IPNV se hizo en base a la clasificación en patrones electroforéticos realizada por Cutrín y col (2004), por la que se establecieron 6 electroferogrupos en base a la movilidad electroforética del genoma de 25 cepas de referencia y más de 200 aislados gallegos.

Utilizando como referencia esta clasificación, se seleccionaron de 1 a 2 cepas por cada electroferogrupo, teniendo en cuenta el origen de la cepa (reservorios o peces), así como su localización geográfica (Tabla III.1).

Tabla III.1.- Aislados de IPNV utilizados en este estudio.

Especie	Cepas Virales					
	Aislados de Galicia			Cepas de Referencia		
	Aislado	Grupo ¹	Fecha	Cepa	Grupo	Origen
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	24Fo	EG5	2/87	WB	EG2	U.S.A.
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	533	EG1	11/90	Sp	EG4	Dinamarca
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	405	EG2	6/90	Ab	EG3	Dinamarca
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	534	EG5	12/90	Ja	EG4	Canadá
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2464	EG6	4/94	C2	EG2	Canadá
<i>Scophthalmus maximus</i>	152	EG5	6/88			
<i>Scophthalmus maximus</i>	578	EG3	2/91			
<i>Salmo salar</i>	2290	EG4	9/93	C1	EG2	Canadá
<i>Salmo salar</i>	2310	EG4	10/93			
<i>Salmo trutta lacustris</i>				C3	EG2	Canadá
<i>Esox lucius</i>				He	EG5	Alemania
<i>Tellina tenuis</i>				Te-2	EG2	Escocia
<i>Crassostrea gigas</i>	88 R	EG4	10/91			
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	24 R	EG4	10/91			

¹Electroferogrupo, según establecido por Cutrín y col. (2004).

Así, se seleccionaron 5 aislados de trucha arcoiris (24Fo, 533, 405, 534, y 2464), dos procedentes de piscifactorías de rodaballo (152 y 578) y otras dos de salmón (2290 y 2310), además de dos cepas de reservorios, una de mejillón (88R) y otra de ostra (24R).

Además de estos aislados, y en función de su patrón electroforético, y de la representatividad de los 9 serotipos del serogrupo A, se seleccionó una serie de cepas de referencia; en concreto: la cepa WB, aislada por Wolf en 1960, depositada en la ATCC con la referencia VR-877, aislada a partir de trucha arcoiris en U.S.A por Lientz y Springer en 1973, y considerada actualmente como la cepa tipo americana (serotipo A₁); la cepa Jasper (VR-1325) (serotipo A₉), aislada a partir de trucha arcoiris en Canadá

(Yamamoto, 1974); las cepas Sp (VR-1318) (A₂) y Ab (VR-1319) (A₃), aisladas por Jørgensen y Brengballe (1969) y Jørgensen y Grauballe (1971), respectivamente, a partir de trucha arcoiris, y que son consideradas como los principales serotipos europeos. La cepa He (A₄), aislada por Ahne en 1978 a partir de carpa y lucio, y depositada en la ATCC como VR-1320; las cepas C1 (A₆), C2 (A₇) y C3 (A₈) (VR-1322, 1323 y 1324, respectivamente), aisladas por MacDonald y col., 1983, y por último Te-2 (A₅), aislada a partir de *Tellina tenuis* por Hill (1976), y depositada en la ATCC como VR-1321.

Para la propagación de los virus se emplearon cultivos celulares de CHSE-214, BF-2 y RTG-2, a los que se les vació el medio y se les añadieron 200 ml de suspensión viral, se incubó a temperatura ambiente durante una hora, retirando a continuación los restos de inóculo y añadiéndole medio de mantenimiento. Los frascos de cultivo se incubaron a 15°C durante 7-10 días. Diariamente se observaron los tapices hasta la detección de ECP característico de IPNV. Una vez que el ECP se hizo generalizado se recogió en viales de criocongelación, se titularon del mismo modo que previamente se ha descrito (Capítulo II) y se congelaron a -80°C.

Optimización de la RT-PCR *in Vitro*.

Para todos los ensayos realizados en este apartado se empleó RNA viral extraído a partir de virus crudo, empleando el método de extracción con Proteinasa K y fenol-cloroformo, según lo descrito en el capítulo II. Para la obtención de virus crudo se utilizaron frascos de 25 cm² de tapices confluentes de la línea celular CHSE-214, como se ha indicado anteriormente.

Evaluación de sistemas comerciales de RT-PCR

El primer paso en la optimización de la RT-PCR para diagnóstico del virus IPNV *in vitro* fue la evaluación de varios kits de amplificación de diferentes casas

comerciales, ensayando diferentes condiciones en fases clave. Para ello se utilizó RNA, extraído a partir de virus crudo de las cepas Jasper y WB. Las parejas de cebadores ensayadas fueron IPNV₁₋₂ e IPNBA4_{U-D}, diseñadas previamente por Dopazo y col., (1994), y que delimitan fragmentos de 440 y 304 pb, respectivamente, según la secuencia de la cepa Jasper.

GeneAmp® RNA PCR kit, Applied Biosystem. En primer lugar, los cebadores fueron rehibridados con el RNA patrón; para ello, aproximadamente 100 ng de RNA extraído se mezclaron con los cebadores a una concentración final de 0,2 μ M, se hirvió durante 3 min y se transfirió inmediatamente a 42°C, rehibridando durante 10 min. Para la transcripción inversa, a la solución rehibridada se le añadieron los siguientes componentes (ensayando diferentes concentraciones): dNTP (1 o 2 mM), inhibidor de RNasa (1 U/ μ l), MgCl₂ (5 mM), 10X PCR Buffer (1X), transcriptasa inversa (TI) MuLV (2,5 o 5 U/ μ l). Con el objeto de optimizar el proceso, se ensayaron 2 temperaturas (37 y 42°C) y tiempos (30 y 45 min) de incubación.

A continuación, el producto de transcripción inversa se suplementó con MgCl₂ (2 mM), 10X PCR Buffer (1X) y *AmpliTaq®* DNA Polimerasa (2,5 U/100 μ l). Las mezclas de reacción se desnaturalizaron a 95°C durante 2 min y se sometieron a 35 ciclos de amplificación, cada uno consistente en un paso de desnaturalización a 95°C durante 1 min, continuado con un paso único de rehibridación y extensión a 60 o 70°C durante 1 min. Todo el proceso se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc). Tras una extensión final a 72°C durante 7 min, todos los productos de RT-PCR fueron almacenados a -20°C hasta su utilización. Como control negativo de RT-PCR, en todos los experimentos se empleó agua libre de nucleasas.

GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent Kit, Applied Biosystem. Se trata de una versión mejorada del anterior sistema, pues utiliza dos nuevas enzimas, una

AmpliTaq Gold® DNA polimerasa, que es de tipo “Hot Start” y que se activa a los 95°C, y una *MultiScribe*™ Transcriptasa Inversa, derivada de una reversotranscriptasa MuLV, e inestable a la misma temperatura; con ello lo que se pretende es convertir a éste en un kit que realiza toda la reacción en un único vial.

Para la transcripción inversa, aproximadamente 100 ng de RNA se incubaron en presencia de los cebadores a una concentración final de 0,2 µM; la mezcla se incubó durante 3 a 5 min a 95°C y se pasó inmediatamente a 42°C durante 10 min. Al producto de rehibridación se le añadió la siguiente mezcla de reacción: dNTPs (200 µM cada uno de ellos), inhibidor de RNasa (0,2 U/µl), DTT (5 mM), MgCl₂ (1-2 mM), 5X RT-PCR Buffer (1X), transcriptasa inversa *MultiScribe* (0,3 U/µl), *AmpliTaq Gold* DNA polimerasa (0,05 U/µl) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 µl.

Para la transcripción inversa, la mezcla de reacción se incubó a 42°C durante 20 min, finalizando a 95°C durante 5 min, tratamiento que al mismo tiempo activa la polimerasa (*AmpliTaq Gold*). La reacción de amplificación se realizó en 35 ciclos (desnaturalización a 94°C durante 45 seg, continuando con un paso de rehibridación a 58°C durante 30 seg y extensión a 68 o a 72°C durante 1 min) en un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf). Finalmente se llevó a cabo un proceso de extensión a 72°C durante 7 min. Como control negativo de la reacción se utilizó agua libre de nucleasas. Los productos de RT-PCR fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

PCR Reagent System, Invitrogen. Se trata de un kit para PCR, por lo que para la reacción de transcripción inversa se utilizó el enzima reversotranscriptasa M-MLV del mismo proveedor. Para ello, el RNA extraído (alrededor de 100 ng) se incubó a 95°C durante 4 min en presencia de los cebadores correspondientes (0,2 µM), en un volumen final de 10 µl; a continuación se transfirió rápidamente

a 42°C, para llevar a cabo la rehibridación durante 10 min.

Para la transcripción inversa, a la solución rehibridada se le añadió una mezcla de dNTPs (0,5 mM), Inhibidor de RNasa (1 U/μl), DTT (0,01 M), Tampón de RT 5X “*First-Strand*” [1X: Tris-HCl 20 mM (pH 8,3), KCl 75 mM y MgCl₂ 3 mM] y transcriptasa inversa M-MLV (10 U/μl). Para la optimización se evaluaron 3 temperaturas de incubación (37, 42 y 45°C) durante 50 min.

Para la fase de amplificación, al producto de transcripción inversa se le añadió dNTP (0.2 mM cada uno), MgCl₂ (1.5 mM), tampón 10X de PCR (1X) y *Taq* DNA Polimerasa (2,5 U/100 μl). La mezcla de reacción se sometió a desnaturalización a 95°C durante 2 min y a continuación a 35 ciclos de polimerización (desnaturalización a 95°C durante 1 min, un paso de rehibridación a 55°C durante 30 seg y posterior extensión a 72°C durante 1 min) en un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf). Finalmente se dio paso a una fase de extensión a 72°C durante 7 min. Los productos de RT-PCR se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Como control negativo, para la RT-PCR se empleó, en todos los ensayos, agua libre de nucleasas.

***Tth* DNA Polimerasa, Promega.** Se trata de un kit de RT-PCR que tiene un enzima muy particular, la *Tth* DNA polimerasa (aislada de *Thermus thermophilus*), enzima que, dependiendo de las condiciones iónicas, puede comportarse como transcriptasa inversa o como DNA polimerasa. Las muestras se incubaron en presencia de los cebadores (0,2 μM) a 95°C durante 4 min y se transfirieron inmediatamente a 42°C durante 10 min; manteniéndolas a continuación en hielo hasta el siguiente paso.

Para la reacción de transcripción inversa se añadieron los siguientes componentes: dNTPs (0,2 mM, cada uno), MnCl₂ (0,8, 1,2 o 1,5 mM), tampón de RT [Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 90 mM], *Tth* DNA polimerasa (6U). Al

igual que en casos anteriores se evaluaron dos temperaturas de reacción, 42 y 37°C, incubando durante 30 min.

Para la fase de PCR añadimos a la mezcla anterior MgCl₂ (2 mM) y tampón quelante [Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 0,1 M, EGTA 0,75 mM, Tween® 20 0,05%, y Glicerol 5%]. Las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 2 min y se sometieron a 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C durante 1 min y un paso de rehibridación y extensión a 60°C durante 3 min) en un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf). Al final se procedió a un proceso de extensión a 70°C durante 10 min. Los productos de RT-PCR fueron almacenados a -20°C hasta su análisis. Para el control negativo de RT-PCR, en todos los experimentos se empleó agua libre de nucleasas.

Access RT-PCR system, Promega. Se trata de un kit de RT-PCR de un solo paso, o que realiza toda la reacción en un solo vial. Las muestras de RNA se desnaturalizaron, en presencia de los cebadores (0,2 µM), a 95°C durante 4 min, rehibridando a continuación a 45°C durante 5 min; a continuación se añadió la mezcla de todos los componentes de la RT-PCR: dNTP (1 mM), MgSO₄ (1 mM), tampón *AmVTfl* 5X (1X), transcriptasa inversa AmV (5U) y *Tfl* DNA polimerasa (5U). La mezcla se incubó a 37, 42 o 48°C durante 30 min (fase de transcripción inversa), se desnaturalizó a 94°C durante 4 min y posteriormente se sometió a 35 ciclos de amplificación (94°C durante 30 seg, rehibridación a 60°C durante 1 min, y extensión a 68°C durante 2 min) en un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf). Finalmente se procedió a una última fase de extensión a 68°C durante 10 min. Los productos de RT-PCR se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Como control negativo de RT-PCR en todos los experimentos se empleó agua libre de nucleasas.

SuperScript™ II One-Step RT-PCR con Platinum® Taq, Invitrogen. Al igual que en el caso anterior, este es un Kit de RT-PCR de un paso. La muestras

de RNA se incubaron, en presencia de los cebadores (0,2 μ M), a 95°C durante 4 min y los viales se pasaron a 45°C durante 5-10 min; a continuación se añadieron todos los componentes del RT-PCR: mezcla de reacción 2X, mezcla de transcriptasa inversa *SuperScript II* y Taq DNA polimerasa (3 a 5 U/ μ l). La mezcla se incubó a 48°C durante 30 min (fase de transcripción inversa), se desnaturalizó, mediante incubación a 94°C durante 5 min (inactivando simultáneamente la transcriptasa inversa) y a continuación se sometió a 35 ciclos de amplificación (94°C durante 30 seg, rehibridación a 60°C durante 1 min y extensión a 68°C durante 2 min) en un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf). Finalmente se procedió a una última fase de extensión a 68°C durante 10 min. Los productos de RT-PCR se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Como control negativo de RT-PCR, en todos los experimentos se empleó tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0).

SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System, Invitrogen. Se trata de una versión mejorada del kit anterior; aunque se comercializa para realizar PCR cuantitativa, puede ser utilizado igualmente para RT-PCR tradicional. Para lo cual se utilizó exactamente el mismo protocolo que en el caso anterior.

Titan One Tube RT-PCR System, Roche Diagnostic GmbH. Se trata también de un sistema de RT-PCR en un solo paso. Las muestras se incubaron, en presencia de los cebadores (0,2 mM), a 95°C durante 5 min, seguido de 5 min a 48°C. Tras esta incubación, se añadieron los siguientes componentes: 10 μ l de RT-PCR Reaction Buffer, dNTPs, DTT y MgCl₂, a concentraciones finales de 0,2 μ M, 5 mM y 0,2 mM, respectivamente, 5-10 U de inhibidor de RNasas y 1 μ l de mezcla de enzimas (AMV y “*Expand high fidelity PCR system*”); la mezcla de reacción se completó con agua hasta un volumen de 50 μ l.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MasterCycler

Personal, Eppendorf. La mezcla se incubó a 48°C durante 30 min (fase de transcripción inversa), se desnaturalizó, mediante incubación a 94°C durante 5 min y se sometió a 35 ciclos de amplificación (94°C durante 30 seg, rehibridación a 60°C durante 30 seg y extensión a 68°C durante 2 min). Finalmente se incubaron durante 10 min a 68°C y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

SuperScript™ III Reversotranscriptasa . Se trata de una transcriptasa inversa de última generación diseñada por Invitrogen basada en la M-MLV reversotranscriptasa, con una actividad RNasa H reducida para evitar la eliminación de RNA y una estabilidad térmica más alta, pudiendo sintetizar cDNA a temperaturas de hasta 55 °C. Se utilizó en combinación tanto con el sistema PCR Reagent System, de Invitrogen siguiendo el mismo protocolo expuesto anteriormente, como con el sistema HotMaster™ Taq DNA polimerasa de Eppendorf.

Para obtener el cDNA, las muestras de RNA viral se incubaron, en presencia de *random* hexámeros, a una concentración final de 2,5 ng/μl, durante 5 min a 95°C, y a continuación se transfirieron inmediatamente a 4°C. Seguidamente se añadieron 4 μl de “5X First Strand buffer”, 1 μl de DTT 0,1 M, 1 μl de dNTP mix (10 mM cada unos de ellos), 50 U de SuperScript™ III RT, y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 μl. Esta solución se incubó a 25°C durante 10 min seguidos de 50°C durante 50 min (síntesis del cDNA). Finalmente la mezcla de reacción se sometió a 85°C durante 5 min para inactivar la reversotranscriptasa. Opcionalmente se incubó la mezcla durante 20 min a 37°C en presencia de RNasa H para degradar los restos de RNA presentes.

En la reacción de amplificación se utilizaron, como se indicó anteriormente, el sistema PCR Reagent System (anteriormente descrito) y/o el sistema HotMaster™ Taq DNA polimerasa. Con este último, se preparó una

mezcla de reacción con los siguientes componentes: 4 µl de 10X HotMaster™ Taq Buffer, 1 µl de dNTP mix 10 mM, cebadores a una concentración final de 0,2 µM, 1 U de HotMaster™ Taq DNA polimerasa y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 35 µl. A esta mezcla se le añadieron 5 µl de la reacción de transcripción inversa y se incubaron durante 3 min a 95°C, y a continuación a 35 ciclos de amplificación consistentes en 30 seg a 95°C, 30 seg a 58°C y 45 seg a 68°C. Finalmente se incubó a 68°C durante 10 min y los productos de amplificación se congelaron a -20°C hasta su uso. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MasterCycler Personal (Eppendorf).

Evaluación de cebadores.

Selección de cebadores.- Se seleccionaron 7 pares de cebadores para este estudio (tabla III.2 y figura III.1), 5 con productos de amplificación situados en

Tabla III.2.- Secuencia y posición de los cebadores evaluados.

<i>Cebadores</i>	<i>Secuencia de nucleótidos(5'-3')</i>	<i>Segmento</i>	<i>Posición*</i>
IPNCP 1	TGA TCC CAA ACC GAG ACC TA	A	1240-1259
IPNCP 2	CCT CCG GCT GCG TGT GAC	A	1595-2320
IPNLob 1	GTC AGG TCC TTT TGG CTT C	A	2302-2320
IPNLob 2	AGC TGA TGA GAA CAA CTG C	A	2531-2549
IPNA1	CAC CAT GGC CAG AGC AAA AGA	A	2327-2350
IPNA2	TGG GGC AGG CCG TAG ACA CT	A	2776-2757
IPNJAV ₁	GCA GTC ATC TTT CCT GTG TG	A	1737-1756
IPNJAV ₂	TGG AGT TCT GGG TCC ATC CC	A	2344-2325
IPNV ₁	GGT CAA CAA CCA ACT AG	A	572-593
IPNV ₂	GTT GGG ATT GAC TGC GTA AAC	A	1012-992
IPNBA _{4d}	GCC CCT TGA CAA CCC TCA GG	B	220-239
IPNBA _{4u}	TGG GGA AGT GGT TCT CCA AC	B	524-509
IPNB1	AGC CGC CAA ATG GAG ATG TTG	B	1789-1769
IPNB2	TGC GTG GGG GTC AGA GG	B	2559-2543

*Posiciones relativas sobre el genoma de la cepa Jasper de IPNV

el segmento A y 2 situados en el segmento B del genoma de IPNV. De todos ellos, dos parejas (IPNV₁₋₂ e IPNBA_{4U-D}) fueron diseñadas por Dopazo y col. (1994), mientras que el resto fueron diseñados expresamente para este estudio utilizando el software DNASTAR™, sobre el genoma de la cepa Jasper, aunque luego, en algunos casos, la secuencia fue modificada teniendo en cuenta las secuencias correspondientes a las cepas de origen europeo Ab y Sp. Los cebadores se seleccionaron con tamaños entre 17 y 21 pares de bases, para amplificar un fragmento específico entre 250 y 800 pares de bases (Fig III.1).

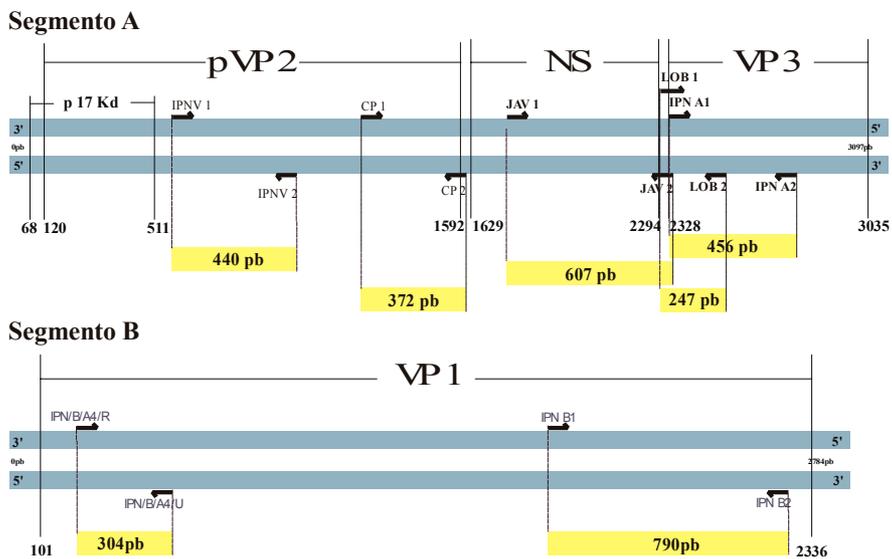


Figura III.1.- Cebadores utilizados en este estudio: posiciones relativas en el genoma de la cepa Jasper de IPNV

De todos ellos, 5 parejas de cebadores fueron diseñadas para amplificar distintos fragmentos, de un tamaño superior a 250 pb, a lo largo del segmento A del genoma de IPNV. Dos de ellos se buscaron en la región genómica

correspondiente a la proteína estructural VP2 (IPNV₁₋₂ y CP₁₋₂), otro en la región NS (la pareja IPNJAV₁₋₂), abarcando prácticamente toda la región no codificadora entre la proteína NS o VP4 y VP3, y otras dos parejas en la región correspondiente a la proteína VP3 (IPNLob₁₋₂ e IPNA₁₋₂). Los dos restantes cebadores (IPNBA4_{D,U} y IPNB₁₋₂) fueron diseñados para amplificar dos fragmentos en el segmento B, en regiones internas correspondientes a la proteína VP1.

Obtención del RNA Viral.- La eficacia de los cebadores pre-seleccionados se evaluó mediante RT-PCR aplicado sobre RNA extraído a partir de virus crudo de 20 cepas diferentes de IPNV. Para ello, el virus crudo procedente de un frasco de cultivo de 75 cm² con ECP generalizado se centrifugó a 2000 × g durante 30 min a 4°C, provocando la precipitación de restos celulares y virus adsorbido a los mismos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de ultracentrífuga, el precipitado se resuspendió en 5 ml de SSC 1X (NaCl 0,15 M; citrato sódico 0,015 M), se sometió a 3 pulsos de sonicación de 20 Kcal durante 20 seg y se centrifugó a 2.000 × g durante 30 min a 4°C. Los dos sobrenadantes se mezclaron y se centrifugaron a 78.000 × g durante 60 min a 4°C (rotor SW28.1, Beckman). El precipitado se resuspendió en 0.5 ml de SSC 1X, se sonicó para asegurar su total resuspensión y se depositó en un lecho de sacarosa al 35 %, centrifugándose a 120.000 × g durante 90 min a 4°C (rotor SW55Ti, Beckman). El precipitado se resuspendió en 200 µl de SSC 1X y se trató con proteinasa K (2 mg/ml) y SDS (0,05 %) durante 1,5 a 4 horas a 37°C. A continuación se procedió a una extracción fenol-cloroformo según se ha indicado anteriormente, para lo cual se añadieron 2 volúmenes de la solución de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), y se mezcló vigorosamente; se centrifugó a 12.000 × g durante 10 min y la fase acuosa se transfirió a un nuevo vial, añadiendo a continuación dos volúmenes de cloroformo:isoamílico (24:1); tras agitar y centrifugar de nuevo durante 5 min a 12.000 × g, se transfirió la fase

acuosa a un nuevo vial. Seguidamente se aplicó una precipitación con etanol, para lo cual a la fase acuosa se le añadieron 3 volúmenes de etanol absoluto y acetato sódico a una concentración final de 0,3 M; tras 15 min a -20°C se centrifugó 30 min a $12.000 \times g$ a 4°C y el precipitado se lavó con etanol 70% para eliminar el exceso de sales; el precipitado final se secó 5 min en un Speed-Vac (Savant) y se resuspendió en 50 μ l de agua libre de enzimas.

RT-PCR.- Para la amplificación se empleó un volumen de 4 μ l de la solución anterior, que se sometió a RT-PCR utilizando el sistema *SuperScript™ II One-Step RT-PCR con Platinum® Taq* (Invitrogen), siguiendo el protocolo descrito anteriormente, utilizando las 7 parejas de cebadores diseñadas en nuestro laboratorio y descritas anteriormente.

El producto de la reacción se sometió a electroforesis en geles de agarosa, y se visualizó, previa tinción con bromuro de etidio, en un transiluminador de luz ultravioleta.

Evaluación de la especificidad de la RT-PCR.

Para determinar que el fragmento de amplificación fuese el específico y esperado, rutinariamente se incluyeron controles negativos adicionales, consistentes en RNA extraído a partir de cultivos celulares con virus VHSV o IHNV. Además, también de modo rutinario se procedió a realizar un test de Southern Blot/hibridación con sondas específicas para cada fragmento de amplificación, marcadas con digoxigenina.

Preparación y marcaje de las sondas de cDNA. Productos de amplificación obtenidos con los distintos pares de cebadores, a partir de RNA extraído de la cepa de referencia Jasper, se sometieron a electroforesis en agarosa al 1,5%. Las bandas se cortaron con un bisturí y el cDNA se extrajo y purificó empleando el

sistema *DNA Gel Extraction Kit* (Millipore), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. A continuación, entre 30 y 50 ng de cDNA se marcaron con digoxigenina utilizando el kit *DIG-High Prime* (Roche Diagnostics Corporation), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Las sondas marcadas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Southern Blot (SB).- Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en agarosa al 1,5% durante 1 hora a 100 V. A continuación, los fragmentos de DNA fueron transferidos a una membrana de nylon *Hybond N+* (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando el sistema de *Biorad Mini Trans-blot® Cell* (Fig III.2). Para desnaturalizar el DNA transferido, el gel se incubó a 4°C durante 15 min en agitación continua, en una solución de NaOH 150 mM, y a continuación se neutralizó con una solución de TBE 0,5X (Tris 20 mM, ac. bórico 20 mM, EDTA 1 mM) durante 10 min en agitación a 4°C . La transferencia se realizó durante 1 hora a 60 voltios, sobre una membrana de nylon equilibrada en tampón TBE 0,5X durante 15 min a 4°C . Finalmente el DNA se fijó a la membrana con luz UV (1200 KJ durante 3 min) en un crosslinker (UVP, mod. CL-1000) y se secó a 60°C durante 5-10 min.



Figura III.2.- Sistema Mini Trans-Blot Cell / Mini Protean 3.

Hibridación de ácidos nucleicos.- Las membranas se incubaron en tampón de prehibridación Hibrisol I (3 ml/cm^2), en el interior de bolsas de sellado, en un horno de hibridación a 45°C durante 1,5 a 2 horas. Transcurrida la prehibridación, la solución fue sustituida por una nueva de solución hibrisol I (3 ml/cm^2), ahora suplementado con $10\text{ }\mu\text{l}$ de sonda previamente desnaturalizada durante 5 min a 100°C . La hibridación se realizó durante al menos 4 horas en un

horno de hibridación a 45°C. Tras la incubación se retiró el tampón de hibridación y se procedió a lavar las membranas, primero con una solución SSC 2X/SDS 0,1 % durante 15 min a temperatura ambiente, y a continuación otra en una solución SSC 0,1X/SDS 0,1 %, durante otros 15 min también a temperatura ambiente. A continuación las membranas se lavaron con “solución de lavado” (ácido maleico 0,1 M; NaCl 0,15 M, pH 7,5; Tween 20 0,3%) durante 1 min, y se incubaron en la misma solución suplementada con un 1,5% de *reactivo bloqueante* (Boehringer Mannheim) durante 30 min. Se retiró la solución de bloqueo, se añadió el anticuerpo conjugado Anti DIG-AP (Anti-Digoxigenina fosfatasa alcalina) en una relación 1:10000 en solución de lavado, incubando 30 min. Para eliminar los restos de anticuerpo no incorporados se realizaron dos lavados consecutivos de 15 min en solución de lavado. Las membranas se trataron brevemente con tampón de fosfatasa (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM; pH 9,5) y se incubaron con CSPD (Roche) diluido 1:100 en tampón fosfatasa a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación. La membrana se secó sobre un papel de filtro, dejándola ligeramente húmeda, se introdujo en una bolsa sellada, incubando a 37°C durante 15 min en oscuridad, y a continuación se expuso contra una película autorradiográfica durante 30-40 min.

Evaluación de la sensibilidad: Cinética de detección *in vitro*.

Este análisis se llevó a cabo para determinar el mínimo título viral y tiempo de replicación necesarios para detectar el virus en cultivos celulares.

Determinación de la MOI límite.-En un primer lugar se determinó la máxima multiplicidad de infección (MOI) de inoculación a la cual el ácido nucleico viral no fuese detectado por RT-PCR tras 1 hora de adsorción (tiempo “0”). Para ello se inoculó, por triplicado, la cepa Jasper, a 6 valores de MOI desde 0,0001-0,001 a 10-100 en ratios decimales, en placas de cultivo celular de 6 pocillos (11

cm²) con tapices confluentes de CHSE-214. Tras una hora de adsorción, tiempo en el que la práctica totalidad del virus ha penetrado en el interior de la célula (Lidgerding, 1981), a temperatura ambiente, el medio de inoculación fue sustituido por otro de mantenimiento y las placas se incubaron a 15°C; al cabo de 1 hora se extrajo el RNA total de las células infectadas, usando el kit *RNeasy[®] Mini Kit* (Qiagen) como se describió previamente, y se aplicó RT-PCR utilizando los cebadores IPNCP₁₋₂, empleando para ello el sistema *SuperScript[™] II One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq* (Invitrogen). El producto de amplificación se sometió a electroforesis en un gel de agarosa y se visualizó bajo luz UV.

