

ESTUDIO DE LOS VIRUS DE PECES DEL BANCO PESQUERO FLEMISH CAP (TERRANOVA)

Inés Romero Brey



Tesis Doctoral

Santiago de Compostela, 2005

Carlos P. Dopazo, Profesor Titular e *Isabel Bandín Matos*,
Investigadora Ramón y Cajal del Departamento de Microbiología y
Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMAN

que la presente Tesis Doctoral titulada “*Estudio de los virus de peces del banco pesquero Flemish Cap (Terranova)*” que presenta *Dña. Inés Romero Brey* para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en el Instituto de Acuicultura bajo nuestra dirección y, considerando que se haya concluida, autorizamos su presentación para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firmamos el presente informe en Santiago de Compostela a 8 de julio de 2005.

Fdo. *Dr. Carlos P. Dopazo*

Fdo. *Dr. Isabel Bandín Matos*

El origen de esta tesis doctoral se remonta al verano del año 1999. Fue entonces cuando Alicia E. Toranzo y Juan L. Barja me presentaron al gran lobo de mar Antonio Vázquez, quien accedió a hacerme un hueco como tripulante de la expedición Flemish Cap 99. De este modo, me enrolé a bordo del buque oceanográfico *Cornide de Saavedra*, cruzando el Atlántico hasta las gélidas aguas de Terranova. De este sueño hecho realidad guardo innumerables y muy gratos recuerdos. Me gustaría hacer llegar a toda la tripulación de esta expedición mi más sincero agradecimiento por haberme permitido conocer su mundo. Especialmente a Lola Garabana, a Fran Saborido y a Pedro Rodríguez.

Desde entonces he llevado a cabo este trabajo de investigación en el departamento de Microbiología y Parasitología, donde he conocido a gente excepcional que me ha apoyado incondicionalmente. En primer lugar quiero agradecer a Carlos P. Dopazo e Isabel Bandín, por la inestimable labor que han desempeñado como directores de esta tesis. También quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio (Juanma, Javi, Susana, Carmen, Alián y Johnny) por sus numerosas aportaciones, directas o indirectas, en la elaboración de este trabajo. Y a todos los demás miembros de este departamento que me han ayudado y/o apoyado, especialmente a Sol, Nuria y Sandra. Entre los que pasaron por aquí, me gustaría nombrar especialmente a Gema Pazos, a Óscar Colindres y a Fernando Barbero.

Durante el periodo de gestación de este trabajo he tenido la valiosa oportunidad de realizar tres estancias de investigación en laboratorios de otros países. La primera de ellas en el laboratorio de Biología Celular del *Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar* (ICBAS) de Porto (Portugal), bajo la dirección del profesor Carlos Azevedo. Allí, y de la experimentada mano de mi querida dona Laura Corral, me formé en diversas técnicas de microscopía electrónica. De esta experiencia me gustaría mencionar a todos los compañeros de laboratorio (Carla Batista, Graça Casal e João Carvalheiro) así como a mis colegas Pedro Diniz y Filipe Pereira. También a Pilar López y a los amigos de Serpa Pinto.

La segunda de estas estancias me llevó al *Western Fisheries Research Center* (WFRC) de Seattle (EEUU), donde tuve la ocasión de integrarme en un grupo altamente motivador dirigido por Jim Winton. De esta etapa me gustaría agradecer especialmente a las siguientes personas: Bill Watts, Kyle Gaxter, Julia Franke, Gael Kurath y, en general, a todo el personal del WFRC, por tamaño apoyo recibido. Durante mi estancia en Seattle conocí además a Sandra Essbauer y Michel Brèmont, cuyas aportaciones profesionales, si bien puntuales, enriquecieron enormemente mi perspectiva científica.