Determinación del título viral y tiempo mínimo detectables.- Cultivos celulares confluentes de CHSE-214 fueron inoculados, por quintuplicado, con la cepa de IPNV Sp o con el aislado 405, a una MOI no detectable por RT-PCR a tiempo “0”. Pasada una hora de incubación a temperatura ambiente, se sustituyó

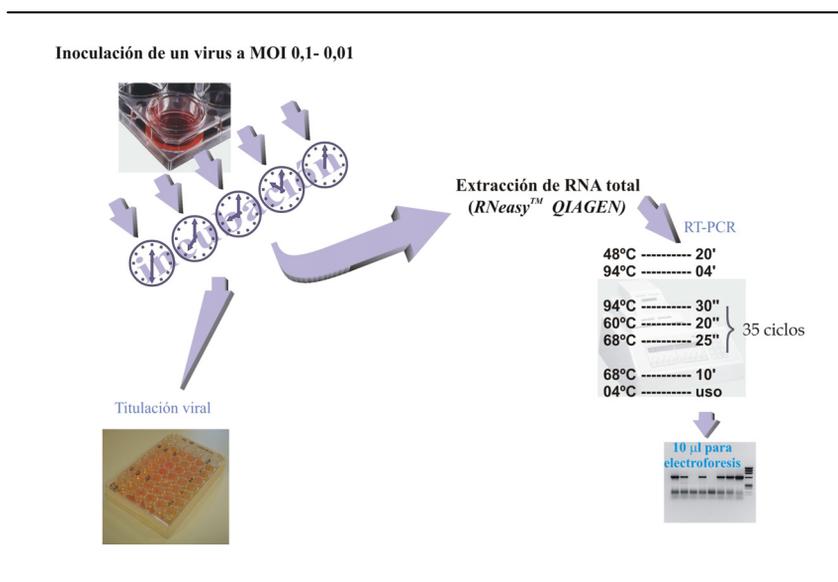


Figura III.3.- Experimentos de detección en cultivos celulares

el medio de inoculación por otro de mantenimiento y se aplicaron periodos de incubación de 4, 8, 12, 16 y 18, 20, 24, 48 y 72 horas a 15°C (figura III.3). Transcurrido el correspondiente periodo de incubación se recogió, por un lado, 1 ml de medio (virus extracelular), descartándose el resto, y por otro el tapiz celular; éste se resuspendió en 1 ml de tampón Earle's y se sometió a tres congelaciones/descongelaciones sucesivas para romper las membranas celulares (virus intracelular). Ambas suspensiones virales (virus extracelular e intracelular) fueron tituladas a continuación siguiendo el método de Reed & Muench (1938).

Tabla III.3.- Aislados de IPNV utilizados en este estudio.

<i>Origen</i>	<i>Cepas Virales</i>				
	<i>Aislados de Galicia</i>		<i>Cepas de Referencia</i>		
	Aislado	Grupo	Cepa	Grupo	Origen
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	24Fo	EG5	WB	EG2	U.S.A.
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	533	EG1	Sp	EG4	Dinamarca
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	405	EG2	Ab	EG3	Dinamarca
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	534	EG5			
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2464	EG5			
<i>Scophthalmus maximus</i>	152	EG5			
<i>Scophthalmus maximus</i>	578	EG3			
<i>Salmo salar</i>	2290	EG4			
<i>Salmo salar</i>	2310	EG2			
<i>Salmo trutta lacustris</i>					
<i>Esox lucius</i>			He	EG5	Alemania
<i>Tellina tenuis</i>			Te-2	EG4	Escocia
<i>Crassostrea gigas</i>	88 R	EG4			
*Piscifactoría					

Una vez determinada la MOI no detectable a tiempo “0”, ésta se utilizó para inocular placas de 6 pocillos con tapices confluentes, tanto de CHSE-214 como de BF-2, con diferentes cepas de IPNV (tabla III.3) a dicha MOI, y se sometieron a tiempos de incubación 4, 8, 10, 12, 14 y 16 horas a una

temperatura de 15°C. Transcurridos estos periodos de incubación se realizó una extracción de RNA a partir del tapiz infectado empleando el sistema *Rneasy® Mini Kit*, de Qiagen. Para la detección por RT-PCR se evaluaron los pares de cebadores IPNJAV, IPNBA4 e IPNCP, empleando el sistema *SuperScript™ II One-Step RT-PCR con Platinum® Taq*, Invitrogen.

Evaluación de la sensibilidad: Cinética de detección *in vivo*.

Para los ensayos de optimización del diagnóstico por RT-PCR *in vivo* se emplearon tejidos infectados obtenidos a partir de peces inoculados experimentalmente.

Inoculación experimental de virus IPNV.- Para este estudio se emplearon alevines con un peso entre 7 y 10 grs de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Los peces se mantuvieron en las instalaciones del acuario del Instituto de Acuicultura (Univ. de Santiago de Compostela) durante un periodo previo de 10 días para lograr su aclimatación, a una temperatura de 15°C.

Antes de la inoculación el 10 % de los individuos se sacrificó y se procesó para diagnóstico virológico con el objetivo de descartar la presencia del virus IPNV en el lote seleccionado. Para ello se empleó aislamiento en cultivos celulares, utilizando las líneas celulares CHSE-214 y RTG-2, siguiendo el procedimiento descrito por Amos (1985) y modificado con posterioridad por Ledo y col. (1987). Brevemente: los tejidos (bazo y riñón) fueron resuspendidos en tampón Earle's en una relación peso:volumen 1:10, y a continuación fueron triturados hasta alcanzar una mezcla homogénea; se centrifugó a 2000 × g durante 20 min y el sobrenadante fue tratado con una mezcla de antibióticos (penicilina 500 U.I./ml, estreptomycin 500 µg/ml y fungizona 1000 µg/ml)

durante un mínimo de 4 horas a temperatura ambiente o bien hasta el día siguiente a 4°C. Una alícuota se inoculó en cultivos celulares, y una segunda alícuota se sometió a extracción de RNA, empleando Proteinasa K/Fenol:Cloroformo, y a RT-PCR utilizando el par de cebadores IPNBA4_{U-D} con el sistema *SuperScript™ II One-Step RT-PCR con Platinum® Taq* (Invitrogen).

Para la inoculación se seleccionaron 4 cepas y 2 aislados gallegos de IPNV (Sp, WB, He, Jasper, 152 y 533), utilizándose virus crudo previamente clarificado por centrifugación a 2000 × g durante 20 min para eliminar restos celulares.

La inoculación fue llevada a cabo mediante inyección intraperitoneal de 0,1 ml de la solución viral a una TCID₅₀ de 10⁴, en el caso de los rodaballos, mientras que en el caso de las truchas se realizó por inmersión durante 1 hora, en baño de agua suplementado con una solución de 10⁴ virus/ml. Los peces inoculados se mantuvieron a 15°C por un espacio de tiempo de 21 días, en el caso de los rodaballos, y de 28 días en el caso de las truchas. Como controles se emplearon 10 peces inoculados (en el caso de los rodaballos) o bañados (en el caso de las truchas) con medio de cultivo MEM. Los peces se alimentaron diariamente. En el caso de los tanques de rodaballo se mantuvo una salinidad próxima al 35 ‰.

Cinética de detección *in vivo* (fig. III.4).- A intervalos de 5 días se recogieron entre 5 y 10 individuos por cepa viral y se les extrajeron asépticamente diferentes órganos (bazo, riñón, cerebro, músculo e hígado), los cuales fueron procesados para diagnóstico virológico siguiendo el procedimiento descrito por Amos (1985) y modificado con posterioridad por Ledo y col. (1987) de la forma descrita en el apartado anterior. Con una alícuota de cada muestra se procedió a

aislamiento en cultivos celulares, y una segunda alícuota se procesó para detección por RT-PCR.

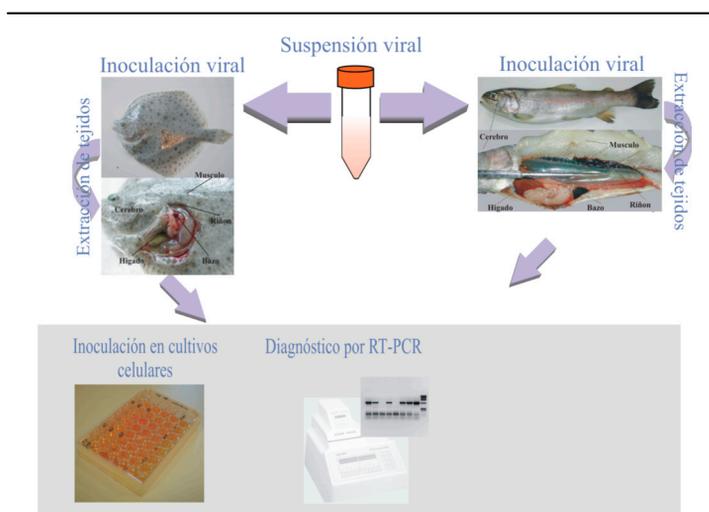


Figura III.4. Ensayo de cinética de IPNV en trucha arcoiris y rodaballo inoculado experimentalmente.

Para el aislamiento en cultivo celular se llevaron a cabo inoculaciones de células CHSE-214, haciéndose 4 réplicas de cada submuestra. Los cultivos infectados se incubaron un máximo de 15 días y se observaron diariamente con un microscopio óptico invertido Nikon Eclipse, modelo TE2000-U, en busca de efectos citopáticos característicos (ECP).

La aparición de ECP en dos pases consecutivos se consideró como confirmativo de la presencia de virus en la muestra. En todo caso se realizaron un máximo de 3 pases en la citada línea celular.

Para el diagnóstico por RT-PCR, se procedió a la extracción de RNA a partir de 250 µl de homogenado de tejido, empleando el sistema Proteinasa K/Fenol-Cloroformo como se describió anteriormente. Para la amplificación se

emplearon las parejas de cebadores IPNCP, IPNJav e IPNBA4, utilizando el sistema de RT-PCR *SuperScript™ II One-Step RT-PCR con Platinum® Taq* (Invitrogen).

Como confirmación se empleó la técnica de Southern blot e hibridación con sondas específicas marcadas con digoxigenina, como se ha indicado anteriormente.

Evaluación de la sensibilidad de la RT-PCR.- Para evaluar la sensibilidad de la RT-PCR, se realizaron diluciones decimales seriadas de una solución viral de IPNV Jasper desde una $TCID_{50} \text{ ml}^{-1}$ de 10^6 hasta 10^1 , por cuadruplicado, en solución Earle's. Al mismo tiempo se prepararon las mismas diluciones seriadas, también por cuadruplicado, utilizando un homogenado (licuado por congelación/descongelación) de bazo y riñón previamente testado libre de IPNV, e incubando estas diluciones durante 24 horas a 15°C ; En este caso, considerando que la densidad de estos tejidos fue de alrededor de 1,5 gr/ml, las concentraciones empleadas equivalieron $0,7 \times 10^6$ a $0,7 \times 10^1 \text{ TCID}_{50}\text{gr}^{-1}$. Una alícuota de 100 μl de cada una de estas diluciones seriadas se sometió a una extracción de RNA total utilizando el sistema *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), según descrito anteriormente, y el RNA se resuspendió finalmente en 80 μl de agua libre de nucleasas (Promega). Las distintas replicas de cada dilución se mezclaron con el fin de minimizar los posibles errores en la extracción. Finalmente, 8 μl de RNA extraído de cada dilución fueron sometidos a RT-PCR utilizando el sistema de Invitrogen *SuperScript™ II One-Step RT-PCR con Platinum® Taq*, y el resultado se visualizó mediante electroforesis.

Por otro lado se prepararon también diluciones seriadas de RNA viral obtenido a partir de la cepa de IPNV Jasper purificada, desde 16 ng hasta 0,006 fg, siendo estas cantidades de RNA sometidas a RT-PCR del mismo modo que

las diluciones anteriores, y visualizado el resultado de la amplificación de igual modo.

Para comparar los resultados obtenidos con los diferentes ensayos se utilizó la ecuación: $\gamma = \frac{n}{N} \cdot GL \cdot NcMw$, donde γ es la cantidad en gramos del RNA viral a partir del cual queremos conocer el título, n es el número de RNA genómicos correspondiente a un título viral conocido (se asume que TCID₅₀ corresponde a 1 partícula viral), N es el número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$), GL es la longitud del genoma (en pb), y $NcMw$ es el peso molecular medio estimado para cada par de ribonucleótidos (681 Da).

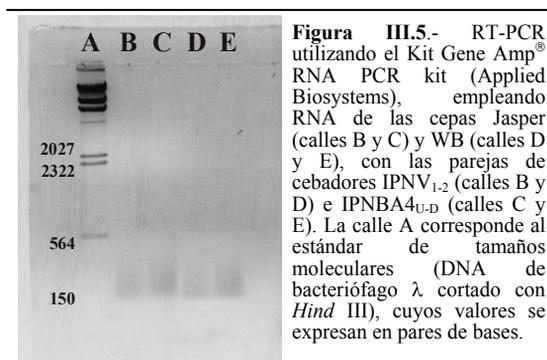
RESULTADOS.

Optimización de la RT-PCR *in vitro*.

Evaluación de sistemas comerciales de RT-PCR.

Gene Amp® RNA PCR Kit /RNA PCR Core Kit, Applied Biosystems.

Todos los intentos, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, fueron infructuosos, puesto que con ninguna de las dos parejas de cebadores ensayadas (IPNV₁₋₂ e IPNBA4_{U-D}) se obtuvo producto de RT-PCR (figura III.5).



Para determinar en cuál de las dos fases (RT o PCR) podría estar el punto crítico, se llevó a cabo un control de PCR empleando dos plásmidos obtenidos mediante clonación del genoma de la cepa WB de IPNV (Dopazo y col., 1994): el WB1 (plásmido pUC18 con un inserto de cDNA de IPNV de 812 pb, correspondiente a la región comprendida entre las bases 412 y 1222 del segmento A en la cepa Jasper, región que contiene las posiciones correspondientes a los cebadores IPNV₁₋₂) y el A4 (plásmido pUC18 con un inserto de 596 pb, de la base 37 a la 635 del segmento B de la cepa Jasper, región que contiene las posiciones correspondientes a los cebadores IPNBA4_{U-D}). Como se muestra en la figura III.6, en estos nuevos ensayos se obtuvieron bandas de amplificación específica en el PCR, del tamaño esperado para ambos plásmidos, mientras que en las reacciones de RT-PCR no se obtuvo banda alguna.



Figura III.6.- Control de la eficacia de la PCR empleando el Kit Gene Amp[®] RNA PCR kit (Applied Biosystems).- Se aplicó RT-PCR empleando RNA de la cepa Jasper de IPNV con las parejas de cebadores IPNV₁₋₂ (calle E) e IPNBA4_{U-D} (calle D), PCR utilizando el plásmido A4 con la pareja de cebadores IPNBA4_{U-D} (calle B) y PCR con el plásmido WB1 y los cebadores IPNV₁₋₂ (calle C). La calle A se corresponde al estándar de tamaños moleculares (DNA de fago λ cortado con *Hind* III), cuyos valores se expresan en pares de bases.

Experimentos para tratar de optimizar la reacción de transcriptasa inversa, utilizando diferentes concentraciones de MgCl₂ y variaciones en los tiempos y temperaturas de incubación, también dieron resultados infructuosos (resultados no mostrados). Se aumentó también la concentración de transcriptasa inversa de 2,5 a 5 U, obteniéndose el mismo resultado negativo (resultados no mostrados).

GeneAmp® Gold RNA PCR reagent Core kit, Applied Biosystems. Siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, los resultados no fueron los esperados, pues, con ninguna de las dos parejas de cebadores ensayadas se consiguió producto de amplificación de modo repetitivo (Figura III.7).

Al igual que en el caso anterior, se trató de determinar en cuál de las dos fases podría estar el punto crítico, para lo cual se llevó a cabo un control de PCR empleando los dos plásmidos utilizados en el caso anterior, obteniéndose también un resultado similar, con amplificación óptima en PCR, tal y como se puede observar en la figura III.7 (calles 5 y 6), mientras en las reacciones de RT-PCR solamente en ocasiones se obtuvo banda de amplificación específica.

Siguiendo el mismo planteamiento que en el método anterior, se trató de optimizar la reacción de transcriptasa inversa, utilizando diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y variaciones en los tiempos y temperaturas de incubación, obteniendo también resultados infructuosos. También se aumentó la concentración de transcriptasa inversa de 3 a 5 U, obteniéndose el mismo resultado negativo (resultados no mostrados).

PCR Reagent System, Invitrogen. Los ensayos iniciales, realizados siguiendo el protolo descrito por el fabricante, poco satisfactorios, obteniendo producto de RT-PCR sólo en pocas ocasiones, y con una baja reproducibilidad (resultado no mostrado).

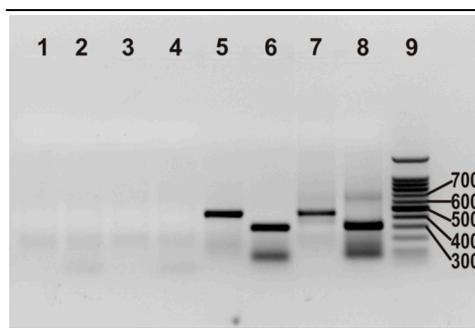
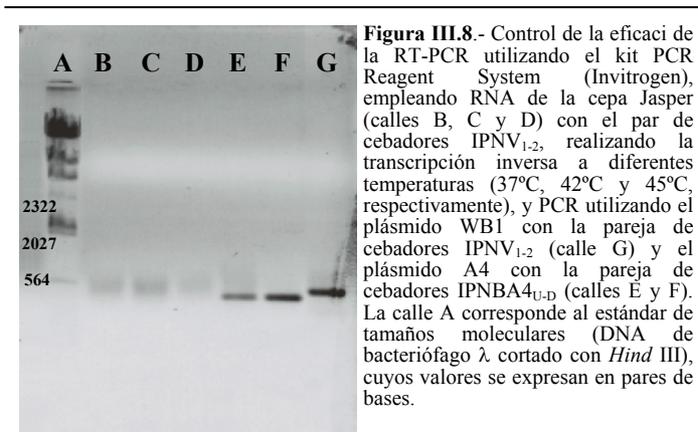
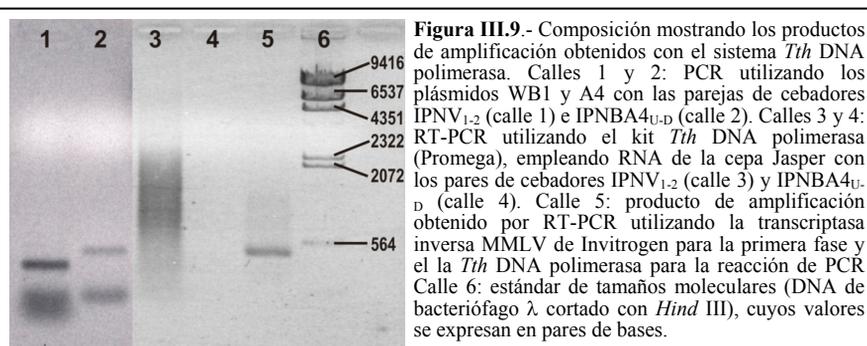


Figura III.7.- Control de la eficacia de la RT-PCR utilizando el kit Gene Amp® Gold PCR Core Kit (Applied Biosystem): RT-PCR empleando RNA de la cepa Jasper de IPNV con las parejas de cebadores IPNV₁₋₂ (calles 1, 3 y 7) e IPNBA_{4U-D} (calles 2, 4 y 8), PCR utilizando el plásmido A4 con la pareja de cebadores IPNBA_{4U-D} (calle 6) y PCR con el plásmido WB1 y los cebadores IPNV₁₋₂ (calle 5). En la calle 9 el estándar de tamaños moleculares BenchTop 100 bp DNA Ladder (Promega).

Al igual que anteriormente, se introdujeron controles de PCR constituidos por los plásmidos WB1 y A4, obteniéndose productos de PCR a partir de ambos plásmidos; así, como se observa en la figura III.8, se obtuvo un fragmento de alrededor de 440 pb con el plásmido WB1 y la pareja de cebadores IPNV₁₋₂, y de 304 pb con el clon A4 y los cebadores IPNBA4_{U-D}. De este resultado se dedujo que la fase crítica era la de la transcripción inversa, por lo que se intentó optimizar dicha fase cambiando los tiempos y las temperaturas de incubación (37, 42 y 45°C), sin embargo en ninguno de los casos se obtuvo amplificación (Figura III.8, calles B a D).



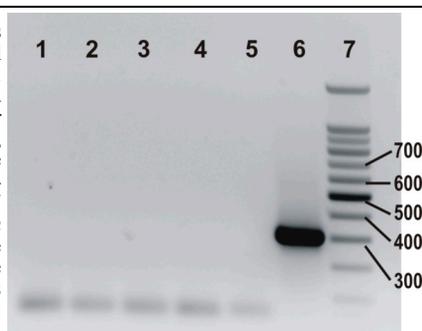
***Tth* DNA Polimerasa, Invitrogen.** Todos los ensayos realizados con este sistema, siguiendo la metodología recomendada por el fabricante, fueron inicialmente infructuosos, de forma que no se obtuvo producto de amplificación específica en ninguno de los ensayos, o se obtuvieron resultados muy dudosos (Fig III.9). Al igual que en los casos anteriores se utilizaron los plásmidos WB1 y A4 como controles de PCR, obteniendo producto de amplificación en ambos casos (figura III.9, calles 1 y 2).



Con la intención de optimizar la reacción de transcripción inversa, se llevaron a cabo diversos ensayos variando las condiciones iónicas de la reacción (a diferentes concentraciones de MnCl_2 : 0,8, 1,2, 1,5 mM); aunque en ningún caso se observó modificación alguna del resultado (Figura III.10).

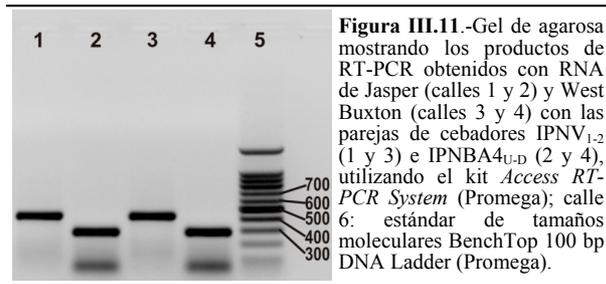
Ante la imposibilidad de optimizar el proceso con el kit del fabricante, se ensayó una modificación, introduciendo una transcriptasa inversa de otro fabricante, la reversotranscriptasa M-MLV de Invitrogen, utilizando como patrón RNA extraído a partir de la cepa WB de IPNV, con las parejas de cebadores IPNV₁₋₂ e IPNBA4_{U-D}; como se muestra en las figuras III.9 y 10, de

Figura III.10.- Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación obtenidos con el sistema *Tih* DNA polimerasa. Calles 1, 2 y 3: RT-PCR utilizando el kit *Tih* DNA polimerasa (Promega), empleando RNA de la cepa Jasper con el par de cebadores IPNBA4_{U-D} con 0,8, 1,2 y 1,5 mM de MnCl_2 , respectivamente. Calle 6: producto de amplificación obtenido por RT-PCR utilizando la transcriptasa inversa MMLV de Invitrogen para la primera fase y el la *Tih* DNA polimerasa para la reacción de PCR. Calle 7: estándar de tamaños moleculares (DNA de bacteriófago λ cortado con *Hind* III), cuyos valores se expresan en pares de bases.

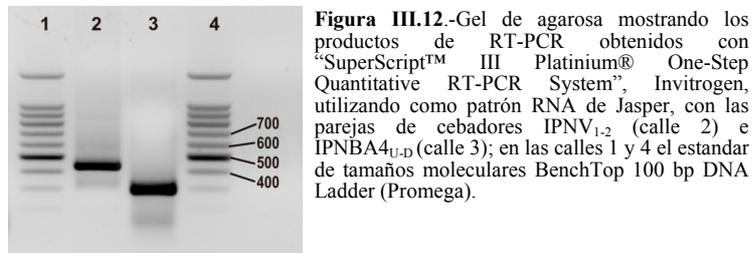


este modo se obtuvieron productos de RT-PCR perfectamente visualizables, lo que confirma la poca eficacia de la *Tih* DNA polimerasa como transcriptasa inversa.

Access RT-PCR System, Promega. El protocolo propuesto por el fabricante proporcionó resultados satisfactorios en los ensayos preliminares. Así, como se muestra en la figura III.11, la utilización de este kit permitió la obtención de un abundante producto de RT-PCR, utilizando RNA extraído de ambas cepas americanas (Jasper y WB), y con cualquiera de las dos parejas de cebadores ensayadas.



SuperScript™ II One-Step RT-PCR con Platinum® Taq y SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System, Invitrogen. Todos los ensayos realizados con estos dos sistemas fueron semejantes y totalmente satisfactorios. Así, como se muestra en la figura III.12, con ambas parejas de cebadores y con ambas cepas americanas del virus IPN (Jasper y WB) se obtuvieron intensas bandas de amplificación del producto de la RT-PCR, del tamaño de amplificación esperado, y con restos de bandeo residual mínimo o inexistente en la mayor parte de los ensayos.



Titan One Tube RT-PCR System, Roche Diagnostic GmbH. En este caso se pudo obtener producto de amplificación utilizando el protocolo recomendado por el fabricante, y con cualquiera de las dos cepas utilizadas para el ensayo (Figura III.13).

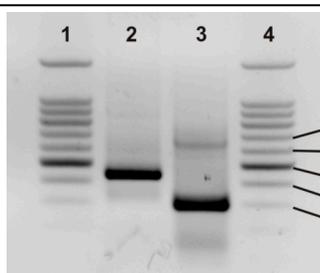


Figura III.13.-Gel de agarosa mostrando los productos de RT-PCR obtenidos utilizando el sistema Titan One Tube RT-PCR System, y empleando como patrón RNA de Jasper, con las parejas de cebadores IPNV₁₋₂ (calle 2) e IPNBA_{4U-D} (calle 3). En las calles 1 y 4, se muestra el estandar de tamaños moleculares BenchTop 100 bp DNA Ladder (Promega), cuyos valores se expresan en pares de bases.

SuperScript III Reversotranscriptasa. Se utilizó en combinación con dos sistemas de PCR, el **PCR Reagent System** (Invitrogen) y utilizando la **HotMaster™ Taq DNA polimerasa** (Eppendorf), indistintamente. La utilización de los protocolos descritos previamente dieron en todos los ensayos un resultado satisfactorio (figura III.14), obteniéndose bandas de amplificación específicas, claras y prácticamente sin bandeado residual, o bien con un bandeado mínimo.

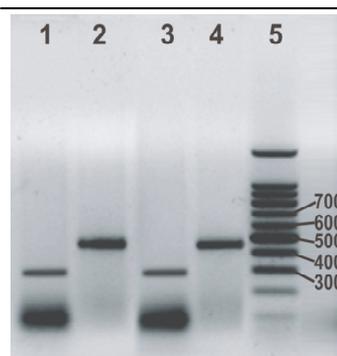


Figura III.14.-Gel de agarosa mostrando los productos de RT-PCR obtenidos utilizando en todos los casos como transcriptasa inversa el enzima “SuperScript™ III Reversotranscriptasa”, y empleando como patrón RNA de Jasper, con las parejas de cebadores IPNBA_{4U-D} (calles 1 y 3) e IPNV₁₋₂ (calles 2 y 4). En las calles 1 y 2 se utilizó para el PCR el sistema PCR Reagent System (Invitrogen), y en las calles 3 y 4 el sistema HotMaster™ Taq DNA polimerasa (Eppendorf). En la calle 5, se muestra el estandar de tamaños moleculares (expresados en pares de bases) BenchTop 100 bp DNA Ladder (Promega).

Evaluación de Cebadores.

Se ensayaron un total de 7 parejas de cebadores diseñadas para amplificar fragmentos específicos en los segmentos genómicos A y B, sobre un total de 20 cepas y aislados de IPNV.

Cebadores para el segmento A.- Solamente con dos de las parejas diseñadas para este segmento genómico, IPNJAV₁₋₂ (con un producto de amplificación de 607 pares de bases) e IPNCP₁₋₂ (con un producto de amplificación de 274 pares de bases), se obtuvo producto de RT-PCR específico con todas las cepas de referencia y aislados ensayados (Tabla III.4).

Con el resto de las parejas seleccionadas el resultado fue desigual. Así, con la pareja de cebadores IPN A₁₋₂, se obtuvo producto de amplificación específico (de 456 pares de bases) en 15 de las 20 cepas de virus IPNV analizadas; se obtuvo producto con todas las cepas de referencia exceptuando la cepa Te-2 (*Tellina virus*), y por otro lado, con 4 de los 11 aislados obtenidos en nuestra área geográfica no se obtuvo producto específico de amplificación con este par de cebadores. Con el par de cebadores IPNV₁₋₂ se obtuvo el correspondiente producto de amplificación de 440 pares de bases, con las cepas de origen americano (WB y Jasper) y canadiense (C1 y C2), y no se obtuvo producto específico en las cepas de referencia de origen europeo, así como con la mayoría de los aislados de nuestra zona. El resultado fue semejante con el par de cebadores IPN Lob₁₋₂, puesto que se sintetizó producto de amplificación específico de 247 pares de bases a partir RNA de cepas de referencia de origen americano y canadiense, no obteniéndose producto prácticamente con ninguna de las cepas de referencia de origen europeo, y solamente se obtuvo producto en unos pocos aislados gallegos: 152, 405, 2464 y 24R.

Cebadores correspondientes al segmento B.- Solamente con una de las parejas de cebadores diseñadas para este segmento, IPNBA4_{U-D} (producto de amplificación de 304 pares), se obtuvo producto de RT-PCR con todas las cepas y aislados ensayados; con la segunda pareja de cebadores, IPN B₁₋₂ (con un producto de amplificación de 790 pares de bases), se obtuvo resultado positivo sólo con las cepas de referencia Wb, Ab, Te-2 y He, y con 7 de los 11 aislados.

Tabla III.4.- Eficacia de 7 parejas de cebadores para amplificar RNA de 20 cepas de IPNV mediante RT-PCR.

Cepas		Pares de Cebadores						
		Segmento A				Segmento B		
		IPN A	IPNV	IPNJAV	IPNCP	IPN Lob	IPN B	IPNBA4
Cepas de referencia	WB	+	+	+	+	+	+	+
	Jasper	+	+	+	+	+	+	+
	Sp	+	-	+	+	-	-	+
	Ab	+	-	+	+	-	+	+
	Te-2	-	+	+	+	-	+/-	+
	He	+	-	+	+	+	+	+
	C1	+	+	+	+	-	-	+
	C2	+	+	+	+	+	-	+
	C3	+	-	+	+	+	-	+
Aislados gallegos	152	-	-	+	+	+	+	+
	533	+/-	-	+	+	-	-	+
	534	-	-	+	+	-	+	+
	578	+	-	+	+	-	+	+
	405	+	+	+	+	+	+	+
	2290	+	-	+	+	-	-	+
	2310	-	-	+	+	-	+	+
	2464	+	-	+	+	+	-	+
	88 R	-	+	+	+	-	+	+
	24 R	+	-	+	+	+	+	+
	24 f	+	-	+	+	-	+	+

+, producto de amplificación específico visualizable en geles de agarosa; - producto de amplificación no visualizable; +/-, resultado poco reproducible, o banda de amplificación de muy baja intensidad

Debe reseñarse que solamente con tres pares de cebadores, dos pertenecientes al segmento A (pares IPNCP y IPNJAV) y uno del segmento B (IPNBA4), obtuvimos producto de RT-PCR con todas las cepas y aislados ensayados. Por ello, estos cebadores fueron los seleccionados para experimentos subsiguientes.

Es necesario hacer notar también que, solamente con tres de las cepas y aislados seleccionados se obtuvo producto de RT-PCR con todos los pares de cebadores ensayados: concretamente las cepas Jasper y West Buxton y el aislado 405, sobre el cual hay fundadas sospechas de que podría tratarse de una cepa tipo Jasper (Cutrín y col, 2004).

Evaluación de la especificidad.

En ningún caso se obtuvo producto de amplificación cuando se aplicó RT-PCR a RNA extraído a partir de los virus VHSV e IHNV empleados como controles negativos, utilizando las parejas de cebadores IPNBA4, IPNJAV e IPNCP (Figura III.15.A).

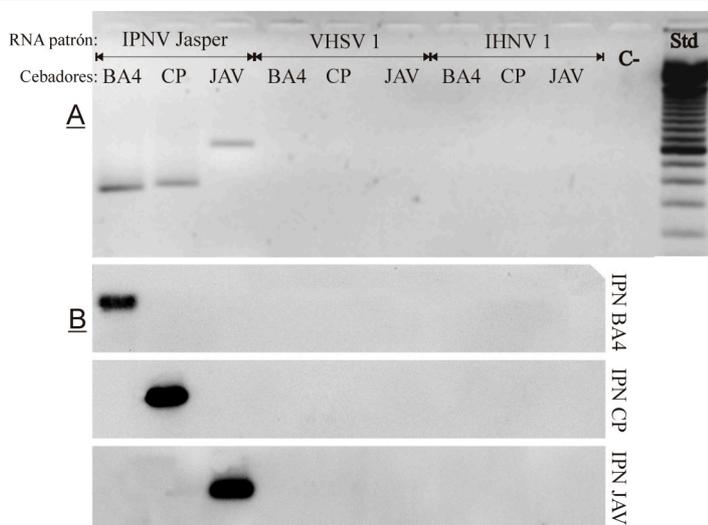


Figura III.15.-Gel de agarosa (A) mostrando los productos de RT-PCR obtenidos con “SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System” (Invitrogen), utilizando como patrón RNA de IPNV Jasper, VHSV e IHNV con las parejas de cebadores IPNV CP₁₋₂, IPNBA4_{U-D} e IPNJAV₁₋₂. C- control negativo (H₂O-NF) con las tres parejas de cebadores. Std estándar de tamaños moleculares 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). B: Southern blot e hibridación utilizando sondas específicas para los fragmentos de amplificación de IPNBA4, IPNCP e IPNJAV.

Por otro lado, la aplicación de Southern blot como método de confirmación de los resultado de los ensayos de RT-PCR nos ha permitido, a su vez, confirmar la especificidad de las parejas de cebadores ensayadas, puesto que en todos los casos se obtuvo la banda de amplificación específica esperada con los virus tipo IPNV ensayados, y nunca con otros virus (Fig III.15.B).

Evaluación de la sensibilidad: Cinética de detección *in vitro*.

El primer paso antes de entrar de lleno en los experimentos de cinética fue determinar la máxima MOI no detectable a tiempo “cero”, con el fin de evitar la obtención de resultados equívocos. Así, como se muestra en la figura III.16, la utilización de MOI superiores a 0,01-0,1 llevó a la obtención de producto de amplificación a tan solo 1 hora p.i, momento en el cual todavía no ha habido replicación del genoma. Por debajo de esta MOI no se obtuvieron resultados positivos, por lo que la MOI de elección para la inoculación en cultivos celulares en los experimentos de cinética fue la de 0,01-01.

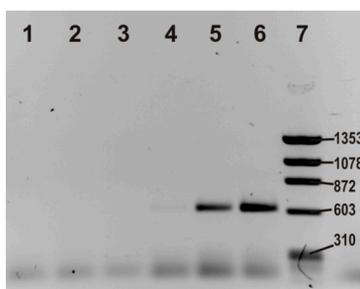


Figura III.16.- Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR (usando la pareja de cebadores IPNJAV₁₋₂), aplicado sobre RNA total extraído 1 h post-inoculación de células CHSE-214 con la cepa Jasper a MOI's 0,0001-0,001 (calle 1), 0,001-0,01 (calle 2), 0,01-0,1 (calle 3), 0,1-1 (calle 4), 1-10 (calle 5), 10-100 (calle 6). En la calle 7 se muestra el estándar de tamaños moleculares (ϕ X174 cortado con *Hae* III) cuyos valores se expresan en pares de bases.

Curva de replicación en cultivos celulares.

Como se puede ver en la figura III.17, las dos cepas utilizadas para este estudio mostraron un comportamiento similar, destacando una fase de latencia de 12 h, tras

la cual se detecta un rápido incremento exponencial del título viral (del orden de 7 puntos en el intervalo de 12 a 16 horas postinoculación), en ambos casos, tanto intracelular como extracelular. Es necesario hacer notar también un descenso acusado entre las 20 y 24 horas en ambos títulos, para luego remontar y adquirir otra vez niveles máximos a partir de las 72 horas.

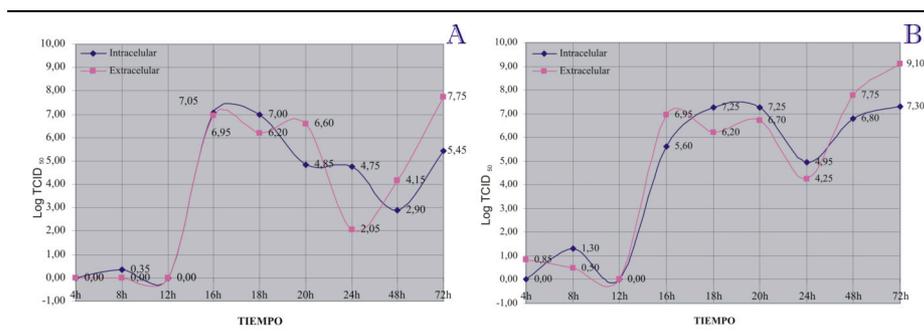


Figura III.17. Curva de replicación, en células CHSE-214, de las cepa Sp (A) y 405 (B).

Tiempo mínimo para detección viral en cultivos celulares mediante RT-PCR.

Los resultados de este estudio mostraron cinéticas de detección muy similares en ambas líneas celulares ensayadas (BF-2 y CHSE-214). En la línea BF-2 (Tabla III.5), por encima de las 14 h p.i., todas las parejas de cebadores ensayadas (IPNBA4, IPNJAV e IPNCP) permitieron la detección del RNA viral de todas las cepas y aislados ensayados, mientras que por debajo de las 8 horas no se detectó el RNA de ninguna de las cepas y con ninguna de las parejas de cebadores.

En el intervalo comprendido entre las 8 y 14 horas p.i. se obtuvieron resultados dispares en función de la cepa y los cebadores. Así, con IPNBA4, ya a las 10 h p.i. se detecta más del 90% de las cepas ensayadas (tabla III.5 y fig III.18), aunque este porcentaje no se mejora hasta las 14 h p.i. (100%); a diferencia de este resultado, los

cebadores IPNJAV detectaron el 100% de las cepas a las 12 h p.i., dando peores resultados a las 10 h (46,7%) y 8 h (80%) p.i. Sin embargo, los peores resultados se obtuvieron con los cebadores IPNCP, puesto que solamente detectó el 100% de las cepas por encima de las 16 h p. i.

Tabla III.5.- Cinética de detección, por RT-PCR, de RNA viral extraído a partir de células BF-2 inoculadas con cepas de virus IPNV.

		CEPAS DE IPNV															
		WB	Sp	Ab	Te-2	He	152	533	534	578	405	2310	2290	2464	24	Fo	88 R
24 h p.i.	CP ¹	² +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	JAV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16 h p.i.	CP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	JAV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14 h p.i.	CP	³ -	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
	JAV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12 h p.i.	CP	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	JAV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BA4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
10 h p.i.	CP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	JAV	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
	BA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8 h p.i.	CP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	JAV	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	BA4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
6 h p.i.	CP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	JAV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Parejas de cebadores: IPNCP₁₋₂ (CP), IPNBA4_{U-D} (BA4), IPNJAV₁₋₂ (JAV); ²Detectable mediante RT-PCR; ³No detectable mediante RT-PCR.

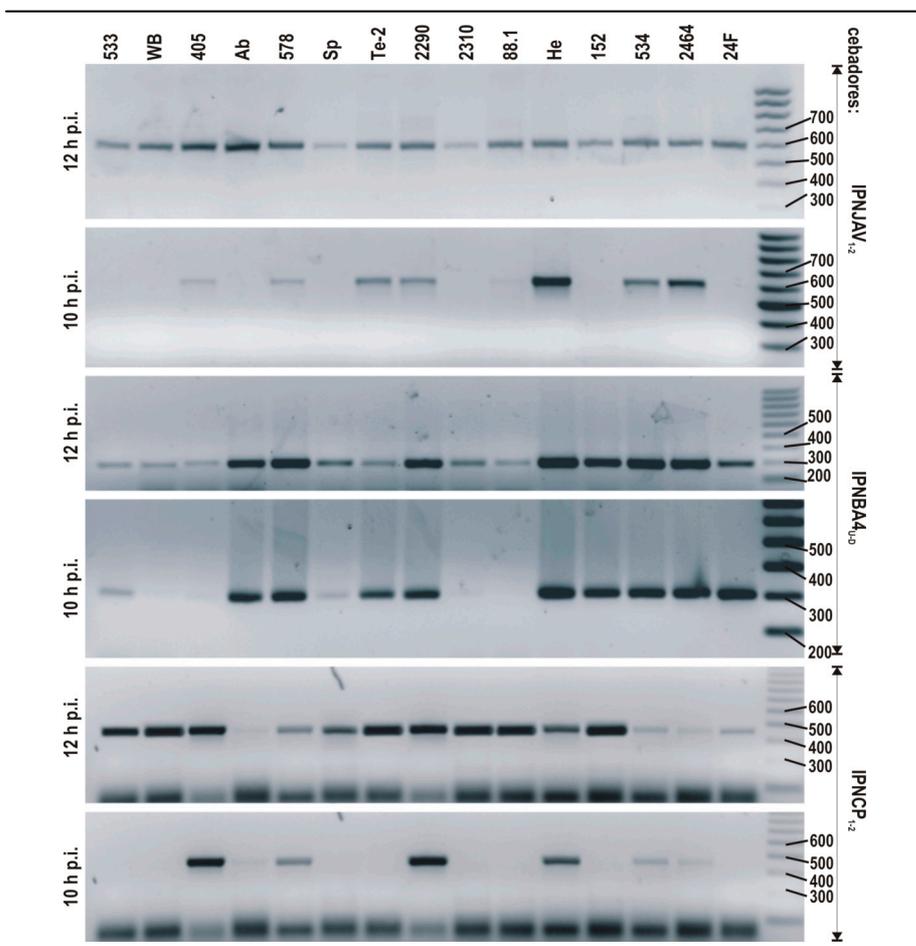


Figura III.18.- Electroforesis en geles de agarosa mostrando los productos de amplificación por RT-PCR (utilizando el sistema “SuperScript™ II One-Step RT-PCR with Platinum® Taq”, Invitrogen), obtenidos con las parejas de cebadores IPNJAV₁₋₂, IPNBA4_{U-D} e IPNCP₁₋₂, a distintos tiempos p.i. de células BF-2 con distintas cepas de IPNV.

En CHSE-214 (tabla III.6 y figura III.19) los resultados obtenidos en los experimentos de cinética muestran que a tiempos altos, por encima de las 10 horas p.i., las tres parejas de cebadores utilizadas permitieron la detección de RNA viral en células infectadas con cualquiera de las 15 cepas de IPNV seleccionadas.

Tabla III.6.- Cinética de detección, por RT-PCR, de RNA viral extraído a partir de células CHSE-214 inoculadas con cepas de virus IPNV.

		CEPAS DE IPNV														
		WB	Sp	Ab	Te-2	He	152	533	534	578	405	2310	2290	2464	24 f	88 R
24 h p.i.	CP ¹	² +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	JAV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16 h p.i.	CP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	JAV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14 h p.i.	CP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	JAV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12 h p.i.	CP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	JAV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 h p.i.	CP	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
	JAV	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
	BA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8 h p.i.	CP	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	JAV	³ -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 h p.i.	CP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	JAV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Parejas de cebadores: IPNCP₁₋₂ (CP), IPNBA_{4-U-D} (BA4), IPNJAV₁₋₂ (JAV); ²Detectable mediante RT-PCR; ³No detectable mediante RT-PCR.

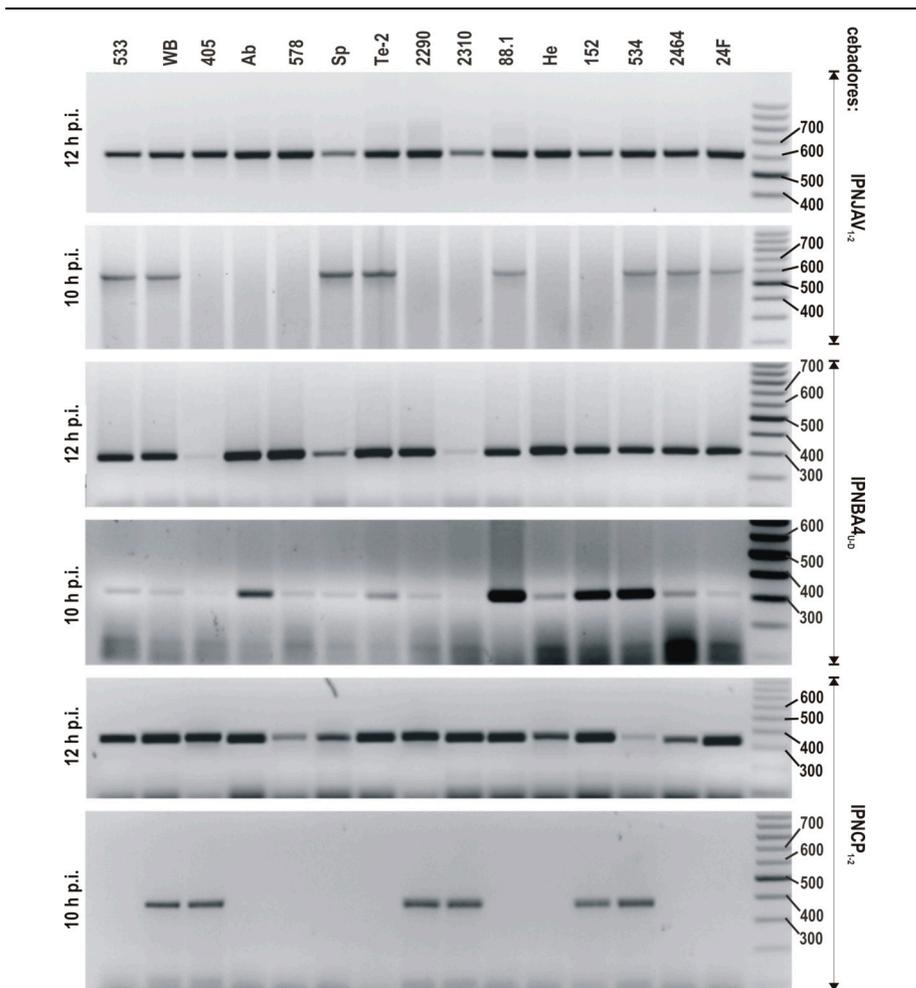


Figura III.19.- Electroforesis en geles de agarosa mostrando los productos de amplificación por RT-PCR (utilizando el sistema “SuperScript™ II One-Step RT-PCR with Platinum® Taq”, Invitrogen), obtenidos con las parejas de cebadores IPNJAV₁₋₂, IPNBA4_{U-D} e IPNCP₁₋₂, a distintos tiempos p.i. de células CHSE-214 con distintas cepas de IPNV.

Nuevamente la pareja de cebadores IPNBA4 aportó el mejor resultado, permitiendo la detección de todas las cepas ya a las 10 h p.i. (aunque presentando bandas débiles y/o poco definidas en algunos casos), mientras que a ese tiempo la capacidad de detección baja radicalmente en el caso de los pares de cebadores IPNCP₁₋₂ e IPNJAV₁₋₂, con un 40 y 50 % de resultados positivos, respectivamente.

Reduciendo el tiempo de infección a 8 horas, la capacidad de detección del RNA viral en células infectadas fue nula con las parejas de cebadores IPNJAV e IPNBA4; mientras que con la pareja de cebadores IPNCP se logró la detección en tan solo el 35 % de los casos. A las 6 h p.i. todas las parejas mostraron una nula capacidad de detección del RNA viral.

Optimización de la RT-PCR *in vivo*.

El control, mediante aislamiento en cultivos celulares y RT-PCR, del 10% de los individuos de cada lote de peces empleado en el presente estudio permitió confirmar que eran libres de virus tipo IPNV. Por otro lado, el resultado obtenido mediante inoculación en cultivos celulares fue desigual en las dos especies de peces utilizadas. En el caso de rodaballo, los peces se mostraron excepcionalmente sensibles al virus. Así, a partir de los 15 días de incubación se produjeron mortalidades masivas (100%), con una sintomatología no esperada para IPNV, consistente en hemorragias en la base de las aletas dorsales y en la zona ventral, en todos los peces. Un examen bacteriológico reveló que estos peces estaban infectados con *Vibrio anguillarum* serotipo II.

El virus se detectó en los tejidos de los peces a los 5 d p.i. Como se puede observar en la tabla III.7, en el caso de rodaballo, en la mayor parte de los lotes de órganos realizados a partir de peces infectados se obtuvo un resultado positivo en cuanto a aislamiento en cultivo celular, detectándose ECP tanto en el primer pase como en el segundo pase confirmativo, necesitándose en escasos casos un tercer pase (resultados no mostrados). Las cepas menos infectivas resultaron ser Jasper y 152, al menos en

términos de reaislamiento de virus, siendo WB, Sp y 533 los únicos reaislados en primer pase en hígado, bazo y riñón a todos los tiempos testados. El órgano diana más eficiente fue el hígado, seguido de bazo y riñón.

Tabla III.7.- Detección de virus IPNV por reaislamiento y RT-PCR en tejidos de rodaballo infectado experimentalmente.

		Cepas de IPNV utilizadas						
		WB	Jasper	He	Sp	152	533	
Tiempo de Incubación	5 días	Hígado	*+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+
		Riñón	+/+	-/+	+/-	+/+	-/-	+/+
		Bazo	+/+	-/+	+/+	+/+	+/-	+/-
		Cerebro	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+
		Músculo	-/+	-/+	+/-	+/+	+/+	+/-
	10 días	Hígado	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+
		Riñón	+/+	+/+	-/-	+/-	-/+	+/+
		Bazo	+/+	+/+	+/+	+/-	-/-	+/+
		Cerebro	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+
		Músculo	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+
	15 días	Hígado	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
		Riñón	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Bazo		+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	
Cerebro		+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	
Músculo		+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	

*Detección por aislamiento en cultivo celular/detección por RT-PCR utilizando la pareja de cebadores IPNBA4 (resultados extraídos de la tabla III.7); +, Aislamiento positivo en CHSE-214; -, Aislamiento negativo en CHSE-214.

En el caso de trucha arcoiris los resultados difirieron totalmente de los obtenidos en rodaballo. Solamente con 2 de las cepas (WB y Sp) se obtuvo reaislamiento tanto en el primer pase como en el segundo, y siempre en órganos muy específicos: riñón y bazo (tabla III.8).

En algunos casos se obtuvo algún positivo que luego no se pudo confirmar en sucesivos pases en la misma línea celular. Esto se dio en varios casos: WB (en hígado, cerebro y músculo de peces con 5 días de incubación, y en riñón de peces con 20 días de incubación), He (en cerebro de peces con 10 días de incubación) y 533 (en bazo de peces con 5 días de incubación).

En la tabla III.8 se resumen los resultados obtenidos en trucha arcoiris y, como se puede observar, solamente en dos de las cepas utilizadas en este estudio se consiguió un resultado positivo por inoculación en CHSE-214 (WB y Sp), y no en todos los órganos, demostrándose que el riñón y el bazo fueron los órganos más susceptibles a este tipo de análisis.

Tabla III.8- Detección por reaislamiento y RT-PCR de virus IPNV en tejidos de trucha arcoiris infectada experimentalmente.

		Cepas de IPNV utilizadas						
		WB	Jasper	He	Sp	152	533	
Tiempo de Incubación	5 días	Hígado	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+
		Riñón	+/+	-/-	-/+	+/-	-/+	-/-
		Bazo	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-
		Cerebro	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+
		Músculo	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-
	10 días	Hígado	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-
		Riñón	+/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-
		Bazo	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-
		Cerebro	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-
		Músculo	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-
	15 días	Hígado	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		Riñón	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		Bazo	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		Cerebro	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		Músculo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	20 días	Hígado	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		Riñón	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		Bazo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		Cerebro	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		Músculo	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-

*Detección por aislamiento en cultivo celular/detección por RT-PCR utilizando la pareja de cebadores IPNBA4 (resultados extraídos de la tabla III.8); +, Aislamiento positivo en CHSE-214; -, Aislamiento negativo en CHSE-214.

Detección mediante RT-PCR. La detección, mediante RT-PCR, de virus en tejidos de rodaballo infectados con IPNV proporcionó un primer resultado sorprendente, puesto que, como se muestra en la figura III.20, la pareja de cebadores IPNJAV no permitió obtener banda específica de amplificación (607

pb) en ninguno de los tiempos ensayados.

Con los otros dos pares de cebadores el resultado fue totalmente distinto. La pareja de cebadores IPNBA4 aportó la mayor capacidad de detección, superando el 87% de resultados positivos (en cuanto a tejidos y tiempos p.i.) en la mayor parte de las cepas ensayadas. Es importante destacar que la

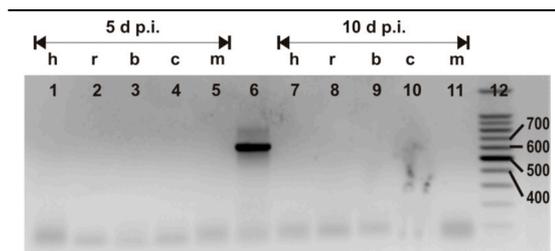


Fig III.20.- Detección, mediante RT-PCR usando las parejas de cebadores IPNJAV, de RNA de virus IPNV extraído a partir de tejidos de rodaballo (h: hígado, r: riñón, b: bazo, c: cerebro, m: músculo) infectado experimentalmente con IPNV WB, a las 5 y 10 h p.i. Calle 6: control positivo. Calle 12: estándar de tamaños moleculares BenchTop 100 bp DNA Ladder (Promega).

hibridación-Southern blot no solamente valió como técnica de confirmación del diagnóstico, sino que en numerosas ocasiones permitió amplificar la señal (Fig. III.21), lo cual implicó un aumento en el número de resultados positivos (tabla

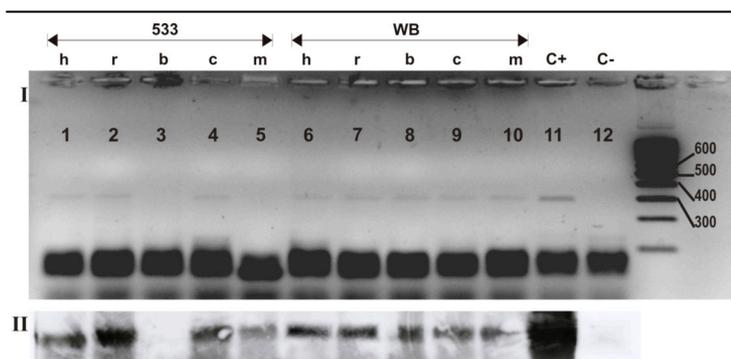


Fig III.21.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % mostrando los resultados obtenidos mediante RT-PCR (I) utilizando el par de cebadores IPNBA4, y posterior confirmación mediante Southern blot e hibridación con sondas específicas para este fragmento (II). Se utilizó el RNA obtenido a partir de homogenados de hígado (h), riñón (r), bazo (b), cerebro (c) y músculo (m), a 5 d p.i. de rodaballos infectados con las cepa 533 y WB. En las calles 11 y 12 se muestran los controles positivo (RNA extraído a partir de la cepa Jasper) y negativo (H₂O-NF). Como estándar de tamaños moleculares se empleó BenchTop 100 bp DNA Ladder (Promega).

III.9). La pareja IPNCP fue marcadamente inferior en la capacidad de detección, fundamentalmente con las cepas americanas WB y Jasper.

Tabla III.9.- Detección de IPNV por RT-PCR (confirmado mediante hibridación Southern blot) a partir de tejidos de rodaballo infectado experimentalmente.

		Cepas de IPNV utilizadas												
		WB		Jasper		He		Sp		152		533		
		BA4	CP	BA4	CP	BA4	CP	BA4	CP	BA4	CP	BA4	CP	
Tiempo de Incubación	5 días	Higado	+	-	-	-	+	- (+)	+	-	+	-	+	-
		Riñón	+	-	+	-	- (+)	- (+)	+	-	- (+)	-	+	-
		Bazo	+	+	+	-	+	-	+	-	- (+)	-	-	-
		Cerebro	+	-	- (+)	-	+	- (+)	+	-	+	-	+	-
		Músculo	+	- (+)	+	-	- (+)	- (+)	+	-	+	-	-	-
	10 días	Higado	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
		Riñón	+	-	+	-	- (+)	-	+	- (+)	+	+	+	-
		Bazo	+	-	+	-	+	+	- (+)	+	- (+)	-	+	+
		Cerebro	+	-	+	-	+	+	-	-	- (+)	-	+	+
		Músculo	+	-	+	-	- (+)	+	+	-	- (+)	-	+	-
	15 días	Higado	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
		Riñón	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
		Bazo	+	-	+	-	+	-	+	-	- (+)	-	+	-
		Cerebro	+	-	+	-	+	-	+	-	- (+)	-	+	-
		Músculo	+	-	+	-	-	-	+	-	- (+)	-	+	-

+, Existencia de amplificación específica; -, Ausencia de amplificación específica; entre paréntesis se muestran los resultados obtenidos en Southern blot cuando difirieron de los obtenidos en la RT-PCR.

Por tejidos, la mayor capacidad de detección la aportaron riñón y cerebro, detectándose las 6 cepas ensayadas (a los 3 tiempos) (tabla III.10); sin embargo es necesario hacer notar que, con el transcurso del tiempo p.i. todos los tejidos permitieron (ya a las 10 h p.i.) la detección de las 6 cepas de IPNV, aunque en algunos de los casos fue necesaria la confirmación por Southern blot. Nuevamente fue destacable la baja eficiencia de la pareja IPNCP

Los resultados obtenidos en trucha arcoiris difirieron de los obtenidos en rodaballo; de hecho, el primer resultado reseñable fue que en gran número de casos, el Southern blot permitió descubrir resultados positivos allí donde no parecía haber amplificación por RT-PCR (Fig III.22). En la tabla III.11 se puede observar que el nivel de detección viral utilizando la técnica de RT-PCR desciende drásticamente (comparado con los resultados obtenidos en rodaballo), siguiendo la línea marcada ya en los ensayos *in vitro*.

Tabla III.10.- Número de cepas de IPNV detectadas por RT-PCR (con cebadores IPNBA4 e IPNCP) en diversos tejidos de rodaballo infectado experimentalmente con las cepas de IPNV WB, Jasper, He, Sp, 152 o 533.

	días p.i.			
	5	10	15	
H	*5/1	6/4	6/1	17/6
R	6/1	6/2	6/0	18/3
B	5/1	6/3	6/0	17/4
C	6/1	6/2	6/0	18/3
M	5/2	6/1	6/0	17/3

*Se indica el número de cepas detectadas (de las 6 ensayadas) empleando las parejas de cebadores IPNBA4/IPNCP

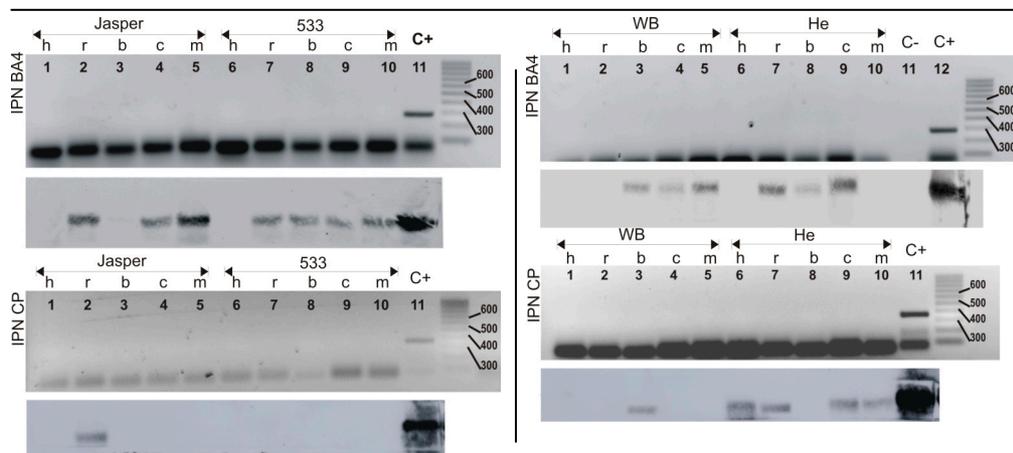


Fig III.22.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % mostrando los resultados obtenidos mediante RT-PCR utilizando los pares de cebadores IPNBA4 e IPNCP, y posterior confirmación mediante Southern blot e hibridación con sondas específicas. Se utilizó el RNA obtenido a partir de homogenados de hígado (h), riñón (r), bazo (b), cerebro (c) y músculo (m), a 15 d.p.i. de trucha arcoiris con las cepas Jasper, 533, WB y He. Calles 11 y 12: controles positivo (RNA extraído a partir de la cepa Jasper) y negativo (H₂O-NF), respectivamente. Como estándar de tamaños moleculares se empleó 100 bp DNA Ladder (Genecraft®).