Mi tercera y última estancia transcurrió en el *University of Maryland Biotechnology Institute* (UMBI) de Maryland (EEUU), bajo la supervisión de Vik Vakharia, a quien quiero

agradecer la gran dosis de fe y confianza que en todo momento depositó en mi. Durante esta estancia compartí ciencia y amistad con Haichen Song y Lenita Moura, e interminables dudas con Hamp Edwards. Quisiera agradecer además a Ana Baya y a los vecinos de Amherst Road, especialmente a Anne Kibler y Phil Hart, por su grandiosa hospitalidad.

Gran parte de este trabajo lo he realizado en el área de Microscopía Electrónica de esta universidad, donde he contado con la inestimable ayuda de Merchi y Ramiro en la búsqueda de “chorizos”. A ellos y a todos los usuarios de este servicio quisiera agradecerles la consideración y respeto que, en todo momento, mostraron hacia mi trabajo. También a Manolo Noya, del departamento de Citología, por ayudarme en la realización de cortes ultrafinos.

A Fernando y a Marcelo, del departamento de Bioquímica, por sus células de insecto y sus orientaciones para los experimentos de expresión proteica.

En general, a todos mis compañeros y/o amigos del Instituto de Acuicultura.

Gracias a todos por haber compartido conmigo vuestros conocimientos, vuestros consejos, vuestro tiempo, vuestro espacio, vuestras ilusiones y aspiraciones, vuestros sueños. Con vosotros quiero compartir hoy mi alegría y celebrar que no hayáis permitido que se extinguiese en mi el afán por conocer e investigar.

Dedico este trabajo a una persona muy especial a quien le encantaría ser participe de este momento y con quien he tenido una gran complicidad.

A mis queridísimos Emma y David, que han tenido mucho que ver con que este proyecto vea la luz. Y a mis padres, M^a Josefa y Juan, que me han dado mucha vida.



Santiago de Compostela, 8 de julio de 2005.

El trabajo presentado en esta memoria ha sido financiado con los proyectos **MAR99-0637-C02-01** de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (DGSIC), **ACU01-010/2001/PC159** del Ministerio de Ciencia y Tecnología, y **PGIDIT02BTF23501PR** de la Secretaría Xeral de I+D de la Xunta de Galicia.

Durante la realización de este estudio he disfrutado de la beca de Formación de Personal Investigador (F.P.I.) en el marco del Programa Nacional de Personal Investigador del Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Ministerio de Educación y Ciencia en España, Portugal y EEUU.

OBJETIVOS	3
PRÓLOGO	7
CAPÍTULO 1. Estudio epidemiológico de los virus de peces capturados en el banco pesquero Flemish Cap (Terranova) en 1999	
Resumen	15
Abstract	16
INTRODUCCIÓN	17
1. Descripción del banco pesquero	19
2. Descripción de los peces analizados	20
3. Principales familias virales que afectan a peces en condiciones naturales	25
3.1. VIRUS ADN	25
3.1.1. Familia <i>Iridoviridae</i>	25
3.1.2. Familia <i>Herpesviridae</i>	27
3.1.3. Familia <i>Adenoviridae</i>	28
3.2. VIRUS ARN	29
3.2.1. Familia <i>Orthomyxoviridae</i>	29
3.2.2. Familia <i>Paramyxoviridae</i>	30
3.2.3. Familia <i>Rhabdoviridae</i>	31
3.2.4. Familia <i>Retroviridae</i>	33
3.2.5. Familia <i>Caliciviridae</i>	34
3.2.6. Familia <i>Picornaviridae</i> y <i>Nodaviridae</i>	34
3.2.7. Familia <i>Reoviridae</i>	35
3.2.8. Familia <i>Birnaviridae</i>	36
MATERIALES Y MÉTODOS	39