Tabla III.11.- Detección de IPNV por RT-PCR (confirmado mediante hibridación Southern blot) a partir de tejidos de rodaballo infectado experimentalmente.

		Cepas de IPNV utilizadas												
		WB		Jasper		He		Sp		152		533		
		BA4	CP	BA4	CP	BA4	CP	BA4	CP	BA4	CP	BA4	CP	
Tiempo de Incubación	5 días	Hígado	+	-	+	-	+	-	- (+)	-	- (+)	-	+	- (+)
		Riñón	+	-	- (+)	-	+	-	- (+)	-	+	-	-	-
		Bazo	- (+)	-	- (+)	-	+	-	+	-	-	-	- (+)	-
		Cerebro	+	-	+	-	- (+)	-	+	-	+	-	+	-
		Músculo	+	-	+	- (+)	+	-	+	-	- (+)	-	-	-
	10 días	Hígado	- (+)	- (±)	- (+)	-	-	-	+	-	+	-	- (+)	- (+)
		Riñón	- (+)	-	- (+)	-	+	-	+	-	+	-	- (+)	-
		Bazo	-	- (±)	- (+)	-	- (+)	-	+	-	+	-	- (+)	- (+)
		Cerebro	- (+)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	- (+)	-
		Músculo	- (+)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	- (+)	-
	15 días	Hígado	-	-	-	-	-	- (+)	-	-	-	-	-	-
		Riñón	-	-	- (+)	- (+)	- (+)	- (+)	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-
		Bazo	- (+)	- (+)	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-
		Cerebro	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	- (+)	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-
		Músculo	- (+)	-	- (+)	-	-	- (+)	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-
	20 días	Hígado	-	-	-	-	- (+)	-	-	-	-	-	- (+)	-
		Riñón	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	- (+)	- (+)	-	- (+)	-
		Bazo	- (+)	-	- (+)	- (+)	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	- (+)
		Cerebro	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-
		Músculo	+	-	+	-	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-	- (+)	-

+, Existencia de amplificación específica; -, Ausencia de amplificación específica; entre paréntesis se muestran los resultados obtenidos en Southern blot cuando difirieron de los obtenidos en la RT-PCR.

De hecho la obtención de resultados positivos exclusivamente con RT-PCR (sin Southern blot) se circunscribió esencialmente a los menores tiempos p.i. (5 y 10 días p.i.); además, es necesario hacer notar que todos los resultados positivos se obtuvieron con el par de cebadores IPNBA4, no detectándose producto de amplificación con IPNCP. Es interesante resaltar que la capacidad de detección (con IPNBA4) se incrementó notablemente al emplear la confirmación con Southern blot (tabla III.12); incluso con la pareja de cebadores IPNCP las únicas detecciones fueron posibles tras la hibridación con la sonda específica.

Tabla III.12.- Número de cepas de IPNV detectadas por RT-PCR (con cebadores IPNBA4 e IPNCP) en diversos tejidos de trucha arcoiris infectado experimentalmente con las cepas de IPNV WB, Jasper, He, Sp, 152 o 533.

	días p.i.				% + SB*
	5	10	15	20	
H	6/1	5/2	0/1	2/0	61,5/100
R	5/0	6/0	5/2	6/1	72,7/100
B	5/0	5/2	6/1	6/2	81,8/100
C	6/0	5/0	6/1	6/0	68,1/100
M	5/1	5/0	5/1	6/0	54,5/100

Se indica el número de cepas detectadas (de las 6 ensayadas) empleando las parejas de cebadores IPNBA4/IPNCP; *, porcentaje de muestras positivas exclusivamente tras Southern blot.

En cuanto a la detección del RNA viral por tejidos, centrándonos en el caso del par de cebadores IPNBA4, el mejor fue el hígado, puesto que permitió la detección de todas las cepas en los primeros 5 d p.i, y necesitando de la amplificación de la señal con Southern blot en el 61,5% de los casos.

Límite de detección. El límite de detección de RNA viral, tanto a partir de suspensiones virales como de tejido infectado, utilizando el par de cebadores IPNBA4 con el sistema *SuperScript™ II One-Step RT-PCR con Platinum® Taq* (Invitrogen), fue al menos 10^1 TCID₅₀ ml⁻¹ (equivalente a $0,7 \times 10^1$ TCID₅₀ gr⁻¹, en el caso de tejido), lo cual, considerando la cantidad de RNA extraído usado en la PCR, corresponde a un límite absoluto de alrededor de 0,1 TCID₅₀ (figura III.23).

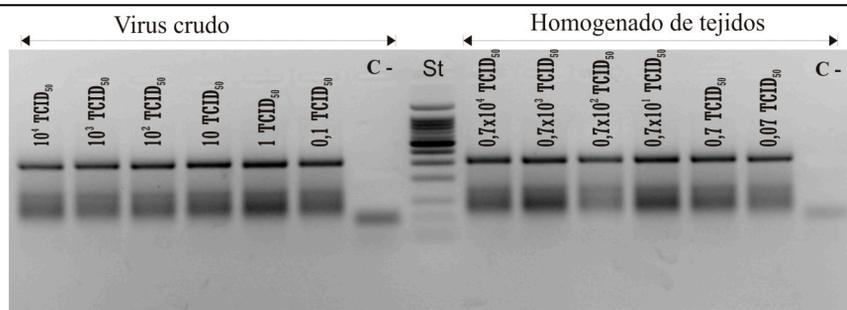


Fig III.23.- Límite de detección (en cantidades absolutas de virus) mediante RT-PCR [utilizando sistema *SuperScript™ II One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* (Invitrogen)] con el par de cebadores IPNBA4. Calles C-: control negativo de RT-PCR (H₂O-NF); calle St: estándar de tamaños moleculares BenchTop 100 bp DNA Ladder (Promega).

Por otro lado, cuando se utilizó RNA viral purificado, el límite de detección fue de 2 pg (figura III.24), correspondiente a 3×10^5 TCID₅₀, según la fórmula indicada en Materiales y Métodos; sin embargo con la aplicación de la técnica de Southern Blot e hibridación con la sonda *sJasperBA4*, específica para este fragmento amplificado con los cebadores IPNBA4, se consiguió rebajar el límite

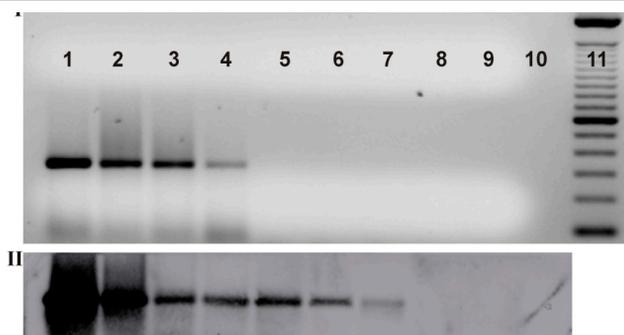


Fig III.24.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % mostrando los resultados obtenidos mediante RT-PCR [utilizando el sistema *SuperScript™ II One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* (Invitrogen)] con el par de cebadores IPNBA4 y diferentes cantidades de RNA viral (I), y posterior Southern blot e hibridación con la sonda *sJasperBA4* (II). En las calles 1 a 10 se muestran las diferentes concentraciones de RNA, correlativamente: 16 ng, 0,8 ng, 0,04 ng, 2 pg, 0,1 pg, 0,005 pg, 0,25 fg, 0,0125 fg, 6 atg, y 0,3 atg. Calle 11: estándar de tamaños moleculares BenchTop 100 bp DNA Ladder (Promega).

detección del orden de 10000 veces, hasta 0,25 fg (figura III.24.II), que equivaldría a 38 TCID₅₀.

DISCUSION.

Tradicionalmente han sido los métodos celulares y serológicos los más utilizados para el diagnóstico de las enfermedades virales en acuicultura y son, hoy en día, los oficialmente reconocidos para la detección de la mayoría de virus de peces (OIE, 2003). Estos métodos requieren del aislamiento previo del agente viral en cultivos celulares a partir de los tejidos de los animales infectados; proceso costoso, tanto económicamente como en cuanto al tiempo necesario para llevar a cabo el diagnóstico. Tras el aislamiento del agente viral, las técnicas serológicas se emplean para la identificación del mismo. Además estas técnicas también pueden ser aplicadas directamente sobre los tejidos infectados (Jørgensen, 1974; Ahne, 1981). No obstante, como ya ha sido puesto de manifiesto por otros autores (Dopazo y Barja, 2001), las técnicas serológicas pueden presentar problemas de reacciones cruzadas e inespecíficas, además de baja sensibilidad, debido a los problemas derivados de la fiabilidad y reproducibilidad de los anteriores, lo que hace que estos ensayos puedan en ocasiones proporcionar resultados no del todo resolutivos.

En las dos últimas décadas se ha comenzado a desarrollar una serie de técnicas moleculares para el diagnóstico, basadas en la detección del material genómico del virus, técnicas que están demostrando una alta sensibilidad y especificidad, al mismo tiempo que reducen en gran medida el tiempo necesario para el diagnóstico (Dopazo y Barja, 2001, 2002); por estas razones, estas nuevas metodologías han experimentado un gran empuje, como lo prueba la gran cantidad de publicaciones aparecidas en estos últimos años en esta línea (Arakawa y col., 1990; Rimstad y col., 1990; Nasser y col., 1991; Dopazo y col., 1994; López-Lastra y col., 1994; Saulnier y de Kinkeling, 1997;

Wang y col., 1997). Entre estas metodologías se encuentra la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, la más ampliamente utilizada debido a su gran sencillez, rapidez, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (Dopazo y Barja, 2001, 2002).

No obstante, la PCR puede ser una técnica de diagnóstico de gran fiabilidad sólo si previamente se ha llevado a cabo un correcto proceso de optimización en laboratorio con el fin de asegurar el cumplimiento de las 2 premisas. Este ha sido el objeto principal de este trabajo; para ello se ha llevado a cabo la evaluación, por un lado, de una serie de métodos comerciales de RT-PCR, y por otro, de una selección de cebadores con el objeto de probar su viabilidad para detectar el virus IPNV en cultivos celulares y en muestras tisulares. Asimismo, se ha llevado a cabo una evaluación de la sensibilidad de esta técnica para detección del virus en términos de límite de detección.

El primer resultado interesante deviene de la evaluación de los distintos métodos de RT-PCR. Así, los que han demostrado una mayor reproducibilidad han sido el *Access RT-PCR System* de Promega, el *Titan One Tube* de Roche, así como los sistemas basados en la transcriptasa inversa *SuperScript™: SuperScript™ II One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* y *SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System*. Todos ellos son sistemas de RT-PCR en un solo vial, sin reacciones parciales, lo que minimiza los riesgos de contaminaciones exteriores y manipulaciones deficientes de los distintos componentes; además, se puede constatar una evidente mejora en las prestaciones de la transcriptasa inversa de estos métodos con relación a los anteriores, lo cual revierte en una optimación del proceso de RT-PCR, especialmente en el caso de los sistemas *Superscript™*. Esto no implica que los demás métodos de RT-PCR no sean adecuados, sino que no se consiguió su optimación para detección del RNA viral de IPNV con los pares de cebadores empleados (concretamente los pares de cebadores IPNV₁₋₂ e IPNBA4_{U-D}); de hecho, algunos de estos han sido utilizados con éxito por

otros autores (Blake y col., 1995; Agnès y col., 1998; Grotmol y col., 2000; Munir y Kibenge, 2004).

La fiabilidad de la PCR depende también, y en gran medida, de la eficacia de los cebadores empleados. En nuestro caso, solamente 3 de las 7 parejas de cebadores evaluadas mostraron suficiente sensibilidad y reproducibilidad para poder ser empleadas de modo rutinario en el diagnóstico de este tipo de virus. Dos de esas parejas (IPNJAV e IPNCP) fueron seleccionados para el segmento A, comúnmente elegido como diana para el diagnóstico, mediante RT-PCR, de virus tipo IPNV (Blake y col., 1995; Rodríguez Saint-Jean y col., 2001); sin embargo la eficacia del par de cebadores IPNBA4 ha demostrado que no se debe descartar al segmento B como diana para la detección de estos virus. Los demás cebadores han tenido que ser desestimados por su alta especificidad para determinados tipos virales, o por su baja eficacia y reproducibilidad.

Diversos autores (McAllister y col., 1991; Blake y col., 1995; Taksdal y col., 2001) han indicado la posibilidad de la utilización de ensayos de RT-PCR para la detección de birnavirus acuáticos en cultivos celulares. La capacidad de detección viral en cultivos celulares a diferentes tiempos p.i. está influenciada por una serie de factores como el estado de la cepa viral, la línea celular empleada para la replicación, las condiciones de la misma, el estado de la célula y la edad del clon celular, entre otros. Además uno de los mayores condicionantes de la capacidad de aislamiento en cultivos celulares es la carga viral de la muestra problema, que a su vez depende del nivel de replicación viral en los tejidos del huésped y, por lo tanto, del estado fisiológico del hospedador, condiciones ambientales, nivel de estrés, etc. En este sentido, estudios realizados por diversos autores han revelado que la infección viral por IPNV puede mantenerse en niveles no detectables por aislamiento en cultivos celulares (Agius y col., 1982; Johansen y col., 1997; Taksdal y col., 1998). Algunos autores han publicado que un ciclo del virus IPNV puede durar unas 16 horas a 22°C (Dobos, 1995); más concretamente en CHSE-214 un ciclo completo puede llevar del orden de 24 horas a

15°C (Malsberger y Cerini, 1965; Wolf, 1988; Dobos, 1995); sin embargo, estos tiempos pueden variar dependiendo de la línea celular, de forma que diferentes infecciones del mismo virus pueden dar diferentes tiempos de ciclo replicativo (Villanueva y col., 2004). En los ensayos de cinética realizados en CHSE-214 en nuestro estudio, la producción viral, es decir, el final de la fase de latencia, se produjo a las 12 h p.i. a 15°C con todas las cepas, aunque se obtuvieron pequeños picos de producción a las 8 h p.i., alcanzando valores máximos de título viral a las 16 horas de incubación. En base a estos datos, se pensó que la detección de RNA viral podría realizarse mucho antes que la visualización de ECP. Por ello, utilizando las tres parejas preseleccionadas, se llevó a cabo la determinación del mínimo tiempo de incubación del virus en tapices celulares para detectar el virus IPNV. Otros autores, empleando pulsos de marcaje (Somogyi y Dobos, 1980) revelaron que la síntesis de RNA viral en cultivos celulares es máxima a las 8-10 horas a 15°C y decrece a las 14 horas. En nuestros experimentos de cinética no se logró detección de RNA viral antes de las 8 horas p.i. en ninguna de las dos líneas celulares utilizadas (BF-2 y CHSE-214); quizás por ello, el tiempo mínimo de detección observado fue de 8 horas p.i., aunque debemos decir que esto solamente ocurrió en algunos casos. De hecho, es a partir de las 12 horas p.i. cuando ya existen niveles de RNA viral suficientes para que los tres pares de cebadores (IPNCP₁₋₂, IPNJAV₁₋₂, IPNBA4_{U-D}) detecten la totalidad de las cepas de virus IPNV en esta línea celular. En la otra línea celular, BF-2, no se obtuvo un 100 % de detección con una de las parejas (IPNJAV) hasta pasadas las 12 horas p.i., y no se obtuvieron niveles suficientes de RNA para su detección con los tres pares de cebadores hasta pasadas las 16 horas p.i.. Un dato que queremos resaltar es la alta eficacia de detección obtenido a las 10 horas p.i. con la pareja de cebadores con diana en el segmento B; esto podría deberse a que la expresión más temprana del gen VP1 pueda acelerar el tiempo de detección viral.

Aunque el aislamiento viral en cultivos celulares es la técnica oficial para los organismos oficiales europeos, la detección directa en los tejidos de los peces infectados ha sido puesto en práctica, no solo mediante técnicas moleculares sino también por las

técnicas serológicas más tradicionales (Biering y Bergh, 1996; Rodríguez Saint-Jean y col., 2001). En este trabajo se ha aplicado la técnica de PCR para la detección directa en los tejidos de peces infectados. Para ello se emplearon dos especies de peces, una supuestamente huésped natural del virus, la trucha, y otra menos susceptible, el rodaballo. Por ello, los resultados obtenidos en los experimentos de detección *in vivo* no dejan de ser sorprendentes, por lo que deben de ser analizados más detenidamente. Así, nos encontramos con que la detección viral por PCR fue mucho más efectiva en los tejidos de rodaballo infectado que en trucha arcoiris, lo cual era de esperar a la vista de los elevados índices de mortalidad obtenida en rodaballo. Lo más probable es que estos resultados fuesen magnificados por el hecho que los rodaballos empleados eran portadores de *Vibrio anguillarum*, vibriosis que se convirtió en aguda en nuestras instalaciones, con lo que las condiciones del pez fueron óptimas para la proliferación del IPNV, tal y como demostraron los resultados obtenidos tanto por aislamiento en cultivo celular como en RT-PCR. Por otro lado, es de esperar que éstas sean las situaciones que se den en condiciones de explotación comercial. En trucha arcoiris, peces que mediante análisis bacteriológico y virológico se comprobó que estaban sanos, el resultado fue totalmente diferente: prácticamente no se detectó virus alguno por aislamiento en cultivo celular y en ningún momento mostraron los peces sintomatología clínica típica alguna. Sin embargo, la aplicación de la técnica de RT-PCR, sobre todo combinada con el Southern blot e hibridación con sondas específicas permitió la detección del RNA viral en prácticamente todos los tejidos analizados utilizando la pareja de cebadores IPNBA4.

La pareja de cebadores que en los ensayos *in vitro* demostró ser de las más eficaces (IPNJAV) fue, sin embargo, poco efectiva para la detección de RNA viral a partir de muestras titulares, fallando incluso con muestras que habían dado positivas por aislamiento en cultivo celular; ello puede ser debido a que este par de cebadores delimita un fragmento bastante grande en relación a los otros dos (de 604 pb), que los hace más susceptible de degradaciones e interferencias inhibitorias en la RT-PCR.

La aplicación de RT-PCR sobre tejidos infectados permitió la detección del virus al menos en aquellas muestras que habían dado positivo para aislamiento en cultivo celular, siendo los cebadores IPNBA4 los que aportaron mejores resultados en todos los análisis *in vivo*, pues permitieron la detección del virus en un mayor número de casos que por aislamiento. Especialmente en el caso de trucha arcoiris, en el que la infección por IPNV pasó de forma prácticamente no detectable por aislamiento en cultivo celular, debemos hacer reseñar que la detección del RNA viral se circunscribió a los 10 primeros días y solamente con el par de cebadores IPNBA4, pasando a continuación a niveles tan bajos en tejido que no fueron detectables por RT-PCR. La aplicación de Southern blot-hibridación permitió confirmar los resultados de RT-PCR. Esta posibilidad ya ha sido puesta de manifiesto por otros autores, lo que apoya la utilización de técnicas confirmativas (Southern blot, neste-PCR...) para poner de manifiesto falsos negativos en la aplicación de la técnica de RT-PCR directamente sobre tejidos (Lopez-Lastra y col., 1994; Taksdall y col., 2001). Además, en algunos casos logramos incrementar la señal en algunas muestras dudosas, e incluso incrementar el número de positivos, resultados similares a los recientemente publicados por López-Vázquez y col. (2005).

Blake y col., en 1995, describieron un protocolo de RT-PCR para el diagnóstico de birnavirus en el que afirmaba que las muestras positivas poseían una TCID₅₀ ml⁻¹ entre 10³ y 10^{5.5}. En 1998, Yoshinaka y col. encontraron el límite de detección en 10⁴ TCID₅₀ ml⁻¹, mientras que otros autores lo sitúan en 10³ (Rodríguez Saint-Jean y col., 2001). Otros estudios que han cuantificado la menor cantidad detectable de RNA necesaria para poder obtener un resultado positivo por RT-PCR la sitúan en 1 pg de RNA purificado (Lopez-Lastra y col., 1994), mientras que otros autores la sitúan en 15 fg (Wang y col., 1997). En un estudio reciente, López Vázquez y col. (2005) demostraron que el límite de detección podría bajar, para otro tipo viral (VHSV) hasta 0,1 fg. En nuestros ensayos para determinar la sensibilidad de esta técnica se abordaron diferentes aproximaciones experimentales, llegándose a un límite de detección tan solo 0,1 TCID₅₀, a partir de RNA extraído de diluciones seriadas de virus crudo, y de 0,07 TCID₅₀, con tejido

incubado durante 24 horas con una suspensión viral. Por otro lado los resultados de RT-PCR mostraron que, con el par de cebadores IPNBA4, la técnica fue lo suficientemente sensible para detectar 2 pg de RNA extraído a partir de virus purificado (3×10^5 virus), y que esta sensibilidad fue incrementada del orden de 10000 veces utilizando Southern blot e hibridación con la sonda de cDNA *sJasperBA4*, lo que nos colocaría en 38 genomas virales, es decir, en 38 partículas virales.

Es evidente la discrepancia obtenida entre los resultados de detección del RNA viral extraído a partir de virus crudo y tejido (0,1 TCID₅₀, que equivaldría a $6,6 \times 10^{-7}$ pg), y el obtenido a partir de una concentración de RNA conocida (2 pg, que equivaldría a 3×10^5 virus). Estos resultados parecen indicar que el asumir que 1 virus equivale a 1 TCID₅₀ es absolutamente erróneo. De hecho, algunos autores aducen que se debe titular por el método de recuento de placas de lisis (pfu), por aproximarse más al número real de partículas infectivas. En este sentido, aún teniendo en cuenta la conocida equivalencia de 1 TCID₅₀ a 1,44 pfu (Dulbecco y Ginsberg, 1988) los dos límites de detección seguirían siendo muy dispares. Todo ello nos hace pensar que existe una infraestimación de la concentración viral, ya que, entre otras causas, no contempla la posibilidad de existencia de partículas defectivas o variantes no infectivas del virus que sí podrían detectarse por PCR (Devold y col., 2000; Villanueva y col., 2001).

Finalmente debemos decir que el presente trabajo nos ha permitido poner a punto esta técnica para su utilización como método rutinario de diagnóstico en nuestro laboratorio, asegurando una detección extremadamente rápida, fundamentalmente en comparación con las metodologías previamente empleadas por el nuestro como por otros equipos, además de altamente específica y sensible, especialmente si se combina con Southern blot e hibridación con sondas de cDNA, lo cual es de enorme importancia si se precisa detectar portadores asintomáticos.

CAPITULO IV:

**Optimización y validación de la Hibridación
de Acidos Nucleicos para la detección
del virus IPNV.**

INTRODUCCIÓN.

En el diagnóstico molecular es, en la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la técnica por antonomasia debido a su alta sensibilidad y especificidad, así como por su repetibilidad y rapidez (Dopazo y Barja, 2001 y 2002). Si bien esta afirmación es cierta, esta técnica es de aplicabilidad sólo en laboratorios especializados, debido a la necesidad de un equipamiento costoso y de personal experimentado. Por ello, los pequeños laboratorios de muchas empresas de acuicultura precisan de otro tipo de técnicas de diagnóstico que les permitan, con la máxima fiabilidad, el diagnóstico a pie de planta de determinadas enfermedades de peces.

En este sentido, en las últimas décadas ha sido especialmente importante el desarrollo de las técnicas de inmuno-marcador, especialmente ELISA (Dixon y Hill, 1983; Sanz y Coll, 1992; Cifuentes y col., 1999), inmunofluorescencia (Swanson y Guillespie, 1981; LaPatra y col., 1988; Ortega y col., 1992; Rodríguez Saint-Jean y col., 2001; Espinoza y Kuznar, 2002), inmuno-dot o inmunoperoxidasa (Piper y col., 1973; LaPatra, 1996; Svenson y col; 1999; Rodríguez Saint-Jean y col., 2001) para el diagnóstico de virus de peces. No obstante, es necesario hacer notar que entre ellas, la única que no necesita de equipamiento específico es el inmuno-dot. Además, aunque ampliamente estandarizadas -e incluso comercializadas- estas técnicas presentan todos los problemas de sensibilidad, especificidad y repetibilidad que se asocian a la propia idiosincrasia de las técnicas serológicas (Dopazo y Barja, 2002).

En los años 90 surgió otra estrategia entre la línea de las técnicas moleculares; ésta consistió en la hibridación de ácido nucleicos (HAN). Trabajos, en aquellos momentos, tan novedosos como los de Rimstad y col. (1994) y Dopazo y col. (1994), así como los de Lee (1992) y Desselberger (1995), sirvieron para poner de manifiesto el enorme potencial que la HAN podría tener para la detección de virus de peces, demostrando que

esta técnica podría utilizarse de forma rutinaria en el diagnóstico de IPNV. Sin embargo hasta la actualidad, y aunque se trata de una técnica ampliamente utilizada en otros campos (Jiang y col., 1986; Welniki y Hiruki, 1992; Le Guyader y col., 1993; Wiedbrauk y Farkas, 1995), no ha cuajado en el diagnóstico en acuicultura.

Una de las razones, quizás la más importante, sea la naturaleza del marcaje de las sondas. Habitualmente se han utilizado sondas marcadas con isótopos radiactivos de distinta naturaleza (Dopazo y col., 1994; Rimstad y col., 1994). Este tipo de marcaje ha tenido tradicionalmente a su favor una alta sensibilidad frente a marcaje no radiactivo; sin embargo, necesita de unas altas medidas de seguridad, un aparataje específico y personal altamente cualificado, lo que imposibilitaría su utilización rutinaria en laboratorios de empresas de acuicultura. La utilización de sustratos quimioluminiscentes para la fosfatasa alcalina, que proporcionan fuertes señales de emisión, ha desembocado en una gran mejora, en cuanto a sensibilidad, de las técnicas de marcaje no radiactivo (Desselberger, 1995), eliminando por otro lado los inconvenientes de la utilización de sondas marcadas isotópicamente; esto posibilita la utilización de esta técnica de forma rutinaria, tanto en laboratorios de diagnóstico como en la propia empresa.

Otros inconvenientes de la HAN son los pobres niveles de sensibilidad obtenidos previamente por otros autores, así como los relativos largos tiempos p.i. necesarios para la detección del virus (Dopazo y Barja, 2002)

En el presente estudio, el objetivo fue llevar a cabo la optimización de esta metodología para lograr una mejor sensibilidad y especificidad y reducir el tiempo de diagnóstico, con el fin de que pudiese constituir una alternativa a la PCR como técnica de diagnóstico molecular de IPNV, tanto a partir de cultivos celulares como de peces infectados.

MATERIAL Y METODOS.

Cepas virales y propagación viral.

Para este estudio se utilizaron un total de 16 cepas virales de IPNV, 5 de referencia y 11 correspondientes a cepas de campo aisladas en nuestro laboratorio a partir de piscifactorías situadas en Galicia. La elección de estas 16 cepas de IPNV se hizo en base a la clasificación en patrones electroferotípicos realizada por Cutrín y col. (2004), como se indicó en el capítulo III.

Los aislados de campo seleccionados fueron los siguientes (tabla VI.1): 24Fo, 533, 405, 534, y 2464, de trucha arcoiris; 152 y 578, de rodaballo, y 2290 y 2310 de salmón;

Tabla IV.1.- Aislados de IPNV utilizados en este estudio.

Especie	Cepas Virales					
	Aislados de Galicia			Cepas de Referencia		
	Aislado	Grupo ¹	Fecha	Cepa	Grupo	Origen
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	24Fo	EG5	2/87	WB	EG2	U.S.A.
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	533	EG1	11/90	Sp	EG4	Dinamarca
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	405	EG2	6/90	Ab	EG3	Dinamarca
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	534	EG5	12/90			
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2464	EG6	4/94			
<i>Scophthalmus maximus</i>	152	EG5	6/88			
<i>Scophthalmus maximus</i>	578	EG3	2/91			
<i>Salmo salar</i>	2290	EG4	9/93			
<i>Salmo salar</i>	2310	EG4	10/93			
<i>Esox lucius</i>				He	EG5	Alemania
<i>Tellina tenuis</i>				Te-2	EG2	Escocia
<i>Crassostrea gigas</i>	88 R	EG4	10/91			
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	24 R	EG4	10/91			

¹Electroferogrupo, según establecido por Cutrín y col. (2004).

también se seleccionaron dos cepas aisladas a partir de reservorios, una de mejillón (88R) y otra de ostra (24R).

Además de estos aislados, y en función de su patrón electroferotípico, se seleccionaron las siguientes cepas de referencia: la cepa WB, aislada por Wolf en 1960, depositada en la ATCC con la referencia VR-877, aislada a partir de trucha arcoiris en U.S.A por Lientz y Springer en 1973, y considerada actualmente como la cepa tipo americana; las cepas Sp (VR-1318) y Ab (VR-1319) aisladas por Jørgensen y Brengballe (1969) y Jørgensen y Grauballe (1971), respectivamente, a partir de trucha arcoiris, y que son consideradas como los principales serotipos europeos; la cepa He, aislada por Ahne en 1978 a partir de carpa y lucio, y depositada en la ATCC como VR-1320, y por último Te-2, aislada a partir de *Tellina tenuis* por Hill (1976), y depositada en la ATCC como VR-1321.