1. Líneas celulares y condiciones de cultivo	39
1.1. Líneas celulares	39
1.2. Condiciones de cultivo	39
2. Recogida y procesamiento de las muestras	40
3. Aislamiento de virus en cultivo celular	42
4. Prueba de resistencia al cloroformo	42
5. Titulación viral	43
6. Inmunodot	43
7. Purificación parcial de virus	44
7.1. Purificación parcial para virus no envueltos	45
7.2. Purificación parcial para virus envueltos	45
8. Visualización de virus mediante microscopía electrónica	45
9. Clonación en placa mediante diluciones seriadas	46
10. Identificación molecular mediante RT-PCR	47
RESULTADOS	48
1. Aislamiento viral en líneas celulares de peces	48
2. Prueba de resistencia al cloroformo	50
3. Inmunodot	51
4. Microscopía electrónica	52
5. Identificación molecular mediante RT-PCR	56
DISCUSIÓN	56
CAPÍTULO 2. Caracterización de los birnavirus aislados de peces capturados en el banco pesquero Flemish Cap	
Resumen	69
Abstract	70

INTRODUCCIÓN	71
1. Familia <i>Birnaviridae</i>	71
1.1. Género <i>Avibirnavirus</i>	71
1.2. Género <i>Entomobirnavirus</i>	71
1.3. Género <i>Aquabirnavirus</i>	72
2. Descripción de los birnavirus acuáticos	73
2.1. Morfología	73
2.2. Propiedades biofísicas	74
2.3. Propiedades bioquímicas	74
Genoma	74
Proteínas estructurales	76
2.4. Ciclo de replicación	79
Condiciones para la multiplicación	80
Interacción con la célula huésped	82
Transcripción y traducción	83
Ensamblaje y liberación	83
2.5. Serología y clasificación	84
2.6. Hospedadores y distribución geográfica	86
MATERIALES Y MÉTODOS	88
1. Líneas celulares y condiciones de cultivo	88
2. Cepas empleadas	88
2.1. Cepas del Flemish Cap	88
2.2. Cepas de referencia	88
3. Comparación de electroferotipos genómicos	90
4. Análisis de electroferotipos proteicos	91

5. Western blot	92
6. Análisis de los fragmentos de restricción (RFLPs)	92
6.1. Extracción de ARN	93
6.2. Obtención del fragmento de restricción mediante RT-PCR	93
6.3. Extracción y purificación del producto de PCR	94
6.4. Tratamiento enzimático	95
6.5. Electroforesis en geles de agarosa	95
7. Secuenciación de VP4 y VP2	96
7.1. Elección de cebadores	96
7.2. RT-PCR y <i>nested</i>-PCR	97
7.3. Secuenciación del ADNc	98
7.4. Análisis de las secuencias	99
RESULTADOS	100
1. Comparación de los electroferotipos genómicos	101
2. Análisis del contenido proteico	102
3. Análisis de los fragmentos de restricción (RFLPs)	104
4. Análisis de las secuencias	105
5. Análisis filogenético	108
DISCUSIÓN	109
CAPÍTULO 3. Estudio de las estructuras tubulares asociadas a los birnavirus	
Resumen	117
Abstract	118
INTRODUCCIÓN	119
MATERIALES Y MÉTODOS	122

1. Líneas celulares	122
2. Cepas empleadas	122
2.1. Cepas de referencia	122
2.2. Cepas del Flemish Cap	124
3. Clonación en placa mediante diluciones seriadas	124
4. Microscopía electrónica	125
4.1. Contraste negativo	125
4.2. Inmunomicroscopía electrónica	125
5. Estudio de la dinámica de crecimiento <i>in vitro</i>	126
5.1. Curvas de crecimiento	126
5.2. Titulación viral	126
5.3. Replicación viral <i>in vitro</i>	127
6. Contenido genómico y proteico de las estructuras tubulares	128
6.1. Separación en gradientes de cloruro de cesio	128
6.2. Análisis del contenido proteico	129
6.3. Análisis del contenido genómico	129
7. Secuenciación del ácido nucleico	130
7.1. Extracción del ARN viral	130
7.2. Amplificación mediante RT-PCR	130
7.3. Purificación del ADNc	132
7.4. Secuenciación del ADNc	133
7.5. Análisis de las secuencias	133
8. Clonaje y expresión proteica	134
8.1. Amplificación de las secuencias génicas PP, pVP2 y VP2	134
8.2. Clonaje	135

8.3. Transposición del plásmido donante	136
8.4. Transfección de células de insecto Sf9 con el báculo recombinante	137
8.5. Producción y purificación de las proteínas heterólogas	138
RESULTADOS	140
1. Identificación de las estructuras tubulares	140
2. Clonación en placa mediante diluciones seriadas	141
3. Estudio de la dinámica de crecimiento <i>in vitro</i>	142
4. Estudio de la replicación viral <i>in vitro</i>	143
5. Composición de la estructuras tubulares	145
5.1. Separación de la estructuras tubulares	145
5.2. Análisis del contenido proteico	146
5.3. Análisis del contenido genómico	147
6. Análisis de las secuencias	149
7. Expresión proteica y morfogénesis <i>in vitro</i>	155
DISCUSIÓN	157
CAPÍTULO 4. Coinfección y recombinación en birnavirus marinos del Flemish Cap	
Resumen	169
Abstract	170
INTRODUCCIÓN	171
MATERIALES Y MÉTODOS	173
1. Secuenciación de los segmentos genómicos	173
2. Análisis de las secuencias	173
RESULTADOS	175

1. Análisis de las secuencias	175
2. Análisis filogenético	176
DISCUSIÓN	178
CONCLUSIONES	185
BIBLIOGRAFÍA	189
APÉNDICE	215
PUBLICACIONES	223

El objetivo inicial de esta Tesis Doctoral ha sido completar el conocimiento del estado sanitario de la población del banco pesquero Flemish Cap, mediante el análisis epidemiológico de los peces capturados en la campaña de 1999.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo nos impulsaron a llevar a cabo un estudio molecular de los birnavirus detectados, con el fin de aumentar el conocimiento sobre su distribución y para tratar de comprender el mecanismo molecular que controla la aparición de un tipo morfogénico anómalo altamente representado en este ecosistema salvaje.

PRÓLOGO



La acuicultura, como actividad complementaria de la pesca, se ha realizado desde tiempos pretéritos y ha ido adquiriendo un creciente interés como fuente de recursos para la alimentación humana, debido al crecimiento de la población y a la disminución de las capturas de la pesca extractiva. La producción mundial de alimentos procedentes de la acuicultura se ha incrementado enormemente durante los últimos años; aunque en términos relativos la producción acuícola no llega a representar el 0,5% de la producción de alimentos, significa el 23,7% de la producción total de pescado, crustáceos y moluscos (FAO, 2000). Además, es uno de los sectores productores de alimento con mayor potencial de crecimiento y, tal y como prevé la FAO dentro de su estrategia para asegurar un suministro adecuado de alimentos, supone la única posibilidad de mantener la proporción de pescado en la dieta mundial (FAO, 2000). Actualmente, los avances tecnológicos y científicos se dirigen hacia el perfeccionamiento de las técnicas acuícolas encaminadas a la explotación comercial de nuevas especies y el aumento de la rentabilidad de los cultivos ya existentes. Todo ello “parece ser el comienzo de una revolución azul, comparable a la revolución verde del siglo XIX” (Anónimo, 2003).

Como todo ser vivo, los peces son susceptibles de padecer enfermedades infecciosas. Si bien en poblaciones naturales los peces pueden verse afectados por agentes patógenos, en condiciones de cultivo, donde los individuos están sujetos a factores estresantes (monocultivos, espacio limitado, elevadas densidades, pobre calidad del agua, manejo y cambios en la salinidad y temperatura del agua), las alteraciones patológicas pueden convertirse en problemas muy serios y epizoóticos. De hecho, en acuicultura las pérdidas causadas por enfermedades infecciosas representan aproximadamente el 10% del total de la producción. Asimismo, estas enfermedades pueden extenderse rápidamente a un elevado número de hospedadores. Además, es

posible que algunos aspectos de la homogeneidad genética (debidos, entre otras causas, a la ausencia de selección natural) incrementen la susceptibilidad en poblaciones de animales creadas artificialmente. Entre los patógenos de peces, son los virus los agentes hacia los cuales existe un mayor temor por parte de los responsables de las plantas de cultivo, básicamente por la ausencia de herramientas eficaces de prevención y tratamiento, lo que implica que, de desarrollarse y extenderse una patología viral en una piscifactoría, la única solución es su cierre y desinfección.