Cultivo celular y propagación de virus.

Para este estudio se emplearon células de las líneas CHSE-214 (embrión de salmón chinook), BF-2 (pedúnculo de “bluegill”) y RTG-2 (gónada de trucha arcoiris). Las células se cultivaron con medio mínimo esencial de Eagle (MEM) suplementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) y con suero bobino fetal (FBS) al 10%; la temperatura de incubación fue de 15°C para CHSE-214 y RTG-2, y 20°C para BF-2. Con la confluencia, el medio de cultivo se sustituyó por MEM sin FBS y los tapices celulares se mantuvieron a 15°C.

Para la propagación viral, previo a la confluencia, los tapices se inocularon a una MOI de 0,1 y se incubaron con medio de mantenimiento a 15°C hasta el desarrollo de efecto citopático (ECP).

Una vez observado ECP se procedió a la realización de un segundo pase consecutivo, con el que se confirmó la aparición de ECP; cuando éste fue generalizado el virus crudo

se recogió en viales de criocongelación, se tituló como indicado en el capítulo II y se congeló a -80°C .

Extracción y purificación del RNA Viral.

El virus crudo procedente de un frasco de cultivo de 75 cm^2 con ECP generalizado se centrifugó a $2000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C . El sobrenadante se transfirió a un tubo de ultracentrífuga; el precipitado se resuspendió en 5 ml de tampón SSC 1X (NaCl 0,15 M; citrato sódico 0,015 M) y se sonicó (tres pulsos de 20 Kcal durante 20 seg) para asegurar la lisis celular, volviéndose a centrifugar a $2.000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C . Los dos sobrenadantes se mezclaron y se centrifugaron a $78.000 \times g$ durante 60 minutos a 4°C (rotor SW28.1, Beckman). El precipitado se resuspendió en 0.5 ml de tampón SSC 1X, se sonicó (tres pulsos de 20 Kcal durante 10 seg) para asegurar su total resuspensión y se depositó en un lecho de sacarosa al 35%, centrifugándose a $120.000 \times g$ durante 90 minutos a 4°C (rotor SW55Ti, Beckman). El precipitado se resuspendió en 200 μl de tampón SSC 1X.

Para la extracción del RNA viral, la anterior suspensión se trató con proteinasa K (2 mg/ml) y SDS (0,05 %) durante 1,5 a 4 horas a 37°C . A continuación se procedió a una extracción fenol:cloroformo, para lo cual se añadieron 2 volúmenes de la solución de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se mezcló vigorosamente; se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 10 minutos y la fase acuosa se transfirió a un nuevo vial, al que se le añadieron dos volúmenes de cloroformo:isoamílico (24:1); tras agitar y centrifugar de nuevo durante 5 minutos a $12.000 \times g$, se transfirió la fase acuosa a un nuevo vial. Seguidamente se aplicó una precipitación con etanol, para lo cual a la fase acuosa se le añadieron 3 volúmenes de etanol absoluto y acetato sódico a una concentración final de 0,3 M; tras 15 minutos a -20°C se centrifugó 30 minutos a $12.000 \times g$ a 4°C y el precipitado se lavó con etanol 70% para eliminar el exceso de sales; el precipitado final

se secó 5 minutos en un concentrador a vacío Speed-Vac (Savant) y se resuspendió en 50 µl de agua libre de de nucleasas (NF-H₂O).

La concentración del RNA se determinó en base a la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (teniendo en cuenta que para una $\lambda=1$ le corresponde una concentración de 50 µg/ml, si se considera el RNA bicatenal equivalente a DNA bicatenal). El ratio entre la absorbancia a 260 y 280 nm nos dio una estimación de la pureza: El RNA puro debe mostrar un ratio entre 1,7 y 2 se considera correspondiente a RNA altamente purificado (Ausubel y col., 1995). Para ello se utilizó un espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia Biotech).

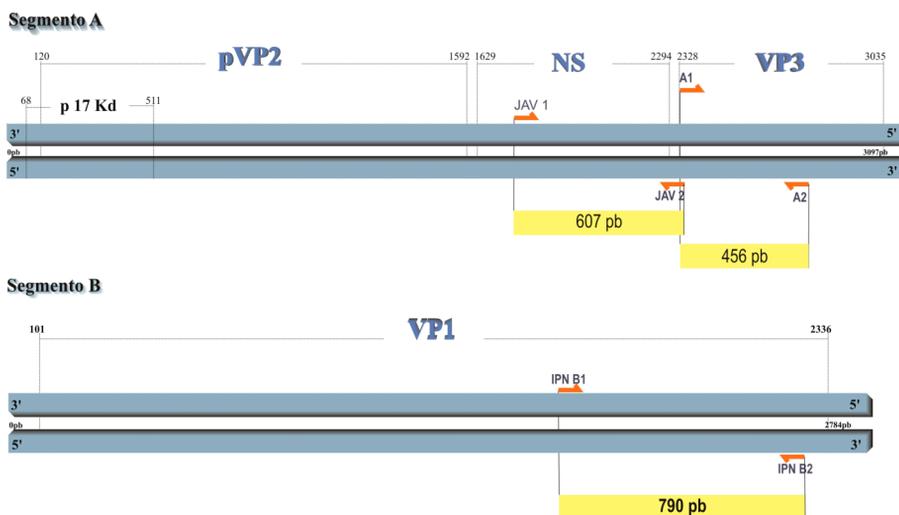
Obtención y purificación de las sondas de cDNA.

Para la obtención de las sondas específicas se empleó la técnica de RT-PCR, según lo descrito en el capítulo III, utilizando el sistema “*SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System*” (Invitrogen), y empleando los cebadores descritos en la tabla IV.2 y figura IV.1. Estos cebadores fueron diseñados previamente, empleando como referencia la cepa Jasper de IPNV, para ambos segmentos genómicos.

Tabla IV.2.- Cebadores utilizados para la síntesis de las sondas de cDNA, posiciones relativas y tamaño del producto de amplificación en el genoma de la cepa Jasper de IPNV.

Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Segmento	Posición	Tamaño de la sonda de cDNA
IPN A1	CAC CAT GGC CAG AGC AAA AGA	A	2327-2350	456 pb
IPN A2	TGG GGC AGG CCG TAG ACA CT	A	2776-2757	
IPNJAV ₁	GCA GTC ATC TTT CCT GTG GT	A	1737-1756	607 pb
IPNJAV ₂	TGG AGT TCT GGG TCC ATC CC	A	2344-2325	
IPNB1	AGC CGC CAA ATG GAG ATG TTG	B	1789-1769	790 pb
IPNB2	TGC GTG GGG GTC AGA GG	B	2559-2543	

Figura IV.1 Cebadores utilizados para la síntesis de las sondas de cDNA; posiciones relativas y producto de amplificación en el genoma de la cepa Jasper de IPNV



*Posiciones y tamaño de las sondas de cDNA sobre el genoma de la cepa Jasper de IPNV

Los productos de amplificación se visualizaron mediante transiluminador de luz ultravioleta en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml). Para la extracción de las bandas de amplificación a partir los geles de agarosa se utilizó el sistema “*Concert Gel Extraction System*” (Gibco-BRL). Brevemente: la banda de agarosa se cortó empleando un escalpelo, se transfirió a un vial eppendorf, se le añadieron 60 µl de tampón de solubilización por cada 10 mg de gel y se incubó a 50°C durante 15 minutos, mezclando por inversión cada 3 minutos. La suspensión solubilizada se transfirió a un “*spin cartridge*” (suministrado por el fabricante) y se centrifugó durante 1 min a 12.000 r.p.m. en una centrífuga eppendorf. El filtro se lavó con 700 µl de tampón de lavado L2, se incubó durante 1 min y se volvió a centrifugar como antes. El tubo de lavado del “*spin cartridge*” se sustituyó por un vial eppendorf estéril y se añadieron 50 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH

8,0) a 70°C, se incubó 1 min a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 2 minutos. Se midió la concentración de DNA eluido tal y como se ha descrito anteriormente y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Alternativamente también se utilizó el sistema *DNA Gel Extraction Kit*, (Millipore), para la extracción de DNA a partir de geles de agarosa, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente: las bandas de agarosa se cortaron utilizando un escalpelo y se introdujeron en las unidades de filtración (Figura IV.2)

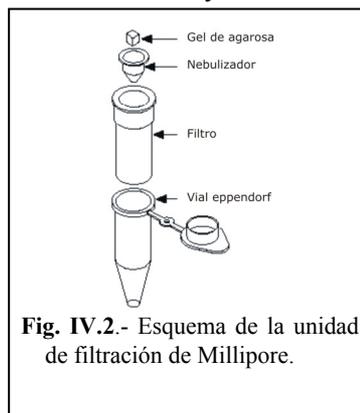


Fig. IV.2.- Esquema de la unidad de filtración de Millipore.

suministradas por el fabricante. A continuación se centrifugaron a $5000 \times g$ durante 10 minutos y el cDNA se recogió y se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

Marcaje de las sondas de cDNA.

Para el marcaje de las sondas de cDNA se emplearon dos sistemas, uno para marcaje radiactivo utilizando $\alpha^{32}P$ dCTP y otro de marcaje no radiactivo con digoxigenina. Para la denominación de las sondas se utilizó la siguiente nomenclatura: *s“Cepa”“Cebador”*, donde “cepa” es el nombre de la cepa de referencia usada como patrón, y “cebador” el nombre de la pareja de cebadores empleada para obtener la sonda.

Marcaje radiactivo. Para el marcaje radiactivo del cDNA se utilizó el sistema “*RediprimeTM II random prime labelling System*” (Amersham Pharmacia Biotech). Para ello, el cDNA se diluyó en tampón TE hasta una concentración de 25 ng/45 μ l, se incubó a 95°C durante 5 min y se transfirió inmediatamente a hielo durante 2 min. Una vez enfriada, se añadió toda la solución (45 μ l) al tubo de reacción (suministrado por el fabricante). A continuación se le añadieron 5 μ l de isótopo ($\alpha^{32}P$ dCTP, 10 μ Ci/ μ l) y se mezcló bien por pipeteado hasta homogenización, incubando durante 2

horas a temperatura ambiente. Finalmente la reacción se paró añadiendo 5 µl de EDTA 0,2 M y la sonda marcada se mantuvo congelada a -20°C hasta su uso.

Marcaje con digoxigenina (DIG). Como alternativa al marcaje con isótopos radiactivos, se utilizaron sondas de cDNA marcadas con digoxigenina (y posterior revelado con sustrato quimioluminiscente). Para ello, se utilizó el kit de marcaje no radiactivo “*DIG-High Prime*” (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente: 16 µl de una solución de 5 ng/µl de cDNA se incubaron a 95°C durante 5 min, a continuación se transfirieron a hielo durante 2 minutos, y se añadieron 4 µl de solución DIG-High Prime (Roche). Se incubó esta solución a 37°C durante 16 horas y a continuación se incubó a 65°C durante 10 minutos para detener la reacción. Las sondas marcadas se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Dot-Blot de las muestras problema.

Para los ensayos de hibridación se prepararon membranas de nylon Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech), incubándose en tampón SSC 1X durante 3 min; sobre ellas se cargaron, utilizando un sistema Minifold I, 50 ng de cada una de las muestras de RNA viral previamente desnaturalizado durante 10 min a 95-100°C e incubado

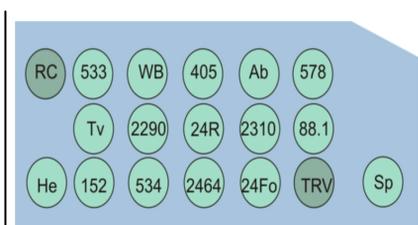


Fig. IV.3.- Representación esquemática de la distribución de cepas y controles en un blot de hibridación con la sonda específica para la cepa Sp. Como controles negativos: RNA extraído del aquareovirus del rodaballo (TRV) y RNA de células no infectadas (RC).

inmediatamente en hielo durante 2 min. Como controles negativos se utilizó RNA del aquareovirus del rodaballo (TRV) y RNA celular (RC). En la figura IV.3 se muestra una representación esquemática de la disposición de las muestras y controles utilizados. En cada uno de los blots, el control positivo se sacó fuera de las filas de cepas y aislados.

Una vez cargadas las muestras, el RNA se

fijó a las membranas aplicando luz ultravioleta y a continuación las membranas se secaron en un horno a 50°C durante 5 minutos. Finalmente se introdujeron en bolsas de sellado, y se mantuvieron en un lugar seco y en oscuridad hasta su uso.

Hibridación de ácidos nucleicos. Condiciones de hibridación.

Para determinar las condiciones de estringencia a las cuales se optimizaría la detección de las cepas y aislados de IPNV, se realizaron ensayos previos de hibridación (según indicado más adelante), ensayando 3 concentraciones de formamida. Para ello se prepararon tres membranas de dot-blot (de la forma indicada anteriormente en la figura IV.3), que se sometieron a hibridación con la sonda *sSpJav* (en la forma indicada a continuación), en condiciones de alta (50% de formamida; Hybrisol® I: Hybrisol® II, 1:0), media (35% de formamida; Hybrisol® I: Hybrisol® II, 7:3), y baja (0% de formamida; Hybrisol® I: Hybrisol® II, 0:1) estringencia.

Además, con el objeto de testar la diferencia en sensibilidad de ambos tipos de marcaje, se realizó un experimento previo basado en cargar en la membrana cantidades conocidas de RNA de IPNV (entre 100 ng y 3 ng) y someterlas a hibridación, con la sonda *sSpJav* con uno y otro método de la forma indicada en los apartados siguientes.

Hibridación con sondas de cDNA marcadas con $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP. Las membranas se incubaron en 5 ml de tampón de prehibridación Hybrisol® en el interior de bolsas de sellado, en un horno de hibridación a 45°C durante 1,5 horas; mientras, en un tubo estéril se prepararon otros 5 ml de Hybrisol®, a los que se le añadieron 10 μl de sonda previamente desnaturalizada a 100°C durante 5 min, e incubada en hielo durante 2 min, constituyendo la solución de hibridación. Tras la prehibridación se sustituyó el tampón de prehibridación de las bolsas de sellado por la solución de hibridación y se incubó durante al menos 4 horas en un horno de hibridación a una temperatura de 45°C. Una vez terminada la incubación se retiró el tampón de

hibridación y se procedió a lavar las membranas para eliminar el resto de sonda no incorporada, para ello se realizaron dos lavados, uno en una solución SSC 1X/SDS 0,1 % durante 1 hora a temperatura ambiente, y a continuación en una solución SSC 0,1X/SDS 0,1 %, durante 1h a 60°C. Tras los lavados, las membranas se colocaron en bolsas de sellado y se expusieron en oscuridad sobre una película autorradiográfica (SuperRX, Fujifilm).

Hibridación con sondas de cDNA marcadas con digoxigenina. La prehibridación e hibridación de las membranas se realizó del mismo modo que en el caso anterior, sin embargo, debido a la naturaleza de la sonda de cDNA y al tipo de revelado (quimioluminiscencia empleando como substrato CSPD, Roche), los lavados y tratamientos posteriores difieren. Una vez terminada la hibridación, los restos de sonda no incorporada se eliminaron en un primer lavado en SSC 2X, seguido de dos lavados consecutivos, de 15 minutos cada uno, el primero con una solución de SSC 2X/SDS 0,1% a temperatura ambiente, y un segundo con SSC 0,2X/SDS 0,1% a 60°C. A continuación las membranas se lavaron con una nueva “solución de lavado” (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5; con un 0,3% de Tween 20) durante 1 min, y se incubó en la misma solución suplementada con un 1,5% de “reactivo bloqueante” (Boehringer Mannheim, ref. 1 175041) durante 30 minutos. Inmediatamente se retiró la solución de bloqueo y se sustituyó por otra con el anticuerpo conjugado Anti-DIG-AP (Anti-Digoxigenina fosfatasa alcalina 1:10000 en solución de lavado), durante 30 min. A continuación se realizaron dos lavados consecutivos de 15 minutos cada uno en *solución de lavado*, para eliminar los restos de anticuerpo no incorporados. Las membranas se trataron brevemente con tampón fosfatasa (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM; pH 9,5) y se incubaron con el substrato quimioluminiscente CSPD (Boehringer Mannheim) diluido 1:100 en tampón fosfatasa a temperatura ambiente, oscuridad y agitación. Una vez terminado este periodo de incubación, se secó la membrana sobre un papel de filtro, dejándola ligeramente húmeda, y se introdujo en una bolsa sellada, incubándose a 37°C durante

15 minutos en oscuridad. A continuación se expuso a una película autorradiográfica durante 30-40 min.

Análisis de las placas autorradiográficas.

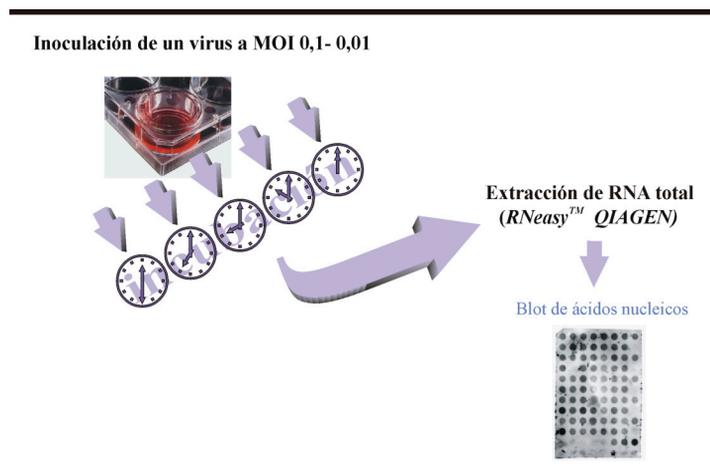
Las impresiones autorradiográficas se analizaron mediante el software *ID Manager* de T.D.I., cuantificando la intensidad de cada una de las motas de color y restando los valores obtenidos con los controles negativos. Solamente se consideraron positivas aquellas motas que presentaron una intensidad mínima superior al 50 % de la obtenida en el control positivo.

Experimentos de cinética de detección.

Este experimento se realizó para determinar el mínimo tiempo y la mínima cantidad de título viral necesario para detectar el virus mediante hibridación de ácidos nucleicos tanto en cultivos celulares (*in vitro*) como en peces inoculados (*in vivo*).

Ensayos *in vitro* (figura IV.4). Cultivos celulares confluentes de células CHSE-214 y BF-2 fueron inoculados (previo vaciado del medio de cultivo) con una solución viral a una MOI de 0,01-0,1 en placas de cultivo celular de pocillos de 11 cm². Tras una hora de adsorción (tiempo en el que la práctica totalidad del virus ha penetrado en el interior de la célula; Lidgerding, 1981) a temperatura ambiente, el medio de inoculación fue sustituido por otro de mantenimiento y las placas se incubaron a 15°C. A las 4, 8, 10, 12, 14 y 16 horas de incubación se retiró todo el medio de mantenimiento, los tapices celulares se lavaron dos veces con tampón Earle's y se realizó una extracción del RNA total utilizando el sistema RNeasy[®] Mini Kit (Quiagen) (como indicado por el fabricante). Finalmente el RNA se eluyó en 50 µl de agua libre de nucleasas y fue almacenado a -20° C hasta su utilización.

Figura IV.4.- Protocolo de los experimentos de cinética *in vitro*.



El RNA extraído se desnaturalizó, y se cargó en una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech), según indicado anteriormente, y se hibridó utilizando la sonda de cDNA que mejores resultados había mostrado en los ensayos de evaluación tal y como se ha descrito anteriormente.

Ensayos *in vivo*. Para este ensayo se utilizaron dos especies de peces: rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con un peso entre 7 y 10 g; fueron inoculados un número de 40 individuos (de cada especie y por cada cepa viral) con una solución viral (entre 10^3 y 10^4 de TCID₅₀ ml⁻¹) de distintos aislados y cepas de IPNV (He, 152, 533 y WB). A intervalos de 5 días se recogieron entre 5 y 10 individuos por cepa viral, se les extrajeron diferentes órganos (bazo, riñón, cerebro, músculo e hígado) y fueron procesados individualmente como indicado en el capítulo anterior (Figura IV.5). Una alícuota de 100 µl de la suspensión viral resultante fue inoculada en cultivos celulares de CHSE-214, una segunda alícuota de 250 µl fue sometida a extracción total de RNA utilizando el método de Proteinasas K/Fenol-Cloroformo descrito en el capítulo II. El RNA se

cargó en una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech), y se sometió a hibridación como se ha descrito anteriormente.

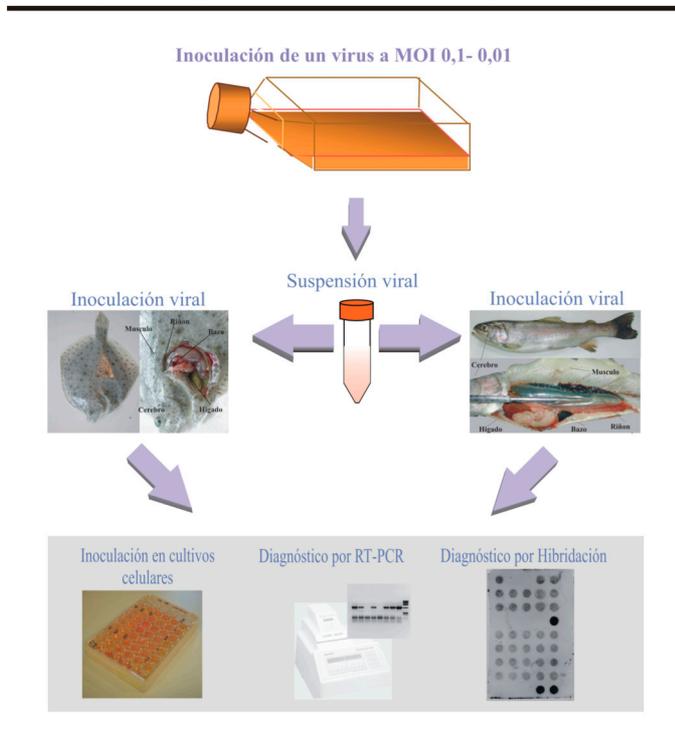


Figura IV.5. Ensayo de detección *in vivo* realizado sobre trucha arcoiris y rodaballo.

Las impresiones autorradiográficas se analizaron mediante el software *ID Manager* de T.D.I., de forma ya descrita anteriormente, y solamente fueron considerados positivas aquellas motas que superasen el 50% de la intensidad obtenida para el control positivo (25 ng de RNA de la cepa Jasper).

Evaluación de la sensibilidad. La medición de la sensibilidad de la técnica de HAN se realizó en dos grupos de experimentos; uno para determinar la capacidad de

detección de RNA viral en virus crudo y otro sobre tejidos infectados. En ambos casos se utilizó la cepa Jasper de IPNV.

- i. Para la determinación del nivel de sensibilidad en virus crudo, se realizaron diluciones decimales seriadas del virus desde 10^6 hasta 10^0 TCID₅₀ ml⁻¹, por cuadruplicado, en solución Earle's.
- ii. Para la evaluación de la detección en tejidos, se prepararon homogenados de tejidos de bazo y riñón (previamente testado libre de IPNV) mediante congelación y descongelación; en este caso las diluciones seriadas se prepararon sobre el homogenado, asegurando la mezcla mediante repetido pipeteado y agitación vigorosa, y estas diluciones se incubaron durante 24 h a 15°C.

Una alícuota de 100 µl de cada una de estas diluciones seriadas se sometió a extracción de RNA total utilizando el sistema *RNeasy Mini Kit* (Quiagen) (como indicado por el fabricante), y el RNA se resuspendió finalmente en 80 µl de NF-H₂O (Promega). El RNA obtenido de cada una de las 4 replicas de cada dilución se mezcló con el fin de minimizar los posibles errores de desviación cuantitativa en la extracción. Finalmente 50 µl de cada dilución se cargaron en una membrana Hybond N+ y se aplicó hibridación con sondas de cDNA, según indicado anteriormente.

Para la determinación de la sensibilidad de detección de RNA a partir de virus purificado, se empleó la cepa Sp de IPNV, purificada según indicado en el capítulo III. El RNA se extrajo mediante el método ProteinasasK/Fenol-Cloroformo, según indicado anteriormente, y cantidades definidas de RNA purificado (entre 100 ng y 10 pg) se cargaron en una membrana Hybond N+ y se sometieron a hibridación con la sonda *sSpJav*, como indicado anteriormente.

Para comparar los resultados obtenidos con los diferentes ensayos, se utilizó la ecuación $\gamma = \frac{n}{N} \cdot GL \cdot NcMw$, donde γ es la cantidad, en gramos, del RNA viral a

partir del cual queremos conocer el título, n es el número de RNA genómicos correspondiente a un título viral conocido (se asume que una TCID₅₀ corresponde a 1 partícula viral), N es el número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$), GL es la longitud del genoma (en nº de nucleótidos), y $NcMw$ es el peso molecular medio estimado para cada par de ribonucleótidos (681 Da).

RESULTADOS

Sondas de cDNA.

No todas las sondas previstas para los ensayos han estado disponibles, debido a la imposibilidad de obtener productos de amplificación específicos, al menos en cantidad suficiente. Concretamente, como se observa en la tabla IV.3 con la pareja IPNA₁₋₂ no se obtuvo producto de amplificación (y por lo tanto tampoco sonda) con los aislados 152, 534, 2310 y 88R, y tampoco empleando IPNB₁₋₂ con los aislados 2290 y 88R; por otro lado, con la pareja de cebadores IPNJAV₁₋₂ se obtuvo producto de amplificación (y sondas) con todas las cepas y aislados.

Tabla IV.3.- Sondas de cDNA disponibles a partir de los productos de amplificación obtenidos.

	Cepa viral															
	Sp	He	533	Te-2	152	WB	2290	534	405	24R	2464	Ab	2310	24Fo	578	88.1
IPNJAV₁₋₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IPN A₁₋₂	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
IPNB₁₋₂	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Tras la electroforesis de los productos de amplificación, se procedió a la extracción a partir de agarosa tal y como se ha descrito anteriormente. Con todos los productos de amplificación obtenidos se obtuvo sonda de cDNA marcada.

Evaluación inicial de las condiciones de hibridación

Condiciones de estringencia. Como puede observarse en la figura IV.6, las diferentes condiciones de estringencia ensayadas no mostraron las esperadas diferencias en cuanto a intensidad de señal de hibridación. Así, en las condiciones de estringencia ensayadas se obtuvieron resultados similares, aunque es necesario hacer notar que en condiciones de media estringencia se observaron mayores intensidades de hibridación. Como se observa en la figura, no se obtuvo señal de hibridación con la cepa 2310, como se confirmó con el software *ID Manager* (T.D.I.).

En base a este resultado se optó por utilizar las condiciones más restrictivas

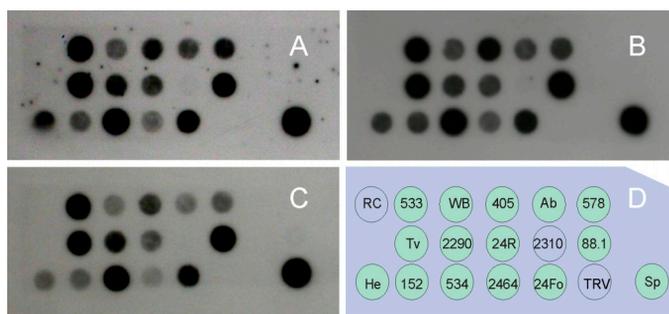


Fig IV.6- Blots de hibridación obtenidos con la sonda *sSpJav* y diferentes cepas y aislados de IPNV, en condiciones de alta, media y baja estringencia (blots A, B, y C, respectivamente). D muestra la disposición de las muestras de RNA viral y los controles negativos (RC y TRV) y positivos (Sp); las muestras sin color corresponden a las consideradas como negativas empleando el software *ID Manager* de T.D.I.

posibles, o lo que es lo mismo utilizando como tampón de prehibridación e hibridación el Hybrisol® I (con un 50 % de formamida).

Selección del tipo de marcaje. Con el fin de optimizar la detección del RNA viral, se llevó a cabo una evaluación de la diferencia de capacidad de detección entre sondas radiactivas y no radiactivas. En la figura IV.7 se muestran los resultados de hibridación obtenidos con ambos sistemas, donde se aprecian diferencias mínimas, no significativas, entre ambas sondas.

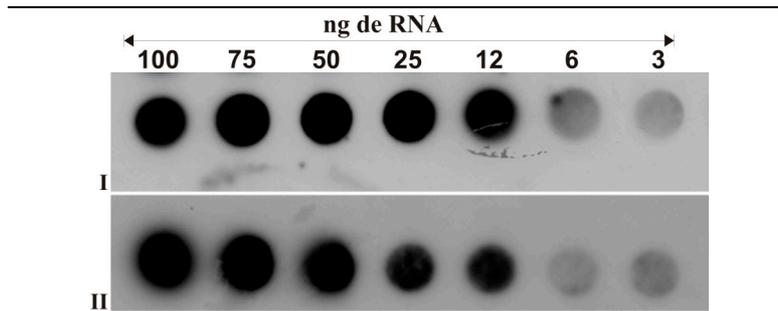


Figura IV.7. Resultados obtenidos en la comparación entre hibridación con sondas no radiactivas (I, utilizando la sonda *sHeA*, marcada con digoxigenina) y con sondas radiactivas (II, utilizando la sonda *sHeA* marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP) sobre cantidades decrecientes de RNA de virus purificado (IPNV de la cepa He) (de izquierda a derecha, 100, 75, 50, 25, 12, 6, y 3 ng).

Evaluación de las sondas de cDNA: especificidad para la detección de RNA de IPNV

Límite de detección. Como se muestra en la figura IV.8 cuando la evaluación de la sensibilidad se determino empleando RNA extraído de virus purificado el límite de detección se situó en 0,1 ng. En los ensayos realizados con cultivos celulares, el límite estuvo en 10^0 TCID₅₀, resultado similar al obtenido en tejidos infectados (figura IV.9).

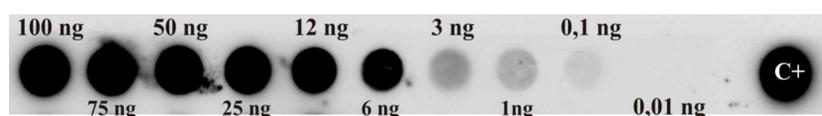


Fig. IV.8- Limite de detección, mediante hibridación de ácidos nucleicos utilizando la sonda *sHeA* marcada con digoxigenina, de RNA purificado a partir de la cepa Jasper de IPNV. Control positivo: 300 ng de RNA de la cepa Jasper de IPNV.

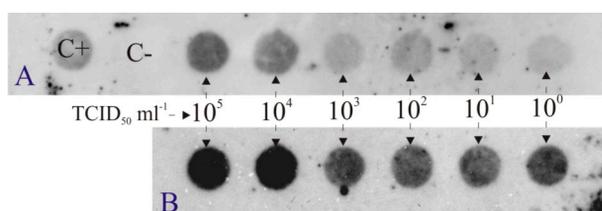


Fig. IV.9- Limite de detección de virus tipo IPNV mediante hibridación de ácidos nucleicos utilizando la sonda *sHeA* marcada con digoxigenina. El RNA fue extraído a partir de diluciones decimales seriadas de la cepa Jasper de IPNV en tampón Earle's (A), y en homogenado de tejido (B), comprendiendo desde una $TCID_{50} \text{ ml}^{-1}$ de 10^5 a 10^0 . El control positivo (C+) está constituido por 50 ng de RNA de la misma cepa Jasper de IPNV. Como control negativo (C-) se usó RNA extraído a partir de la línea celular BF-2 no infectada.

Especificidad. En la tabla IV.4 se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de hibridación con las 42 sondas de cDNA testadas sobre las 16 cepas y aislados de IPNV. En general los resultados obtenidos con todas las sondas fueron altamente heterogéneos; así, solamente dos sondas, *sHeA* y *s24FoJav*, ambas obtenidas a partir del segmento A, permitieron la detección de todas las cepas y aislados (fig. IV.10). Sin embargo debemos decir que, entre ambas, *s24FoJav* no tuvo un comportamiento totalmente repetible con el aislado 88.1, con el cual en algunas repeticiones se obtuvo un resultado negativo. Por otro lado, dos sondas, ambas obtenidas a partir del aislado 534 (*s534Jav* y *s534B*), dieron resultado negativo con todas las cepas ensayadas. Entre ambos extremos se obtuvieron

porcentajes de detección diversos, en los que están representadas todas las demás sondas.

Tabla IV.4. Eficacia de las distintas sondas de cDNA para la detección de aislados y cepas de IPNV.

		CEPAS VIRALES																	
		RC	533	WB	Te-2	405	Ab	2310	578	Sp	24R	2290	88.1	152	He	534	2464	24Fo	TRV
Sondas de cDNA	<i>sWbJav</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>sWBA</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	<i>sSpJav</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
	<i>sSpA</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
	<i>sHeJav</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
	<i>sHeA</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>sTe-2Jav</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
	<i>sTe2A</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
	<i>s405Jav</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
	<i>s405A</i>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	<i>sAbJav</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
	<i>sAbA</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
	<i>s24FoJav</i>	-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
	<i>s24FoA</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	<i>s152Jav</i>	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
	<i>s534Jav</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>s578Jav</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	<i>s578A</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
	<i>s533Jav</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	<i>s533A</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
	<i>s2464Jav</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	<i>s2464A</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
	<i>s2310Jav</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>s2290Jav</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>s2290A</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
	<i>s24RJav</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
	<i>s24RA</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
	<i>s88RJav</i>	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	<i>Electrf.*</i>		1	2	2	2	2	2	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5
	<i>Genog.*</i>		III	I.2	IV	I.1	II	I.1	II	III	II	II	III	III	VI	III	II	I.2	

*Electroferogrupos y Genogrupos según Cutrín y col., 2004

Tabla IV.4 (continuación). Eficacia de las distintas sondas de cDNA para la detección de aislados y cepas de IPNV.

		CEPAS VIRALES																	
		RC	533	WB	Te-2	405	Ab	2310	578	Sp	24R	2290	88.1	152	He	534	2464	24Fo	TRV
Sondas de cDNA	<i>sWBB</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
	<i>sSpB</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	<i>sHeB</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
	<i>sTe-2B</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
	<i>s405B</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
	<i>s24FoB</i>	-	-	+	-	+	+	+/-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
	<i>sAbB</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
	<i>s152B</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
	<i>s534B</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>s578B</i>	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>s533B</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
	<i>s2464b</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
	<i>s24RB</i>	-	+	+	-	+	+	+/-	+	-	+	-	-	+/-	-	-	-	+	-
	<i>s2310B</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
	<i>Electrf.*</i>		1	2	2	2	2	2	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5
<i>Genog.*</i>		III	I.2	IV	I.1	II	I.1	II	III	II	II	III	III	VI	III	II	I.2		

*Electroferogrupos y Genogrupos según Cutrín y col., 2004

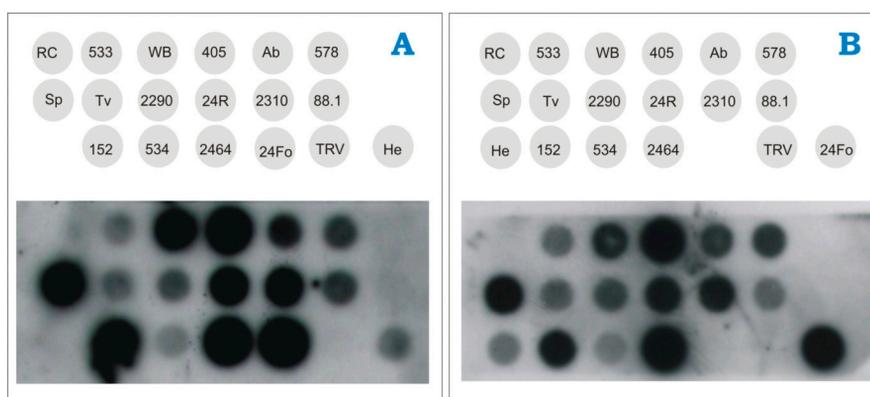


Figura IV.10. Detección de cepas y aislados de IPNV mediante hibridación de ácidos nucleicos, empleando las sondas *sHeA* (A) y *s24FoJav* (B).

Cinética de detección *in vitro*.

En base a los resultados previos, para estos ensayos se eligió la sonda *sHeA*. Como se puede apreciar en la figura IV.11, en células CHSE-214 infectadas se producen niveles de RNA viral detectables entre las 3 y 6 horas postinoculación; de hecho, ya a las 3 h p.i. se pueden apreciar señales de hibridación de débil intensidad, aunque lejos de ser consideradas positivas con las premisas utilizadas para este experimento (> 50% del nivel cuantitativo observado para el control positivo).

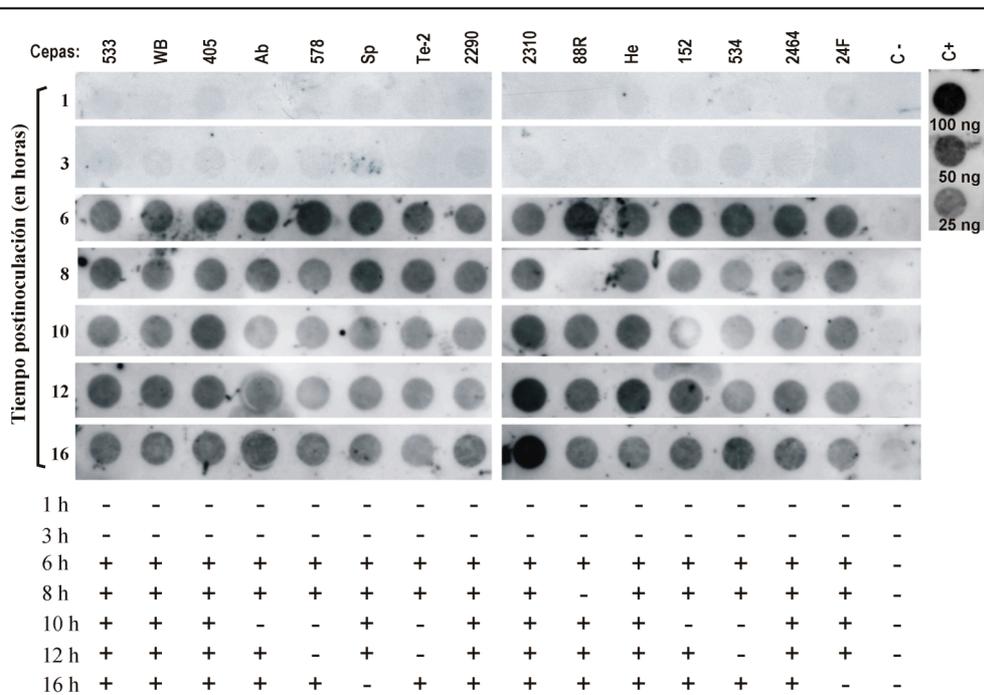


Figura IV.11.- Cinética de detección viral mediante HAN en células CHSE-214 infectadas. Cultivos celulares de CHSE-214 fueron inoculados con distintas cepas y aislados de IPNV a una MOI de 0,01 a 0,1. A diferentes tiempos postinoculación (1, 3, 6, 8, 10, 12, y 16 horas) se extrajo el RNA total y se sometió a hibridación utilizando la sonda *sHeA*. Como control negativo se utilizó RNA de células no infectadas. Como controles positivos se utilizaron cantidades conocidas (100, 50 y 25 ng) de RNA de la cepa Jasper de IPNV.

En los ensayos realizados con la otra línea celular, la BF-2, no se logró detectar el total de cepas ensayadas hasta las 8 horas postinoculación (figura IV.12); no obstante, es necesario resaltar que ya a las 6 horas p.i. se observaron positivos para un alto porcentaje de cepas; así mismo, se obtuvieron positivos más intensos que en el caso anterior, y se pueden apreciar dots en todas las muestras aunque no con la suficiente intensidad para ser consideradas positivas con las premisas iniciales propuestas para este experimento.

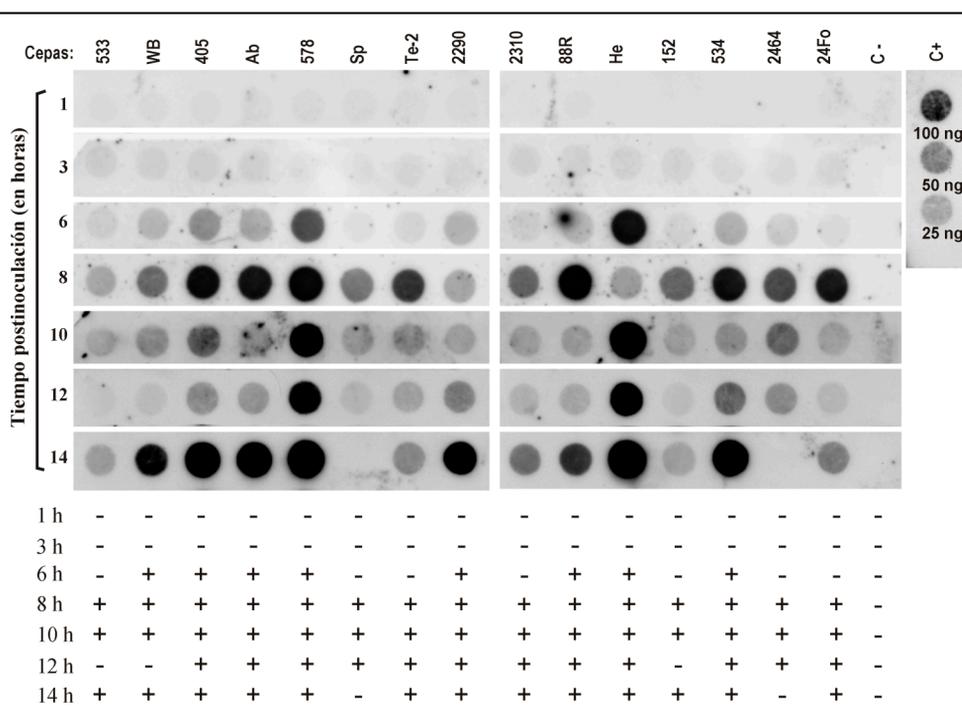


Figura IV.12.- Cinética de detección en células BF-2. Cultivos celulares de BF-2 inoculados con distintas cepas y aislados de IPNV a una MOI de 0,01 a 0,1. A diferentes tiempos postinoculación (1, 3, 6, 8, 10, 12, y 14 horas) se extrajo el RNA total y se sometió a hibridación utilizando la sonda *sHeA*. Como control negativo se utilizó RNA de células no infectadas. Como controles positivos se utilizaron cantidades conocidas (100, 50 y 25 ng) de RNA de la cepa Jasper de IPNV.

Cinética de detección *in vivo*.

En los ensayos de detección en tejidos infectados se obtuvieron resultados dispares en función de la especie inoculada. Así, como se muestra en la tabla IV.5, en el caso de rodaballo la sonda *sHeA* permitió la detección del virus en todos los órganos a las 10 días p.i. con cualquiera de las 4 cepas ensayadas. Como se muestra en la figura IV.13 la señal de hibridación fue en todas las cepas altamente marcada. En las cepas WB y 152 la detección se adelantó a los 5 días p.i.; lo mismo ocurrió con la cepa He, aunque solamente en hígado, cerebro y músculo. Debemos hacer mención a los altos niveles de mortalidad observados en los ensayos de inoculación

Tabla IV.5.- Cinética de detección en tejidos infectados de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)

		ESPECIES UTILIZADAS											
		<i>Scophthalmus maximus</i>					<i>Oncorhynchus mykiss</i>						
		hígado	riñón	bazo	cerebro	músculo	hígado	riñón	bazo	cerebro	músculo		
Cepas y aislados	He	5 días	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		10 días	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		15 días	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		20 días						+	+	+	+	+	+
	152	5 días	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
		10 días	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
		15 días	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		20 días						+	-	-	+	+	+
	533	5 días	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		10 días	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
		15 días	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
		20 días						+	+	+	+	+	+
	WB	5 días	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
		10 días	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
		15 días	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
		20 días						+	+	-	+	+	+

experimental realizados en esta especie (100% a los 15 días p.i.), como se resaltó en el capítulo anterior. El virus se aisló ya a partir de los 5 días p.i. en células CHSE-

214 en la mayor parte de los órganos ensayados, demostrando ser el hígado, seguido de bazo y riñón, el órgano diana más eficiente para el diagnóstico.

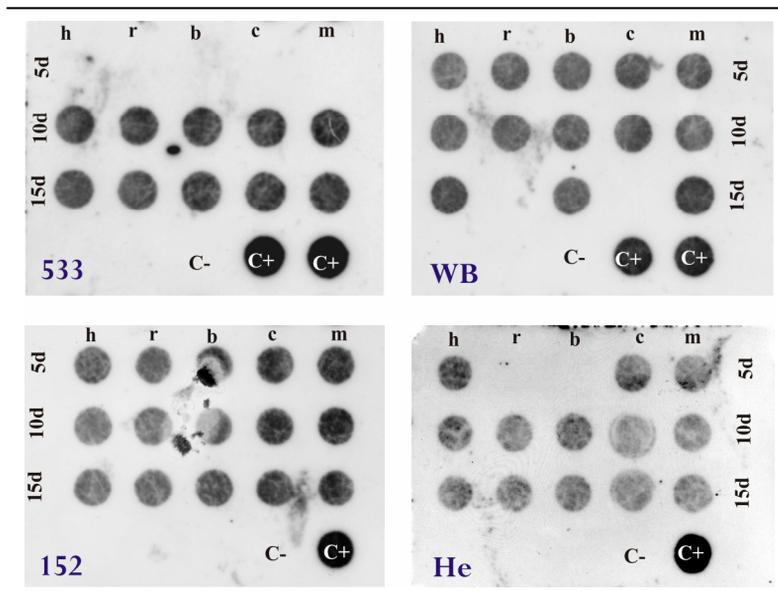


Fig. IV.13- Blots de hibridación mostrando los resultados obtenidos con RNA extraído de homogenado de tejidos (hígado, riñón, bazo, cerebro y músculo: h, r, b, c y m, respectivamente) de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) infectado con los aislados 533 y 152, y con las cepas de referencia WB y He a los 5, 10 y 15 días p.i. Como control positivo se empleó 100 ng de RNA de la cepa Jasper de IPNV, y como control negativo, RNA de células no infectadas

En la otra especie ensayada, solamente con 2 de las cepas (WB y Sp) se obtuvo reaislamiento tanto en el primer pase como en el segundo, y siempre en órganos muy localizados (riñón y bazo). Tampoco la resolución de los blots de hibridación fue tan clara: como se muestra en la figura IV.14, los resultados fueron diferentes dependiendo del virus; así, entre todas las cepas, solamente He fue detectada desde los 5 días en todos los órganos analizados, obteniéndose un 100 % de resultados

positivos en todos los órganos y todos los tiempos postinoculación. El resto de las cepas ensayadas tuvo un comportamiento heterogéneo: en el caso de WB no se obtuvieron niveles de hibridación suficientemente altos para ser considerados positivos hasta los 10 días p.i. en hígado y riñón, y nunca fue detectado en bazo,

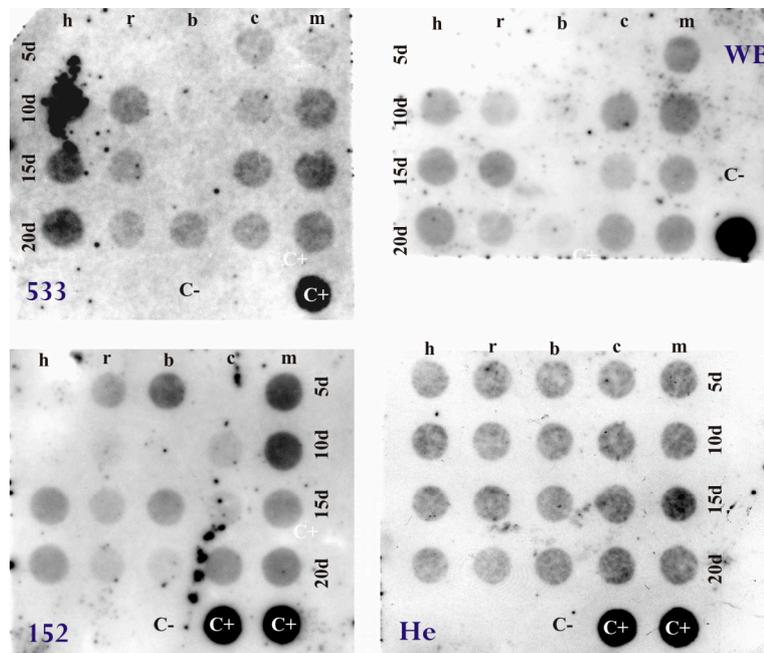


Fig. IV.14.- Blots de hibridación mostrando los resultados obtenidos con RNA extraído de homogenado de tejidos (hígado, riñón, bazo, cerebro y músculo: h, r, b, c y m, respectivamente) de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) infectada con los aislados 533 y 152, y con las cepas de referencia WB y He, a los 5, 10, 15 y 20 días p.i. Como control positivo se emplearon 100 ng de RNA de la cepa Jasper de IPNV, y como control negativo, RNA de células no infectadas

detectándose a partir de los 5 d en músculo; el aislado 533 ya mostró resultados positivos en músculo, hígado y riñón a partir de los 10 días p.i., y el bazo resultó positivo a partir de los 20 días p.i. El otro aislado, 152, tuvo un comportamiento todavía más inusual: dio resultado positivo en riñón, bazo y músculo a los 5 días p.i.,

para luego desaparecer de riñón y bazo a los 10 días p.i., y volver a detectarse en todos los órganos a los 15 d, y desapareciendo nuevamente de riñón y bazo. Solamente con 2 de las cepas (WB y Sp) se obtuvo reaislamiento tanto en el primer pase como en el segundo, y siempre en órganos muy localizados: riñón y bazo.

De todas formas, hay que resaltar de nuevo, que todos estos positivos están relativizados al control positivo de forma que aunque en algunos casos se aprecian motas de una intensidad considerable, como el es el caso de WB en hígado y riñón a los 10 días p.i. y el aislado 152 a los 20 días p.i. en los mismo órganos, estas impresiones no alcanzaron la intensidad suficiente para ser consideradas positivas según las premisas iniciales establecidas para este experimento; sin embargo, a la vista de la figura IV.14, es evidente que, al menos *de visu*, podrían ser considerados positivos.

DISCUSIÓN.

La hibridación de ácidos nucleicos (HAN) con sondas de DNA viene utilizándose ya extensamente en diagnóstico de patologías virales de homeotermos, como lo demuestran las numerosas referencias disponibles (Dimitrov y col, 1985; Kulski y Normal, 1985; Wahl y col., 1985; Jiang y col, 1986; Ticehurst y col, 1987; Welnicki y Hiruki, 1992). En diagnóstico viral de enfermedades de peces, la primera referencia nos viene de la mano de Christie y col., cuando en 1988 utilizaron una sonda de oligonucleótidos para la identificación de la cepa noruega N1 del virus IPNV. Poco después, Rimstad y col. (1990) utilizando una oligosonda de 24 pares de bases marcada radiactivamente con ^{32}P , consiguieron un 87 % de efectividad sobre 88 cepas y aislados de IPNV, y un límite de detección de 100 ng de RNA purificado. En 1994, Dopazo y col., utilizando dos sondas marcadas radiactivamente con ^{32}P sobre un total de 21 cepas de IPNV, obtuvieron un 100 % de detección a partir de cultivos celulares infectados, con una sensibilidad muy

superior: de 10 a 15 pg sobre RNA purificado. Por otro lado, en 1993, Lupiani y col., trabajando con aquareovirus, utilizaron una sonda radiactiva para la detección de este virus, aunque logrando una baja sensibilidad (50 ng de RNA purificado). En el presente estudio se han evaluado un total de 42 sondas obtenidas por transcripción inversa seguida de PCR a partir del RNA obtenido a partir de 16 cepas y aislados de IPNV, con el objetivo de evaluar su viabilidad para ser utilizadas rutinariamente para detectar el RNA viral de IPNV mediante HAN, tanto en cultivos celulares como en muestras tisulares de peces infectados.

Uno de los primeros pasos para la optimización de esta técnica es la selección del tipo de marcaje de las sondas y, de hecho, éste ha sido siempre un importante tema de discusión. Habitualmente se utilizaban sondas marcadas con isótopos radiactivos de distinta naturaleza, básicamente porque este tipo de marcaje ha tenido tradicionalmente a su favor una alta sensibilidad, frente a la de los marcajes no radiactivos, como digoxigenina o biotina. Sin embargo, la utilización de sustratos quimioluminiscentes ha aportado altos niveles de señal, desembocando en una gran mejora en cuanto a la sensibilidad del marcaje no radiactivo (Desselberger, 1995). En este sentido uno de los primeros ensayos realizados en este trabajo fue la selección del tipo de marcaje a emplear en todos los experimentos subsiguientes; los resultados obtenidos en esta pequeña evaluación sobre diferentes cantidades de RNA extraído a partir de la cepa Jasper de IPNV, mostraron una sensibilidad y poder de resolución, utilizando la sonda *sHeA* marcada con digoxigenina, como mínimo igual al marcaje isotópico, lo que nos permitió evitar el marcaje isotópico, con las ventajas que ello conlleva en cuanto a reducción de riesgos

Otro tema de discusión ha sido también el tamaño de las sondas a utilizar. En este sentido, hay autores que prefieren el uso de oligosondas de pequeño tamaño, de unas 20 o 30 pb (Rimstad y col., 1990), mientras que otros sostienen que la utilización de este tipo de sondas puede llevar a una pérdida de especificidad debido a su pequeño tamaño

(Dopazo y col., 1994). Además, otros sostienen que las sondas de más de 100 pb pueden unirse a regiones de baja homología; sin embargo estos últimos autores afirman que este problema puede superarse fácilmente utilizando condiciones de alta estringencia en la hibridación (Dopazo y Barja, 2002). En nuestro caso, nos decantamos por la utilización de sondas de un tamaño entre medio y alto (450, 607 y 790 pb) y se realizaron experimentos para determinar la influencia de las condiciones de estringencia a niveles bajo, medio y alto. Los resultados no mostraron diferencias suficientemente claras para decantarnos por un nivel u otro de estringencia, por lo que se decidió utilizar las condiciones de alta estringencia para asegurar una alta especificidad.

Las cepas objeto de estudio, a partir de las cuales se obtuvieron las 42 sondas ensayadas, fueron seleccionadas en función de los resultados previamente publicados por Cutrín y col. (2000) empleando análisis de electroferotipos genómicos, para obtener una amplia representabilidad del virus IPNV. De las 42 sondas evaluadas, solamente 2 (ambas correspondientes al segmento A) mostraron capacidad para detectar RNA viral de todas las cepas de IPNV ensayadas. Sin embargo entre ambas solo *sHeA* mostró una alta repetitividad, por lo que fue la sonda escogida para los experimentos que siguieron a continuación. Debemos decir que este resultado fue sorprendente, por cuanto esta sonda ha sido obtenida a partir de una cepa (He) que, en genotipado, siempre aparece alejada del resto de cepas de referencia de IPNV (Hosono y col., 1996., Blake y col., 2001; Cutrín y col., 2002). Una vez seleccionada la sonda de diagnóstico por su baja especificidad tipo-específica, el siguiente paso fue determinar su eficacia en términos de sensibilidad. En este sentido, diversos autores han estimado la sensibilidad de esta técnica, con resultados variables entre 40 pg y 100 ng de RNA purificado (Rimstad y col., 1990; Lee, 1992; Dopazo y col., 1994). En nuestro caso, el límite de detección llegó a 0,1 ng de RNA purificado, 1000 superior a la obtenida en el capítulo anterior con RT-PCR. Aplicando la fórmula de conversión mostrada en Material y Métodos, obtenemos que este límite de detección corresponde a $1,5 \times 10^7$ virus. Sin embargo, cuando la sensibilidad de la HAN se evaluó sobre diluciones decimales seriadas del

virus, el límite de detección fue de al menos 1 TCID₅₀ ml⁻¹, tanto a partir de RNA extraído de diluciones seriadas de virus crudo, como con tejido incubado durante 24 horas con una suspensión viral. Es evidente la discrepancia observada entre ambos resultados, discrepancia que, como ya hemos indicado en el capítulo anterior, nos hace pensar que existe una infraestimación de la concentración viral por cualquiera que sea el método de titulación empleado. Además, la titulación viral no contempla la posibilidad de existencia de partículas defectivas o variantes no infectivas del virus que sí podrían detectarse por HAN (Devold y col., 2000; Villanueva y col., 2004).

Como ya se dijo anteriormente la capacidad de detección de RNA viral en cultivos celulares va a depender de varios factores: estado tanto de infectividad del virus como de susceptibilidad de la línea celular, así como las condiciones de replicación. Esto lleva a que los ciclos de replicación de IPNV puedan ser tan variables como para estar entre 12 y 24 horas (Villanueva y col., 2004). Así, en los ensayos de cinética *in vitro* se revelaron niveles de virus intracelular del orden de 10¹ TCID₅₀ ml⁻¹ ya a las 8 horas de incubación, para luego hacerse indetectable y reaparecer a partir de las 12 horas, lo que parecería indicar que antes de las 12 horas p.i. ya tendríamos ciclos de replicación completos. En este sentido diversos autores han publicado que la síntesis de RNA es máxima a las 8-10 horas y decrece a las 14 horas (Somogyi y Dobos, 1980; Villanueva y col., 2004). Estos datos iniciales nos hicieron pensar que deberíamos ser capaces de detectar RNA viral a las pocas horas p.i. En nuestros experimentos de cinética ya se produjeron niveles de RNA viral lo suficientemente elevados para ser detectados por hibridación a partir de las 3 horas p.i. Al igual que con RT-PCR, la línea celular CHSE-214 mostró unas condiciones óptimas de replicación, produciéndose RNA viral, para todas las cepas y aislados, suficiente para ser detectado a las primeras horas p.i., retrasándose en el caso de células BF-2. De todos modos estos resultados siguen siendo del mismo orden e incluso mejorados, que los obtenidos previamente por otros autores (Dopazo y col., 1994).

Como ya hemos indicado anteriormente la infección viral por IPNV puede mantenerse en niveles no detectables por aislamiento en cultivos celulares por largo tiempo (Agius y col., 1982; Johansen y col., 1997; Taksdal y col., 1998). Al igual que ocurrió con la detección utilizando la técnica de RT-PCR, la detección del RNA viral mediante HAN resultó ser más efectiva en tejidos de rodaballo que en el caso de trucha arcoiris. Sin duda este nivel de detección en rodaballo está condicionado por la presencia de coinfección con *Vibrio anguillarum* en infección aguda, potenciándose la replicación viral de IPNV en estos peces tal y como demostraron los resultados obtenidos tanto por aislamiento en cultivo celular como en RT-PCR. Como norma general, a los 10 días p.i. se detectó RNA viral en todos los órganos de rodaballo, y antes de los 5 días ya había niveles suficientes para ser detectado en todos los órganos para la mitad de las cepas, sin embargo en los ensayos de aislamiento en cultivos celulares se obtuvo algún resultado positivo que luego no se ratificó en la HAN, esta discordancia se debe probablemente a un problema en la extracción de RNA, de ahí que sea tan importante la optimización de este proceso para la aplicación de técnicas moleculares en la detección de RNA viral, sobre todo en el caso de muestras tisulares. En trucha arcoiris, peces sin ninguna sintomatología aparente y clínicamente sanos, el resultado fue diferente: Prácticamente no se detectó virus alguno por aislamiento en cultivo celular y el virus cursó siempre de forma asintomática, sin embargo se detectó RNA viral en alguno de los órganos en todos los tiempos ensayados, aunque en general la señal obtenida en los dots fue de menor intensidad que con la otra especie ensayada, lo que indicaría una carga viral menor en relación a la obtenida con rodaballo, corroborando los datos obtenidos en los ensayos de aislamiento en cultivos celulares realizados en el capítulo anterior. Al igual que en el caso anterior existen discrepancias mínimas con el resultado obtenido en aislamiento en cultivo celular, achacables probablemente a problemas en la extracción de RNA.