Aunque la virología de peces es una ciencia relativamente reciente, el número de virus conocidos en animales acuáticos se ha visto incrementado enormemente en los últimos años. Debido al rápido desarrollo de la acuicultura, la mayoría de los agentes virales conocidos hasta ahora fueron detectados en peces de cultivo. Sin embargo, cada vez es mayor el interés por conocer cuál es la presencia de virus en el medio salvaje. En este sentido, se ha demostrado que muchos de estos virus detectados en acuicultura pueden persistir durante largos periodos de tiempo en el sedimento o pueden infectar a diferentes animales acuáticos actuando en ambos casos como reservorios y propagar la enfermedad a especies susceptibles por ingestión, a través del agua o mediante parásitos (Mulcahy y col., 1990; Castric y col., 1992; Armstrong y col., 1993; Rivas y col., 1993; Meyers y col., 1992, 1994; Meier y col., 1994; ICES, 1997; Traxler y col., 1997).

De todos modos, aunque siempre es tentador buscar un responsable, en este caso es difícil determinar cuál de los dos tipos de poblaciones, salvaje o en cultivo, es la causa y cuál la consecuencia de la presencia de determinados virus; sólo en algunos casos, determinados autores han podido emitir una conclusión fiable en este sentido. Así, en 1979 Amin llevó a cabo una revisión del estado sanitario de peces de varios lagos de Wisconsin (EEUU), encontrando el virus de la linfocistis, que ya había sido aislado anteriormente en algunos peces de otros lagos, sugiriendo que la expansión de

las infecciones linfocísticas en aguas libres de ellas estaba asociada con el trasvase de peces entre estos lagos. Otro ejemplo es el estudio epidemiológico llevado a cabo por Konrad y col. (1984) a lo largo de un río en cuya cabecera había una laguna con una población de peces salvajes con septicemia hemorrágica viral (VHS) endémica, y a lo largo del cual se encontraban dos piscifactorías con historial de epizootias por VHS. Debido a la semejanza entre las cepas de ambos orígenes (de laguna y de las piscifactorías), y en base a la existencia de un embalse que impedía el flujo de peces río arriba hasta la laguna, los autores concluyeron que el origen de las epizootias en las piscifactorías era debida al virus endémico de las poblaciones naturales.

En otros casos se puso de manifiesto el origen marino de determinados virus de riesgo en la acuicultura continental. En este sentido, la transmisión del arenque al salmón en condiciones experimentales, del virus de la necrosis eritrocítica viral (VEN), que afecta principalmente a peces marinos salvajes, así como a especies anádromas, indica la posibilidad de una fuente de origen marino en la infección de los peces anádromos de cultivo (Wolf, 1988). Otro ejemplo es el iridovirus del esturión blanco (WSIV), que es considerado enzoótico en las poblaciones del Pacífico noroeste (Hedrick y col., 1990). Por su parte, en el área de distribución del virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) son comunes los salmónidos salvajes infectados con el virus, pero sin contraer la enfermedad, sugiriendo que infecciones de carácter asintomático o leve pueden ser frecuentes en el medio salvaje (Nylund y col., 1999; Devold y col., 2000; Raynard y col., 2001). Nylund y col. (2003), en un reciente artículo, proponen una nueva hipótesis según la cual la variedad virulenta del virus ISAV se origina en peces salvajes que transmiten el virus a los peces en cultivo, y la frecuencia con que rebrota la enfermedad refleja probablemente la variación en la prevalencia de este virus en las poblaciones naturales de salmónidos. Según este

estudio, además, la transmisión de ISAV de salmónidos cultivados a salvajes ocurre menos frecuentemente que la transmisión de salmónidos salvajes a cultivados debido a una baja proporción de individuos salvajes susceptibles.