Finalmente, y a modo de conclusión debemos decir que este trabajo nos ha permitido poner a punto esta técnica de Hibridación de Ácidos Nucleicos para su utilización como

método rutinario de diagnóstico del virus de la necrosis pancreática infecciosa, asegurando una detección específica y sensible, además de rápida, permitiendo la detección del RNA del virus en tan solo 6 o 8 h p.i., tanto a partir de cultivos celulares infectados, como de muestras titulares, y con una sensibilidad suficientemente alta para detectar portadores asintomáticos.

CONCLUSIONES:

1. De la evaluación de los distintos métodos de extracción de RNA se desprende la conclusión de que ninguno de ellos demuestra buena reproducibilidad. No obstante, todos los sistemas fueron adecuados para su utilización en técnicas moleculares de diagnóstico. Por eficacia en el diagnóstico, rapidez y eficiencia, Nucleospin RNA II es el método aconsejable, sin descartar el uso de la ProteinasaK/Fenol-Cloroformo.
2. Este estudio ha demostrado que el paso crítico en el diagnóstico por RT-PCR es la transcripción inversa. En este sentido los sistemas basados en la SuperScript™ Reversotranscriptasa han sido los más eficientes en términos de sensibilidad y reproducibilidad.
3. La técnica de RT-PCR, con la pareja de cebadores IPNBA4, permite asegurar la detección de cualquier cepa de IPNV a partir de las 10 h p.i. en células CHSE-214 infectadas *in vitro*, y en tejidos infectados *in vivo* a partir de los 5 días p.i., con niveles de detección semejantes: alrededor de 0, 1 TCID₅₀.
4. El resultado mediante Hibridación de Acidos Nucleicos, con la sonda *sHeA*, fue muy semejante a la RT-PCR en cuanto a que permitió la detección de cualquier cepa del virus, tanto en cultivo celular como en tejidos, aunque con menor sensibilidad (1 TCID₅₀).
5. Los niveles de detección *in vitro* de la RT-PCR (2 pg, alcanzando los 0,25 fg si se combina con Southern blot) frente a los obtenidos por HAN (0,1 ng) confirman la mayor eficacia de la primera como técnica de diagnóstico en laboratorio. Sin embargo, la simplicidad y adecuada sensibilidad de la HAN hacen que esta técnica sea suficientemente adecuada para su uso en laboratorios de planta.

BIBLIOGRAFIA:

- Agius, C., Mangunwiryo, H., Johnson, R. H. y Smail, D. A., 1982. A more sensitive technique for isolation infectious pancreatic necrosis virus from asymptomatic rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.* **5**: 285-292.
- Agnès, F., Crance, J. M. y and Lévêque, F., 1998. Separate detection of the two complementary RNA strands of hepatitis A virus. *J. Virol. Meth.* **49**: 323-330.
- Ahne, W., 1977. Persistent infection in CHSE-214 cells with IPN virus isolated from pike (*Esox lucius*). *Bull. Off. Int. Epiz.* **87**: 415-416.
- Ahne, W., 1978. Isolation and characterization of infectious pancreatic necrosis virus from pike (*Esox lucius*). *Arch. Virol.* **58**: 65-69.
- Ahne, W., 1981. Serological techniques currently used in fish virology Intern. Symp. Fish. Biol.: Serodiagnostics and Vaccines. Leetown, W. Va. USA. *Dev. Biol. Standard.* **49**: 3-27.
- Ahne, W., 1983. Presence of IPNV in seminal fluid of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *J. Fish Dis.* **6**: 377-378.
- Ahne, W., Anders, K., Holder, M. y Yoshimizu, M., 1990. Isolation of picornavirus-like particles from the european smelt (*Osmerus operlanus*). *J. Fish. Dis.* **13**: 167-168.
- Ahne, W. y Negelle, R. D., 1985. Studies on the transmission of IPNV via eyed eggs and sexual products of salmonid fish. En *Fish and Shellfish Pathology* (Ellis, A. E., Ed.) pp. 260-269. Acad. Press, London.
- Anders, K., Hilger, I. y Moller, H., 1991. Lentivirus-like particles in connective tissue tumors of fish from German coastal waters. *Dis. Aquat. Org.* **11**: 151-154.
- Antychowicz, J., Wejman, M. y Grawinski, E., 2000. The isolation of viral haemorrhagic septicaemia and infectious necrosis pancreatic viruses in trout un Poland. *Medycyna Weterynaryjna* **56**: 255-258.
- Arakawa, C. K., Deering, R. E., Higman, K. H., Oshima, K. H., O'Hara, P. J. y Winton, J. R. 1990. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.* **8**: 165-170.
- Arnal, C., Ferre-Aubineau, V., Besse, B. Mignotte, B., Schwartzbrod, L. y Billadeul, S. 1999. Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification. *J. Fish Dis.* **77**: 17-26.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. 1995. *En Current Protocols in*

- Molecular Biology*. John Wiley and sons, INC.
- Ball, H. J., Munro, A. L. S., Ellis, A., Elson, K. G. R., Hodgkings, W. y McFarlane, I. S., 1971. Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout in Scotland. *Nature* **234**: 417-418.
- Bandin, I., Rivas, C., Noya, C. M., Cutrin, J. M., Barja, J. L. y Dopazo, C. P. 1995 Isolation of a new Aquareovirus from Gilthead sea bream cultured in Galicia (N.W. Spain). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **15**: 157-159.
- Baya, A., Toranzo, A. E., Núñez, S., Barja, J.L. y Hetrick, F. M. 1990. Association of a *Moraxella* sp. and a reo-like virus with mortalities of striped bass, *Morone saxatilis*. En *Pathology in Marine Science* (Perkins, F.O. y Cheng, T.C., Eds). pp. 91-99. Acad. Press, London.
- Besse, P. and de Kinkelin, P., 1965. Sur l'existence en France de la nécrose pancréatique de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairidneri*). *Bull. Acad. Vét.* **38**: 185-190.
- Biering, E. y Bergh, Ø. 1996. Experimental infection of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., yolk-sac larvae with infectious pancreatic necrosis virus: detection of virus by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Fish. Dis.* **19**: 405-413.
- Birghan, C., Mundt, E. y Gorbalenya, A. E., 2000. A non-canonical Lon proteinase lacking the ATPase domain employs the Ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO Journal* **19**:114-123.
- Blake, S. L., Schill, W. B., McAllister, P. E., Lee, M.-K., Singer, J. T. y Nicholson, B. L. 1995. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 835-839.
- Blake, S., Ma, J. Y., Caporale, D. A., Jairath, S. y Nicholson, B. L., 2001. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis Aquat Org.* **45**: 89-102
- Blake, S., Schill, W. B., McAllister, P. E., Lee, M.-K., Singer, J. T. y Nicholson, B. L. 1995. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 835-839.
- Bonamy, J. R., Cousserans, F., Weppe, M. y Hill, B. J., 1983. Mortalities in hatchery reared sea bass fry associated with a birnavirus. *Bull. Eur. Ass. Pathol.* **3**: 41.
- Bootland, L. M., Dobos, P. y Stevenson, R. M. W. 1991. The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout. *Dis. Aquat. Org.* **10**: 13-21.

- Bootland, L. M., Stevenson, R. M. W. y Dobos, P. 1986. Experimental induction of the carrier state in yearling brook trout: a model challenge protocol for IPNV immunization. *Vet. Immunol. Immunopath.* **12**: 365-372.
- Bovo, G., Ceschia, G., Giorgetti, G. y Vanelli, M., 1984. Isolation of an IPN-like virus from adult Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **4**: 21.
- Bovo, G., Giorgetti, G y Ceschia, G. 1985. Comparative sensivity of five fish cell lines to wild infectious pancreatic necrosis viruses isolated in Northeastern Italy. En *Fish and Shellfish Pathology* (Ellis, A. E., Ed.) pp 289-292. Acad. Press, London.
- Bragg, R. R. y Combrick, M. E., 1987. Isolation and identification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus from rainbow trout in South Africa. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **7**: 118-120.
- Brown, F. (Ed.) 1986. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, September 1984. *Intervirology* **25**: 141-143.
- Buchanam, J. S. y Madeley, C. R. 1978. Studies on *Herpes virus scophthalmi* infection of turbot *Scophthalmus maximus* (L.). Ultrastructural observation. *J. Fish Dis.* **1**: 283-295.
- Buchanam, J. S., Richards, R. H., Sommerville, C. y Madeley, C. R. 1978. A herpes type virus from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Vet. Res.* **102**: 527-528.
- Burgerner, M., Candrian, U. y Gilgen, M. 2003. Comparative evaluation of ofur large-volume RNA extraction kits in the isolation of viral RNA from water samples. *J. Fish Dis.* **108**: 165-170.
- Castrick, J., Baudin-Laurencin, F., Coustans, M. F. y Auffret, M., 1987. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus, Ab serotype, from an epizootic in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* **67**:117-126
- Castrick, J. y Chastel, C., 1980. Isolation and characterization attempts of three viruses from european eel *Anguilla anguilla* preliminary results. *Ann. Virol.* **131**:435-448.
- Caswell-Reno, P., Reno, P. W. y Nicholson, B. L., 1986. Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus: analysis of viral epitopes and comparison of different isolates. *J. Gen. Virol.* **67**: 2193-2205.
- Cepeda, C., Rivas, C., Lamas, J., Ledo, A., Dopazo, C. P. y Toranzo, A. E., 1993. First isolation of a presumptive paramyxovirus from

- turbot (*Scophthalmus maximus*). *Abstracts IXth International Congress of Virology*. Glasgow, Scotland. p 201.
- Chang, N., MacDonald, R. D. y Yamamoto, T. 1978. Purification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and comparison of polypeptide composition of different isolates. *Can. J. Microbiol.* **24**: 19-27.
- Chen y-X. y Jiang y-L. 1984. Morphological and physico-chemical characterization of the hemorrhagic virus of grass carp. *Kexue Tonghao* **29**: 832-835.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- Chou, H.-Y., Li, H.-J. and Lo, C.-F. 1994. Pathogenicity of a birnavirus to hard clam (*Meretrix lusoria*) and effect of temperature stress on its virulence. *Fish Pathol.* **29**: 171-175.
- Christie, K. E., 1997. Immunization with Viral Antigens; Infectious Pancreatic Necrosis. *Dev. Biol. Stand. Basel. Karger.* **90**: 191-199.
- Christie, K. E., Havarstein, L. S., Djupvik, H. O., Ness, S. y Endresen, C., 1988. Characterization of a new serotype of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Atlantic salmon. *Arch. Virol.* **103**: 167-177.
- Cifuentes, F., Puelle, C., Espinoza, J. C., Cisternas, C., Enríquez, R. y Kuznar, J., 1999. Utilization of a monoclonal antibody in the diagnosis of infectious pancreatic necrosis virus in finfish. *Arch. Med. Vet.* **31**: 2. ISSN 0301-732X.
- Clem, L. W., Moewus, L. y Sigel, M. M. 1961. Studies with cells from marine fish in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **108**: 762-766.
- Clem, L. W., Siegel, M. M. y Friis, R. R., 1965. An orphan virus isolated in marine fish cell tissue culture. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 126: 343-361.
- Cohen, J., de Kinkelin, P. y Scherrer, R. 1971. Etude de la structure del virus de la nécrose pancréatique infectieuse de la trute. *J. Microsc.* **11**: 41-51.
- Cohen, J., Poinard, A. y Sherrer, R. 1973. Physico-chemical and morfological features of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **21**: 485-498.
- Couve, E., Kiss, J. y Kuzman, J., 1992. Infectious Pancreatic Necrosis virus internalization and endocytic organelles in chse-214 cells. *Cell Biology International*

Reports **16**: 899-906

Crane, M. St. J., Hardy-Smith, P., Williams, L. M., Hyatt, A. D., Eaton, L. M., Gould, A., Handlinger, J., Kattenbelt, J., y Gudkovs, N., 2000. First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia.

Dis. Aqua. Org. **43**:1-14

Cutrín, J. M. 1998. Estudio de la relación causa-efecto entre birnavirus acuáticos de piscifactorías y reservorios. *Tesis Doctoral*. Santiago de Compostela. España.

Cutrín, J. M., Barja, J. L., Nicholson, B. L., Bandín, I. B., Blake, S. y Dopazo, C. P., 2004.

Restriction Fragment Length Polymorphisms and Sequence Analysis: an Approach for Genotyping Infectious Pancreatic Necrosis Virus Reference Strains and Other Aquabirnaviruses Isolated from Northwestern Spain. *App. Env. Microbiol.* p 1059-1067

Cutrín, J. M., Oliveira, J. G., Barja, J. L. y Dopazo, C. P., 2000. Diversity of Infectious Pancreatic Necrosis Virus strains isolated from fish, shellfish and other reservoirs in northwestern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 839-843.

Dannevig, B. H. y Falk, K., 1994. Atlantic salmon, *Salmo salar* L., develop infectious salmon anemia (ISA) after inoculation with *in vitro* infected leucocytes. *J. Fish Dis.* **17**: 183-

187

Darragh, E. A. y MacDonald, R. D. 1982. A host range restriction in infectious pancreatic necrosis virus maps to the large RNA segment and involves virus attachment to the cell surface. *Virology* **123**: 264-272.

De Leon, R., Matsui, S. M., Baric, R.S., Herrmann, J. E., Blacklow, N. R., Greenberg, H. B., Sobsey, M. D., 1992. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 3151–3157.

Desautels, D. y MacKelvie, R. M. 1975. Practical aspects of survival and destruction of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Res. Board Can.* **32**: 523-531.

Desselberger, U., 1995. Medical Virology: A practical approach. *IRL. Press, Oxford*. pp214

Devold, M Krossøy, B., Aspehaug, V. y Nylund, A., 2000. Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Dis. Aquat. Org.* **40**: 9-18.

Dimitrov D. H., Graham D. Y. y Estes M. K., 1985. Detection of rotaviruses by nucleic acid hybridization with cloned DNA of simian

rotavirus SA11 genes. *J Infect Dis.* **152**: 293–300

Dixon, P. F. y Hill, B. J., 1983. Rapid Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) by the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* **64**: 321-330.

Dixon, P.F., Ngoh, G.-H., Chang, S.F., Kueh, S.L.F. y Way, K., 2001. A fourth birnavirus serogroup. *Abstracts 10th International Conference of EAAP, Dublin 2001.*

Dobos, P. 1976. Size and structure of the genome of infectious pancreatic necrosis virus. *Nucl. Acids Res.* **3**: 1903-1924.

Dobos, P. 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Ann. Rev. Fish Dis.* **5**: 25-54.

Dobos, P., Hallet, R., Kells, D. T. C., Sorensen, O. y Rowe, D. 1977. Biophysical studies of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* **22**: 150-159.

Dobos, P., Hill, B. J., Hallet, R., Kells, D. T. C., Becht, H. y Teninges, D. 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* **32**: 593-605.

Dobos, P. y Rowe, D. 1977. Peptide map

comparison of infectious pancreatic necrosis virus-specific polypeptides. *J. Virol.* **24**: 805-820.

Donald, M. C. 1984. The polymerase chain reaction. En *Current Protocols in Molecular Biology*. Frederick Eds. GreenePub. Associates and Wiley/Interscience. pp 15.0.3-15.0.4.

Dopazo, C. P. 1991. Caracterización de birnavirus y rotavirus de peces: Propiedades biológicas, serológicas y moleculares. *Tesis Doctoral*. Universidad de Santiago de Compostela. España.

Dopazo, C. P. y Bandín, I., 2006. Global Epidemiology: Worldwide distribution of IPNV is not only a consequence of aquaculture and commercial movements of cultured fish. *DIPNET Newsletter 30*. www.dipnet.info.

Dopazo, C. P. y Barja, J. L., 2001. A comparison between PCR and serological techniques for detection of fish viruses. En “*Risk analysis in aquatic animal health*” (OIE) (C. Rodyers, Ed.) *World Org. An. Health (OIE)* París pp271-175. (ISBN 92-9044-521-1)

Dopazo, C. P. y Barja, J. L., 2002. Diagnosis and identification of IPNV in Salmonids by molecular methods. En *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases* (C. O. Cunningham, ed) *Kluwer Acad. Publ. Holand.* p 23- 48 (ISBN 1-

4020-0506-7)

Dopazo, C. P. y Barja, J. L., 2002. Diagnosis and identification of IPNV in Salmonids by molecular methods. En *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases* (C. O. Cunningham, ed) *Kluwer Acad. Publ. Holand* p 23- 48 (ISBN 1-4020-0506-7)

Dopazo, C. P., Hetrick, F. M. y Samal, S. K. 1994. Use of cDNA probes for diagnosis of infectious pancreatic necrosis virus infections. *J. Fish Dis.* **17**: 1-16.

Dorson, M. 1977. Vaccination trials of rainbow trout fry against infectious pancreatic necrosis. *Bull. Off. Int. Epiz.* **87**: 405-406.

Dorson, M. 1983. Infectious pancreatic necrosis of salmonids: overview of current problems. En *Antigens of fish pathogens* (Anderson, D. P., Dorson, M. y Dubourget, P. H., Eds.) pp 7-32. Fondation Marcell Marieux, France.

Dorson, M. 1988. Vaccination against Infectious Pancreatic Necrosis. *Fish vaccination* **2**: 162-171

Dorson, M., Castric, J. y Torchy, C., 1978. Infectious pancreatic necrosis virus of salmonids: biological and antigenic features of a pathogenic strain and of a non-pathogenic variant selected in RTG-2 cells. *J. Fish Dis.* **1**:

309-320

Dorson, M. y Torchy, C. 1985. Experimental transmission of infectious pancreatic necrosis virus via the sexual products. En *Fish and Shellfish Pathology* (Ellis, A.E., Ed.) pp. 251-259. Acad. Press, London.

Dulbecco, R. y Ginsberg, H. S., 1988. The nature of viruses. En *R. Dulbecco, H. S. Ginsberg (Eds) Virology..* J. B. Lippincott Company, Philadelphia, USA. pp 400.

Duncan, I.B. 1978. Evidence for an oncovirus in swinbladder fibrosarcoma of Atlantis Salmon, *Salmo salar*. *L. J. Fish Dis.* **1**: 127-131.

Duncan, R., Mason, C. L., Nagy, E., Leong, J.-A. y 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* **181**: 541-552.

Eaton, W. D., Bagshaw, J., Hulett, J. y Evans, S. 1992. Isolation of a picornavirus-like virus from steelhead in Washington State. *J. Aquat. Ann. Health* **4**: 90-96.

Eskildsen, V. K. y Jørgensen, P. E. V. 1973. On the possible transfer of trout pathogenic viruses by gulls. *Riv. Ital. Piscic. Ittiopat.* **8**:

104-105.

Espinoza, J. C. y Kuznar, J., 2002. Rapid simultaneous detection and quantification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J. Virol Meth.* **105**: 81-85.

Falk, K., Namork, E., Rimstad, E., Mjaaland, S. y Dannevig. B. H., 1997. Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Virol.* **71**:9016–9023.

Fanson, G. B., Osmack, P. y Di Bisceglie, A. M., 2000. A comparison between the phenol-chloroform method of RNA extraction an the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. *J. Virol. Meth.* **89**: 23-27.

Fijan, N., 1974. Zaradna nekroza gusterace pastrva: prvi nabaz virusa . *Zugoslaviji. Vet. Arch.* **44**: 187- 192.

Finlay, J. y Hill, B. J., 1975. The use of the complement fixation test for rapid typing of infectious pancreatic necrosis virus. *Aquaculture* **5**: 306-310.

Gahlawat, S. K., E S Munro, E. S. y Ellis, A. E., 2004. A non-destructive test for detection of IPNV-carriers in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *J. Fish Dis.* **37**:

233-239.

Ganga, M., Paz, A., González, M., López-Lastra, M. y Sandino, A. M., 1994. Polycrylamide gel electrophoresis of viral genomic RNA as a diagnostic method for infectious pancreatic necrosis virus detection. *J. Virol. Meth.* **50**: 227-236.

Ghittino, P., 1972. Malattic esotiche dei pesci che minacciano troicultura e carpicolutra italiane. *Riv. Ital. Piscic. Ittiopat.* **7**: 53-62.

Gouvea, V., Glass, R.I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H.F., Forrester, B., Fang, Z.Y., 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotaviruses nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 276–282.

Graells, M de P., 1864. Manual práctico de piscicultura o prontuario. *Libreria de Nautica.com.*

Granzow, H., Weiland, F., Fichtner, D. y Enzmann, P. J. 1997. Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. *J. Fish Dis.* **20**: 1-10.

Gravell, M. y Malsberger, R. G. 1965. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimepheles promelas*). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **126**: 555-565.

- Grotmol, S., Nerland, A. H., Biering, E., Totland, G. K. y Nishizawa, T., 2000. Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Dis. Aquat. Org.* **39**: 79-82.
- Grotmol, S. y Totland, G. K., 2000. Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis. Aquat. Org.* **39**: 89-96
- Guerrero, L., Benítez, M. C., y González, M. R., 2002. Detección del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa en portadores de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) en granjas del Estado de México. *CIVA 2002*. p 362-382
- Hah, Y., Hong, S., Kim, M., Fryer, J. L. y Winton, J. R., 1984. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from goldfish (*Carasius auratus*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. *Korean J. Microbiol.* **22**: 85-90.
- Hah, Y., Park, J. W. y Jeong, G., 1992. Neutralizing epitope of DRT serotype of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolated in Korea. *Proceedings of International Symposium on Infectious Viruses in Fish*. pp. 13-22 Seoul, Korea.
- Halder, M. y Ahne, W., 1988. Freshwater crayfish *Astacus astacus*- a vector for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Dis. Aqua. Org.* **4**: 205-209.
- Hale, A.D., Green, J., Brown, D.W.G., 1996. Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. *J. Virol. Meth.* **57**: 195-201.
- Harstein, T. y Krogsrud, J., 1976. Infectious pancreatic necrosis: first isolation of virus from fish in Norway. *Aquaculture.* **98**: 277-288.
- Hedrick, R. P., Eaton, W. D., Fryer, J. L., Hah, Y. C., Park, J. W. y Hong, S. W., 1985. Biochemical and serological properties of birnavirus isolated from fish in Korea. *Fish. Pathol.* **20**: 463-468.
- Hedrick, R. P., Fryer, J. L., Chen, S. N. y Kou, G. H., 1983b. Characteristics of four birnaviruses isolated from fish in Taiwan. *Fish Pathol.* **18**: 91-97.
- Hedrick, R. P., Okamoto, N., Sano, T. y Fryer, J. L. 1983a. Biochemical characterization of eel virus European. *J. Gen. Virol.* **64**: 1412-1426.
- Hedrick, R. P., Rosemark, R., Aronstein, D.,

- Winton, J. R., MacDowell, T. y Amend, D. F. 1984. Characteristics of a new reovirus from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Gen. Virol.* **65**: 1527-1534
- Hedrick, R. P. y Sano, T. 1989. Herpesviruses of fishes. En *Viruses of lower vertebrates* (Ahne, W. y Kurstak, E., Eds) pp. 161-170. Springer-Verlag, Berlin.
- Hedrick, R. P., Yun, S. y Wingfield, W.H. 1991. A small RNA virus isolated from salmonid fishes in California. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **48**: 99-104.
- Helberg, H., Koppang, E. O. y Bjerkas, I., 2001. Herpesvirus Scophthalmi identified in turbot, *Scophthalmus maximus* L., in Norway. *Dis. Fish Shellfish. 10th International conference of the EAFP*. Dublin.
- Hetrick, F. M., 1989. Methods for the Microbiological examination of fish & shellfish. En: "Methods for the Microbiological Examination of fish and shellfish". Austin, B., & Austin, A. D., (edit). *Fish Viruses*. pp 216-239.
- Hetrick, F. M. y Hedrick, R. P. 1993. New viruses described in finfish from 1988-1992. *Ann. Rev. Fish Dis.* **3**: 187-207.
- Hill, B. J. 1976. Properties of a virus isolated from the bivalve mollusc *Tellina tenuis* (Da Costa). En *Wildlife Diseases* (Page, L. A., Ed.) pp 445-452. Plenum Press, New York.
- Hill, B. J. 1982. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. En *Microbial Diseases of fish* (Roberts, R. J. Eds.) Academic Press, London. pp 91-114
- Hill, B. J. y Alderman, D. J., 1979. Observations on the experimental infection of *Ostrea edulis* with two molluscan viruses. *Haliotis* **8**: 297-299.
- Hill, B. J., Dorson, M. y Dixon, P. F., 1980. Studies on immunization of trout against IPN. En *Fis Diseases* (Ahne, W., Ed.) Springer-Verlag, Berlin. pp. 29-36.
- Hill, B. J. y Way, K. 1983. Serological classification of fish and shellfish birnaviruses. *Abstracts First International Conference of EAFP*. p 10. Plymouth, United Kingdom.
- Hill, B. J. y Way, K. 1995. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Ann. Rev. Fish Dis.* **5**: 55-77.
- Hill, B. J., Willians, R. F. y Finlay, J., 1981. Preparation of antisera against fish virus disease agents. *Dev. Biol. Stand.* **49**: 209-218.
- Hofer, B., 1904. Handbuch der Fischkrankheiten: *Verl. Allg. Fischerei-Zeitung*, XV, 359 S., 18 Bl., zahlr. III

- Hosono, N., Suzuki, S. y Kusuda, R., 1996. Genogrouping of birnaviruses isolated from marine fish: a comparison of VP2/NS junction regions on genome segment A. *J Fish Dis.* **19**: 295-302
- Hsu y.-L., Chen, B.-S. y Wu, J.-L. 1989. Characteristics of a new reo-like virus isolated from landlocked salmon (*Oncorhynchus masou* Brevoort). *Fish Pathol.* **24**: 37-45.
- Huang, M. H., Manning, D. S., Warner, M., Stephens, E. B. y Leong, S. C. 1986. A physical map of the viral genome for infectious pancreatic necrosis virus Sp; analysis of cell-free translation products derived from viral cDNA clones. *J. Virol.* **60**: 1002-1011.
- Ishiguro, S., Izawa, K., Kodama, K., Onuma, M. y Mikami, T. 1984. Serological relationships among five strains of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Dis.* **7**: 127-135.
- Jensen, M. 1963. Preparation of fish tissue cultures for virus research. *Bull. Off. Int. Epizoot.* **59**: 131-134.
- Jensen, M. 1965. Research on the virus of Egtved disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **126**: 422-466.
- Jiang Yulin, 1996. A Review of Traditional and Innovative Aquaculture Health Management in the People's Republic of China. *FAO Fisheries technical Paper* No. 360, FAO 142 p.
- Jiang, X., Estes, M. K., Metcalf, T. G. y Melnick, J. L., 1986. Detection of Hepatitis A virus in seeded estuarine samples by hybridization with cDNA probes. *App and Env. Microbiol.* **4**: 711-717
- Jiang, X., Wang, J., Graham, D.Y., Estes, M.K., 1992. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2529-2534.
- Johansen, L. H. y Sommer, A. I., 1997. The interference of an IPN virus infection with other viral and bacterial infections in Atlantic salmon post-smolts. *Abstracts P-083, The European Association of Fish Pathologists, VIII th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish",* Edinburgh.
- Jørgensen, P. E. V., 1974. Indirect fluorescent antibody techniques for demonstration of trout viruses and corresponding antibody. *Acta Vet. Scand.* **15**: 198-205.
- Jørgensen, P. E. V. y Brengballe, F. 1969. Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Denmark. *Nord. Vet. Med.* **21**: 142-148.
- Jørgensen, P. E. V. y Grauballe, P. C. 1971.

- Problems in the serological typing of IPN virus. *Acta Vet. Scand.* **12**: 145-147.
- Jørgensen, P. E. V. y Kehlet, N. P. 1971. Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout: their serological and pathogenic properties. *Nord. Vet. Med.* **23**: 568-575.
- Kelly, R. K., Souter, B. W. y Miller, H. R. 1978. Fish cell lines: comparisons of CHSE-214, FHM, and RTG-2 in assaying IHN and IPN viruses. *J. Fish. Res. Board Can.* **35**: 1009-1011.
- Kim, W-S., Oh, M-J., Jung S-J., Kim Y-J. y Kitamura S-I., 2005. Characterization of an iridovirus detected from cultured turbot *Scophthalmus maximus* in Korea. *Dis. Aquat. Org.* **64**: 175-180
- Kitamura, S. I., Kamata, S. I., Nakano, S.I. y Suzuki, S., 2003. Detection of marine birnavirus genome in zooplankton collected from the Uwa Sea, Japan. *Dis. Aquat. Org.* **64**: 175-180.
- Kreader, C.A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1102-1106.
- Kuchler, R. J. 1977. Biochemical methods in cell culture and virology. *Dowden, Hutchinson y Ross, Inc.* Pensilvania, USA. 331 pp.
- Kudo, S., Kurosawa, D., Kunimine, I., Nobuswa, K. y Kobasayhi, 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.
- Kulski, J. K., y Normal, M., 1985. Nucleic acid probes in diagnosis of viral diseases of man. *Arch. Virol.* **83**:3-15.
- Kusuda, R., Nishi, Y., Hosono, N. y Suzuki, S., 1993. Serological comparison of birnaviruses isolated from several species of marine fish in South West Japan. *Gyobyo Kenkyu* **28**: 91-92
- Lannan, C. N., Winton, J. R. y Fryer, J. L., 1984. Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro* **20**: 671-676.
- LaPatra, S. E., 1996. The use of serological techniques for viruses surveillance and certification of finfish. *Ann. Rev. Fish Dis.* **6**: 15-28.
- Lapatra, S.E., Roberti, K.A., Rohovec, K.S. and Fryer, J.L., 1988. Fluorescent antibody test for the rapid diagnosis of infectious hematopoietic necrosis. En *Fish Health Confe. Vancouver, B.C. Canada. July 19-21.* p90.

- Lawrence, W. R., Nagy, E., Duncan, R., Krell, P. y Dobos, P., 1989. Expression in *Escherichia coli* of the major outer capsid protein of infectious pancreatic necrosis virus. *Gene* **79**: 369-374.
- Le Guyader, F., Aulaire-Marchais, V. y Billaudel, S., 1993. Use of Genomic Probes to Detect Hepatitis A Virus and Enterovirus RNAs in Wild Shellfish and Relationship of Viral Contamination to Bacterial Contamination. *App and Env. Microbiol.* **59**: 3963-3968.
- Le Guyader, F., Dubois, E., Menard, D., Pommepuy, M., 1994. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3665-3671.
- Ledo, A., Lupiani, B., Dopazo, C. P., Toranzo, A. E. y Barja, J. L. 1990. Fish viral infections in Northwest of Spain. *Microbiología SEM* **6**: 21-29.
- Lee, L.H., 1992. Characterization of nonradioactive hybridization probes for detecting infectious bursal disease virus. *J. Virol. Meth.* **38**: 81-92
- Leong, J. C. y Fryer, J. L., 1993. Viral vaccines for aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.* **3**: 225-240.
- Lewin, S. R., Vesanen, M., Kostrikis, L., Hurley, A., Duran, M., Zhang, L., Ho, D.D y Markowitz, M., 1999. Use of real-time PCR and molecular beacons to detect virus replication in Human Immunodeficiency virus type 1 infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. *J. Virol.* **73**: 6099-6103.
- Li, J., Wang, T., Yi, Y., Liu, H., Lu, R. y Chen, H., 1997. A detection method for Grass carp hemorrhagic virus (GCRV) based on a reverse transcription-polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.* **29**: 7-12
- Lidgerding, 1981. Cell lines used for the production of viral fish disease agents. *Int. Symp. Fish Biol.: Serodiagnostics and Vaccines*. Leetown, W.Va. USA.
- Lientz, J. C. y Springer, J. E. 1973. Neutralization test of infectious pancreatic necrosis virus with polyvalent antiserum. *J. Wild. Dis.* **9**: 120-124.
- Ljungberg, O. y Jørgensen, P. E. V., 1973. Infectious pancreatic necrosis (IPN) of salmonids in Swedish fish farms. Abstracts on the Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control (Dill, W. A., Eds.). *EIFAC Tech. Paper 17 Suppl.* **2**: 67-70.
- Lo, C.-F., Hong, Y.-W., Huang, S.-Y. y Wang,

- C.-H., 1988. The characteristics of the virus isolated from the gill of clam, *Meretrix lusoria*. *Fish Pathol.* **23**: 147-154.
- López vázquez, C., Dopazo, C. P., Oliveira, J. G., Barja, J. L. y Bandín, I., 2005. Development of a rapid, sensitive and non-lethal diagnostic assay for the detection of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Virol Meth.* (En prensa)
- López-Galindez, C., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., Nájera Vazquez de Parga, I., Dopazo, J. and Ponz, F., 1993. La PCR en virología. *Soc. Esp. Virol.* **1**: 189-199
- López-Lastra, M., González, M., Jashes, M. y Sandino, A. M., 1994. A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). *J. Fish Dis.* **17**: 269-282.
- Lorenzen, E., Carstensen, B. y Olesen N. J., 1999. Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis Aqua. Org.* **37**: 81-88.
- Lupiani, B., Dopazo, C. P., Ledo, A., Fouz, B., Barja, J. L., Hetrick, F. M. y Toranzo, A. E. 1989. A new syndrome of mixed bacterial and viral etiology in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*, L.). *J. Aquat. Anim. Health* **1**: 197-204.
- Lupiani, B., Subramanian, K., Hetrick, F. M. y Samal, S. 1993. A genetic probe for identification of the turbot aquareovirus in infected cell cultures. *Dis. Aquat. Org.* **15**: 187-192
- Lupiani, B., Subramanian, K. y Samal, S. 1995. Aquareoviruses. *Ann Rev. Fish Dis.* **5**: 175-208.
- MacDonald, R. D., y Dobos, P., 1981. Identification of the proteins encoded by each genome segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* **114**: 414-422.
- MacDonald R. D., y Gower, D. A., 1981. Genomic and phenotypic divergence among three serotypes of aquatic birnaviruses (infectious pancreatic necrosis virus). *Virology* **114**: 187-195.
- MacDonald, R. D. y Kennedy, J. C. 1979. Infectious pancreatic necrosis virus persistently infects chinook salmon embryo cells independent of interferon. *Virology* **95**: 260-264.
- MacDonald, R. D., Moore, A. R. y Souter, B. W. 1983. Three new serotypes of infectious pancreatic necrosis virus isolated in Canada. *Can. J. Microbiol.* **29**: 137-141.
- MacKelvie, R. M., y Artsob, H., 1969. Infectious pancreatic necrosis virus in young

- salmonids of the Canadian maritime provinces. *J. Fish. Res. Board Can.* **26**: 3259-3262.
- MacKelvie, R. M., y Desautels, D. 1975. Fish viruses-Survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Res. Board. Can.* **32**: 1267-1273.
- Magyar, G. y Dobos, P. 1994. 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.
- Maisse, G., Dorson, M. y Torchy, C., 1980. Inactivation de deux virus pathogènes pour les salmonidés (virus de la nécrose pancréatique infectieuse et de la septicémie hemorrhagica virale) par les rayons ultraviolets. *Bull. Fr. Pisc.* **278**: 34-40.
- Malsberger, R. G. y Cerini, C. P., 1963. Characteristics of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Bacteriol.* **86**: 1283-1287.
- Malsberger, R. G. y Cerini, C. P. 1965. Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **126**: 320-327.
- Malsberger, R. G. y Wolf, K., 1966. Virus diseases of fish. En *Basic medical virology*. (Prier, J.E., Ed.). pp 677-684. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Manley, T., Huang, F., Manning, D. S., Warner, M., Stephen, E. B. y Leong, J. A. 1986. A physical map of the viral genome for infectious pancreatic necrosis Sp: analysis of cell-free translation products derived from viral cDNA clones. *J. Virol.* **60**: 1002-1011.
- Manning, D.S. and Leong, J.C., 1990. Expression in Escherichia coli of the large genomic segment on infectious pancreatic necrosis virus. *Virology.* **179**: 16-25.
- Marshall, S. H., Samal, S. K., McPhillips, T. H., Moore, A. R. y Hetrick, F. M. 1990. Isolation of a rotavirus from smelt, *Osmerus mordax* (Mitchell). *J. Fish Dis.* **13**: 87-91.
- Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A., Fauquet, C. M. (Eds.), 2005. Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier academic press*. London.
- McAllister, P. E., 1983. Infectious pancreatic necrosis (IPN) of salmonid fish. *Fish. Dis Leaflet.* **65**: 1-12.
- McAllister, P. E. y Reyes, X., 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *J. Fish Dis.* **22**: 468-474.
- McAllister, P. E., Schill, W. B., Owens, W. J. y Hodge, D. L. 1991. Infectious pancreatic necrosis virus: a comparison of methods used

- to detect and identify virus fluids and tissues of fish.. *Proceedings of the Second International Symposium of Viruses of Lower Vertebrates*. pp 191-210. Oregon State University, Corvallis, U.S.A.
- McAllister, P. E., Schill, W. B., Owens, W. J. y Hodge, D. L. 1993. Determining the prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in asymptomatic brook trout *Salvelinus fontinalis*: a study of clinical samples and procesing methods. *Dis. Aquat. Org.* **15**: 157-162.
- McEntire, M. E., L. R. Iwanowicz and A. E. Goodwin. 2003. Molecular and clinical evidence that golden shiner virus and Chinese grass carp reovirus are a single promiscuous, cosmopolitan pathogen with multiple identities. *J. Aquat. Ann. Health* **15**: 175-181.
- McKnight, I. J. y Roberts, R. J. 1976. The pathology of infectious pancreatic necrosis. I. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *Brit. Vet. J.* **132**: 76-85.
- McMichael, J., Fryer, J. L. y Pilcher, K. S., 1975. An antigenic comparisson of three strains of infectious pancreatic necrosis virus of salmonids. *Aquaculture*. 6: 203-210.
- M'Gonigle, R. H. 1941. Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings. *Trans. Am. Fish. Soc.* **70**: 297-303.
- Miyazaki, T., Fujiwara, K., Kobara, J., Matsumoto, N., Abe, M. y Nagano, T. 1989. Histopathology associated with two viral diseases of larval and juvenile fishes: Epidermal necrosis of the japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* and epithelial necrosis of black sea bream, *Acanthopagrus schlegi*. *J. Aquat. Anim. Health.* **1**: 85-93.
- Mjaaland, S. Rimstad, E., Falk, K., y Dannevig, H., 1997. Genomic characterization of the virus causing Infectious Salmon Anemia in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L) an orthomyxo-like virus in a teleost. *J. Virol.* **71**: 7681-7686.
- Moewus-Kobb, L., 1965. Studies with IPN virus in marine hosts. *Annals New York Academy of Sciences.* **126**: 328-342
- Moore, A. y McMenemy, M. 1988a. Isolation of a picorna-like virus from smelt (*Osmerus mordax* Mitchell). *J. Fish Dis.* **11**: 179-184.
- Moore, A. y McMenemy, M. 1988b. Five new virus isolates from fish and shellfish in the Maritime Provinces. *Abstract, 13th Eastern Fish Healt Workshop*, Orono, Maine. USA.
- Mortensen, S. H., 1993. Passage of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) through invertebrates in an aquatic food chain. *Dis. Aquat. Org.* **16**: 41-45.

- Mortensen, S. H., Hjeltnes, B., Rodseth, O., Krogsrud, J. y Christie, K. E., 1990. Infectious Pancreatic Necrosis Virus, Serotype N1, Isolated from Norwegian Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), Turbot (*Scophthalmus maximus*) and Scallops (*Pecten maximus*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **10**: 42-43.
- Moss, L. H. y Gravell, M. 1969. Ultrastructure and sequential development of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* **3**: 52-58.
- Mulcahy, D. M. y Fryer, J. L. 1976. Double infection of rainbow trout fry with IHN and IPN viruses. *Fish Health News* **5**: 6.
- Munir, K. y Kibenge, F. S. B., 2004. Detection of infectious salmon anemia virus by real-time RT-PCR. *J. Virol. Meth.* **117**: 37-47.
- Munro, A. L. S., Liversidge, J. y Elson, K. G. R., 1976. The distribution and prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in wild fish in loch awe. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* **75**: 223-232
- Munro, E. S., Gahlawat, S. K., y Ellis, A. E., 2004. A sensitive non-destructive method for detecting IPNV carrier Atlantic salmon, *Salmo salar* L, by culture of virus from plastic adherent blood leucocytes. *J. Fis Dis.* **27**: 129-134.
- Nakajima, K. y Sorimachi, M., 1994. Biological and Physico-chemical Properties of the Iridovirus Isolated from Cultured Red Sea Bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.* **29**: 19-33
- Nasser, A. M., Estes, M. K. y Metcalf, T. G 1991. Detection of human rotaviruses in fresh and estuarine waters by dot-blot hybridization. *Water Sci. Tech.* **23**: 253-260.
- Newbound, G. C. y Kent, M. L. 1991. Experimental interspecies transmission of plasmacytoid leukemia in salmonid fishes. *Dis. Aquat. Org.* **10**: 159-166.
- Nicholson, B. L. 1993. Use of monoclonal antibodies in identification and characterization of fish viruses. *Ann. Rev. Fish Dis.* **3**: 241-257.
- Nicholson, B. L. y Byrne, C. 1973. An established cell line from the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish. Res. Board Can.* **30**: 913-916.
- Nicholson, B. L. y Caswell, P., 1982. Enzyme-linked immunoabsorbent assays for identification of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 469-472.
- Nicholson, B. L. y Henchal, E. A. 1978. Rapid identification of infectious pancreatic necrosis virus in infected cell cultures of immunoperoxidase techniques. *J. Wildl. Dis.*

- 14: 465-459.
- Nigrelli, 1952. Virus an tumors in fishes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **54**: 1076-1902.
- Nims, L., Fryer, J. L. y Pilcher, K. S., 1970. Studies of replication of four selected viruses in two cell lines derived from salmonid fish. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **135**: 6-12.
- Novoa, B., Toranzo, A. E., Dopazo, C. P., Barja, J. L. y Figueras, A. 1993. Isolation in Europe of the VR-299 serotype of IPNV from turbot. *Dis. Aquat. Org.* **17**: 61-65.
- Nylund, A., Hovland, T., Watanabe, K. & Endresen, C., 1995. Presence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in tissues of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., collected during three separate outbreaks of the disease. *J. Fish Dis.* **18**: 135-145
- Office International des Epizooties (OIE), 2003. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. *World Organisation for Animal Health (OIE)* Cap. 2.1.8. <http://www.oie.int>.
- Okamoto, N., Sano, T., Hedrick, R. P. y Fryer, J. L. 1983. Antigenic relationships of selected strains of infectious pancreatic necrosis virus and european eel virus. *J. Fish. Dis.* **6**: 19-25.
- Olesen, N. J., Vestergård Jørgensen, P. E., Bloch, B., y Møllergaard, S., 1988. Isolation of an IPN-like virus belonging to the serogroup II of the aquatic birnaviruses from dab, *Limanda limanda* L. *J. Fish Dis.* **11**: 449-451.
- Ortega, C., Milani, A., Muzquiz, J. L., Alonso, J. L., Simon, M. C., García, J., Girones, O., Graselli, A., 1992. Comparative study of the fluorescent antibody technique and cell culture isolation in the diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia. *Bull.Eur.Ass.Fish Pathol.* **6**: 191-193
- Ortega, C., Vega, F., Salgado, C., Monrás, M. y Enríquez, R., 2001. Isolation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico. *Dis. fish and shellfish.* p 66
- Overturt, K., LaPatra, S. y Powell, M., 2001. Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids. *J. Fish Dis.* **24**: 325-333
- Papas, T. S., Dahlbert, J. E. y Sonstegard, R. A. 1976. Type C virus in lymphosarcoma in northern pike (*Esox lucius*). *Nature* **261**: 506-508.
- Parisot, T. J., Yasutake, W. T. y Bressler, V., 1963. A New geographic and host record for infectious pancreatic necrosis. *Trans. Am. Fish Soc.* **92**: 63-66.
- Petit, S., Lejal, N., Huet, J. C. y Delmas, B., 2000. Active residues and viral substrate

- cleavage sites of the protease of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* **74**: 2057-2066
- Piper, D., Nicholson, B. L. y Dunn, J. 1973. Immunofluorescent study of the replication of infectious pancreatic necrosis virus in trout and Atlantic salmon cell cultures. *Infect. Immun.* **8**: 249-254.
- Plehn, M. 1924. Praktikum der Fischkrankheiten. E. Schweizerbarth Verlag, Stuttgart.
- Pospisil, Z., Tomanek, J., Valicek, L. y Zendulkova, D., 1986. Izolace a identifikace viru infekcni nekrozy panckreaty pstruhu. *Vet. Med Praha* **31**: 95-104.
- Rangel, A. A. C., Rockemann, D. D., Hetrick, F. M., y Samal, S. K., 1999. Identification of Grass carp haemorrhage virus as a new genogroup of Aquareovirus. *J. Gen. Virol.* **80**: 2399-1402
- Reno, P. W., 1999. Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. *En Fish Diseases and Disorders*, vol. 3, pp. 1–55. Edited by P. T. K. Woo & D. W. Bruno. New York: CABI Publishing.
- Reno, P. W., Darley, S. y Savan, M. 1978. Infectious pancreatic necrosis: experimental induction of a carrier state in trout. *J. Fish. Res. Board Can.* **35**: 1451-1456.
- Ribao, C., Torrado, I., Vilariño, M. L. y Romalde, J. L., 2004. Assesment of different commercial RNA-extraction and RT-PCR kits for detection of hepatitis A virus in mussel tissues. *J. Fish Dis.* **115**: 177-182.
- Riji John, K. y Richards, R. H., 1999. Characteristics of a new birnavirus associated with a warmwater fish cell line. *J. Gen. Virol.* **80**: 2061–2065.
- Rimstad, E., Krona, R., Hornes, E., Olsvik, Ø. y Hyllseth, B. 1990. Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) RNA by hybridization with an oligonucleotide DNA probe. *Vet. Microbiol.* **23**: 211-219.
- Rivas, C. 1991. Estudio comparativo de Birnavirus de Salmónidos. *Tesis de Licenciatura*. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Rivas, C., Cepeda, C., Dopazo, C. P., Novoa, B., Noya, M. y Barja, J. L. 1993. Marine environment as reservoir of birnaviruses from poikilothermic animals. *Aquaculture* **115**: 183-194.
- Roberts, T. E. y Dobos, P. 1982. Studies of mechanism of temperature sensivity of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **64**: 331-339.

- Rodríguez Saint-Jean, S., Borrego, J. J. y Pérez-prieto, S. I., 2001. Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. *J. Virol. Meth.* **97**: 23-31
- Rodríguez, S., Vilas, P., Gutierrez, M. C. y Pérez-Prieto, S., 1997. Isolation and Preliminary Characterization of a Birnavirus from the Sole Solea Senegalensis in Southwest Spain. *J. Aquat. Anim. Health* **9**: 295-300
- Rodríguez, S., Vilas, P., Palacios, M. A. y Pérez-Prieto, S. 1991. Detection of infectious pancreatic necrosis in a carrier population of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), by flow cytometry. *J. Fish Dis.* **14**: 545-553.
- Rodríguez, S., Vilas, P. y Pérez-Prieto, S. 1993. A viral diagnostical survey of Spanish rainbow trout farms. Sensitivity of four cell lines to wild IPNV isolates. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **13**: 119-122.
- Roselund, B. D. 1977. Infectious pancreatic necrosis virus at the Willow Beach NHF, Nevada, and in rainbow trout stocked into adjacent Lake Mohave. *Fish Health News* **6**: 10.
- Ross, A. J., Pelnar, J. y Rucker, R. R., 1960. A virus-like disease of chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* **89**: 160-163.
- Sano, T., 1971. Studies on viral diseases of Japanese fishes. I. Infectious pancreatic necrosis (IPN) of rainbow trout: first isolation from epizootics in Japan. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **37**: 495-503.
- Sano, T., Okamoto, N. and Nishimura, T., 1981. A new viral epizootic of *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. *J. Fish Dis.* **4**: 127-139.
- Sanz, F. y Coll, J., 1992. Techniques for diagnosing viral diseases of salmonid fish. *Dis. Aquat. Org.* **13**: 211-223.
- Saulnier, D. y de Kinkelin, P. 1997. Polymerase chain reaction primers for investigations on the causative agent of proliferative kidney disease of salmonids. *J. Fish Dis.* **20**: 467-470.
- Scherrer, R., Bic, E. y Cohen, J. 1974. Le virus de la nécrose pancréatique infectieuse: étude de la réplication et de l'induction de la synthèse d'interferon en fonction de l'hôte et de la température. *Ann. Microbiol. (Paris)* **125**: 455-467.
- Scherrer, R. y Cohen, J. 1975. Studies on infectious pancreatic necrosis virus interactions with RTG-2 and FHM cells: selection of a variant virus-type in FHM cells. *J. Gen. Virol.* **28**: 9-20.

- Schlotfeldt, H.-J., 1975. Erstisolierung und identifizierung des virus der infektiösen pankreasnekrose (IPN) der salmoniden in der Bundesrepublik Deutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **88**: 109-111.
- Schutz, M., May, E. B., Kraeuter, J. N. and Hetrick, F. M., 1984. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from an epizootic occurring in cultured striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). *J. Fish Dis.* **7**: 505-507
- Schwab, K.J., De Leon, R. y Sobsey, M.D., 1993. Development of PCR methods for enteric virus detection in water. *Water Sci. Technol.* **27**: 211-218.
- Schwab, K.J., De Leon, R. y Sobsey, M.D., 1995. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 531-537.
- Shäperclaus, 1938. Die Schädigungen der deutschen Fischerei durch Fischparasiten und Fischkrankheiten. *Fish. Ztg.* **41**: 267-270.
- Shieh, Y.S.H., Wait, P., Tai, L., Sobsey, M.D., 1995. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* **54**: 51-66.
- Somogyi, P. y Dobos, P. 1980. Virus specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* **33**: 129-139.
- Sorimachi, M y Hara, T., 1985. Characteristics and pathogenicity of a virus isolated from yellowtail fingerlings showing ascites. *Fish Pathol.* **19**: 231-238.
- Sostengard, R. A., McDermott, L. A. y Sostengard, K. S., 1972. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from white suckers (*Catostomus commersoni*). *Nature* **36**: 174-175.
- Sousa, J. A., Romalde, J. L., Ledo, A., Eiras, J. C., Barja, J. L. y Toranzo, A. E., 1996. Health status of two salmonid aquaculture facilities in North Portugal: characterization of the bacterial and viral pathogens causing notifiable diseases. *J. Fish Dis.* **19**: 83-89.
- Stephens, B. E., Newman, N. W., Zachary, L. A. y Hedrick, F. M., 1980. A viral aetiology for the annual spring epizootics of Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus* (Latrobe) in Chesapeake Bay. *J. Fish Dis.* **37**: 387-398.
- Straub, T.M., Pepper, I.L. y Gerba, C.P., 1994. Detection of naturally occurring enteroviruses and hepatitis A in undigested and anaerobically digested sludge using the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.*

40: 884–888.

Svenson, L., Hjalmarsson y Everitt, E., 1999. TCID50 determination by an immuno dot blot assay as exemplified in a study of storage of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol. Meth.* **80**: 17-24.

Swanson, R. N. y Guillespie, J. H., 1981. An indirect fluorescent antibody test for the rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus in tissues. *J. Fish Dis.* **4**: 309-315

Taskdal , T., Dannevig, B. H. y Rimstad, E., 2001. Detección of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **21**: 214-219.

Taskdal , T., Ramstad, A., Stangeland, K. y Dannevig, B. H., 1998. Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in covertly infected Atlantic salmon *Salmo salar* L. post-smolts and stress exposure, by injection of IPN virus (IPNV) and by cohabitation. *J. Fish Dis.* **21**: 193-204.

Thorud, K., and H. O. Djupvik. 1988. Infectious anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **8**: 109–111.

Ticehurst, J. R., Feinstone, S. M., Chestnut, T.,

Tassopoulos, N. C., Popper H. y Purcell R. H., 1987. Detection of hepatitis A virus by extraction of viral RNA and molecular hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1822–1829.

Tidona, C. A., Darai, G. y Büchen-Osmond, C. (Eds), 2002. The Springer Index of Viruses. *Springer-Verlag Berlin*. 1511 p.

Todd, D. y McNulty, M. S. 1979. Biochemical studies with infectious bursal disease virus: comparison of some of its properties with infectious pancreatic necrosis virus. *Arch. Virol.* **60**: 265-277.

Tomasec, J. y Fijan, N. 1971. Virusne bolesti riba (viral disease of fish): *Final report on research under a part of project, 6 n /1966*, Zagreb.

Toranzo, A. E., Barja, J. L., Lemos, M. L. y Hetrick, F. M. 1983. Stability of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in untreated, filtered and autoclaved estuarine water. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **3**: 51-53.

Toranzo, A. E. y Hetrick, F. M. 1982. Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters. *J. Fish Dis.* **5**: 223-231.

Underwood, B. O., Smale, C. J. y Brown, F., 1977. Relationship of a virus from *Tellina*

- tenuis* to infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **36**: 93-109.
- Verheyden, B., Thielemans, A., Rombaut y Kronenberger, P., 2003. RNA extraction for quantitative enterovirus RT-PCR: comparison of three methods. *J. Fish Dis.* **33**: 819-823.
- Villanueva, R. A., Galaz, J. L., Valdés, J. A., Jashés, M. M. y Sandino A. M., 2004. Genome Assembly and Particle Maturation of the Birnavirus Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Virol.* p. 13829–13838
- Wahl, G. M., Albanil, S., Ignacio, K., y Richman, D. D., 1985. Nucleic acid hybridization: a powerful technology useful for medical diagnosis. *En L. M. de la Maza and E. M. Peterson (ed.), Medical virology IV. Lawrence Erlbaum Associates, Inc., Hillsdale, N.J.* p. 31-64.
- Wang, W.-S., Wi, Y.-L. y Lee, J.-S. 1997. Single tube, non-interrupted reverse transcription PCR for detection of infectious pancreatic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.* **28**: 229-233.
- Wattanavijarn, W., Torchy, C., Tangtronpiros, J., y Kinkelin P., 1988. Isolation of a birnavirus belonging to Sp serotype, from South East Asia fishes. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **8**: 106-107.
- Welnicki, M. y Hiruki, C. 1992. Highly sensitive digoxigenin-labelled DNA probe for the detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol Meth.* **39**: 91-99.
- Wiedbrauk, D. L. y Farkas, D. H., 1995. Molecular Methods for Virus Detection. Danny L. (Wiedbrauk y Dannie H. Farkas Eds). *Academic Press.* ISBN 0-12-748920-7. pp 385.
- Wiedbrauk D. L., Werner, J. C. y Drevon, A. M., 1995. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J Clin Microbiol.* **33**: 2643-6.
- Wilde, J., Eiden, J. y Yolken, R., 1990. Removal of inhibitory substances from human fecal specimen for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1300–1307.
- Winton, J. R. 1989. Picornaviruses and reoviruses of fishes. *En Viruses of Lower Vertebrates* (Ahne, W. y Kurstak, E., Eds) pp. 217-226. Springer-Verlag, Berlin.
- Winton, J. R. 1991. Recent advances in detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus in aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.* **1**: 83-93.
- Winton, J. R., Arakawa, C. K., Lannan, C. N. y Fryer, J. L. 1989. Isolation of a reovirus from

- coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Oregon, USA. En *Viruses of Lower Vertebrates* (Ahne, W. & Kurstak, E., Eds.) pp 257-269 Springer-Verlag, NY.
- Winton, J. R., Lannan, C. N., Ransom, D. P. y Fryer, J. L. 1985. Isolation of a new virus from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in Oregon U.S.A. *Fish Pathol.* **20**: 373-380.
- Winton, J. R., Lannan, C. N., Ransom, D. P., Fryer, J. L. y Kimura, T. (1981). Isolation of a new reovirus from chum salmon in Japan. *Fish Pathol* **15**: 155-162
- Wolf, K. 1964. Characteristics of viruses found in fishes. *Dev. Ind. Microbiol.* **5**: 140-148.
- Wolf, K., 1965. Some recent developments and applications of fish cell and tissue culture. *Prog. Fish Cult.* 67-74.
- Wolf, K. 1966. The fish viruses. *Adv. Virus Res.* **12**: 35-101.
- Wolf, K. 1984. Fish Viruses: Their Biology, classification, hosts, pathology, and control. En *Control of Virus Diseases* (Kurstak, E. & R.G. Marusyk, Eds). pp197-215. M.Dekker Inc NY..
- Wolf, K. 1988. Fish viruses and fish viral diseases. *Cornell University Press.* New York.
- Wolf, K, Gravell, M. y Malsgerger, R. G., 1966. Lymphocystis virus: isolation and propagation in fish cell lines. *Science* **151**: 105-108
- Wolf, K. y Mann, J. A. 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. *In vitro* **16**: 168-179.
- Wolf, K. y Pettijohn, L. L., 1970. Infectious pancreatic necrosis virus isolated from coho salmon fingerlings. *Prog. Fish Cult.* **32**:17-18.
- Wolf, K. y Quimby, M. C. 1962a. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science* **135**: 1065-1066.
- Wolf, K. y Quimby, M. C. 1962b. Systematic procedure management of animal cell lines. *TCA manual* **4**: 741-744.
- Wolf, K. y Quimby, M. C. 1966. Lymphocistis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. *Science* **151**: 1004-1005.
- Wolf, K. y Quimby, M. C. 1969. Fish cell and tissue culture. En *Fish Physiology* (Hoar, W. S. y Randal, D. J., Eds.) pp 253-350. Acad. Press, New York.
- Wolf, K., Quimby, M. C. y Bradford, A. D. 1963. Egg-associated transmission of IPN virus of trouts. *Virology* **21**: 317-321.
- Wolf, K., Snieszko, S. F. y Dunbar, C. E. 1959. Infectious pancreatic necrosis a virus-

- caused disease of fish. *Excerpta Med.* **13**: 228.
- Wolf, K., Snieszko, S. F., Dunbar, C. E., y Pyle, E., 1960. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **104**: 105-108
- Wood, E. M., Snieszko, S. F. y Yasutake, W. T. 1955. Infectious pancreatic necrosis in brook trout. *Arch. Pathol.* **60**: 26-28.
- Xiang, X., Qiu, D., Hegele, R. D. y Tan, W. C., 2001. Comparison of different methods of total RNA extraction for viral detection in sputum. *J. Fish Dis.* **94**: 129-135.
- Yamamoto, T., 1974. Infectious pancreatic necrosis virus occurrence at a hatchery in Alberta. *J. Fish. Res. Board Can.* **31**: 397-402.
- Yamamoto, T., 1975a. Infectious pancreatic necrosis virus and bacterial kidney disease appearing concurrently in populations of *Salmo gairdneri* and *Salvelinus fontinalis*. *J. Fish. Res. Board Can.* **32**: 92-95.
- Yamamoto, T., 1975b. Frequency of detection and survival of infectious pancreatic necrosis virus in a carrier population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in a lake. *J. Fish. Res. Board Can.* **32**: 568-570.
- Yamamoto, T. y Kilistoff, J., 1979. Infectious pancreatic necrosis virus: quantification of carriers in lake populations during a six year period. *J. Fish. Res. Board Can.* **36**: 562-567.
- Yamamoto, T., McDonald, R. D., Gillespie, D. C. y Kelly, R. K., 1976. Viruses associated with lymphocystis disease and dermal sarcoma of walleye (*Stizostedion vitreum vitreum*). *J. Fish Res. Board Can.* **33**: 2408-2419.
- Yasutake, W. T. 1970. Comparative histopathology of epizootic salmonid virus diseases. En *Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes* (Snieszko, S. F., Ed.). *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* **5**: 341-350
- Yoshikoshi, K. e Inoue, K. 1990. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of japanese parrot-fish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel) *J. Fish Dis.* **13**: 67-69.
- Yoshinaka, T., Yoshimizu, M. y Ezura, Y., 1998. Simultaneous detection of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by reverse transcriptase (RT) polymerase chain reaction (PCR). *Fish Sci.* **64**: 592-595