En otros casos la presencia en piscifactorías de determinados virus, como VHSV o birnavirus acuáticos, se ha achacado a una probable transmisión a través del alimento, compuesto por peces salvajes en los que también se habían detectado estos virus (Takano y col., 2000, 2001).

A pesar de que el estudio de virus de poblaciones naturales facilitaría la prevención y el control de las epizootias, hay muy pocos datos de epizootias naturales en comparación con los disponibles en la acuicultura. Esto es comprensible si se tiene en cuenta que los estudios epizooticos son más fáciles de llevar a cabo en la acuicultura, debido, en primer lugar, al cuidado y vigilancia diaria aplicada en piscifactorías, en segundo lugar a que las mortalidades y morbilidades son difíciles de medir en poblaciones salvajes, y en tercer lugar a que la selección natural se orienta directamente sobre los individuos debilitados por una infección microbiana.

Basándose en los resultados expuestos por algunos autores (Reno y Nicholson, 1981; Smail, 1995), según los cuales se encontraron virus en zonas muy alejadas de la costa, es tentador lanzar la hipótesis de que determinadas infecciones virales en acuicultura podrían ser introducidas por bancos de peces salvajes. El uso de ejemplares de peces salvajes para la iniciación del cultivo intensivo de nuevas especies podría ser otra posible vía para la introducción de virus en la acuicultura. Es bien conocido que los peces salvajes son más resistentes y tolerantes a ciertas enfermedades, lo que puede tener una base genética (Nylund y col., 1995; Gjedrem, 1997); de este modo, nuevos virus pueden estar esperando que se den las condiciones especiales características del cultivo de peces (ambiente estresante, poblaciones densas, etc) para infectar estas

especies, o podrían ser transmitidos a otras especies de peces más susceptibles. El efecto que estos virus, algunos aún desconocidos, podría tener en la acuicultura sería devastador. Aunque algunas cepas virales aisladas de peces salvajes muestran una virulencia menor que aquellas procedentes de piscifactorías, la elevada frecuencia de mutación que estos virus presentan hace que sea relativamente fácil la pérdida o la supresión de un fenotipo avirulento (Macadam y col., 1989; Fields y col., 1996; Stone y col., 1997).

Por otra parte, existe una demostrada influencia de las piscifactorías sobre los peces de poblaciones naturales, que en ocasiones puede amenazar la supervivencia de los grupos de peces salvajes más frágiles. De hecho, las piscifactorías representan una fuente de contaminantes químicos y biológicos que afectan a la calidad del medio. Según algunos autores estas alteraciones sólo afectan a una zona limitada de las inmediaciones de la piscifactoría (Lumb, 1989; McVicar, 1997), e incluso en algunos casos se confirmó la baja influencia que las piscifactorías con infecciones virales tienen sobre el medio (Bucke y col., 1979; Giraud y col., 1994). Con todo, otros autores han publicado que la salud de los peces de zonas costeras degradadas antropogénicamente es más pobre (Murchelano, 1990) y en algunos casos incluso se demostró la existencia de semejanzas a nivel genético entre virus de peces salvajes y virus que ocasionan epidemias en piscifactorías (Stone y col., 1997; Snow y col., 1999; Cutrín y col., 2004). Además se han aislado virus semejantes a los de las epizootias continentales en reservorios situados en los ríos a 2 kilómetros de las piscifactorías (Rivas y col., 1993).

Por tanto, el impacto de la contaminación viral en el medio a través de descargas de agua y de los peces que se escapan debe ser considerado un asunto de interés. Así, a causa de tormentas o de errores humanos, en la última década un millón de salmones atlánticos se han escapado de granjas y se han aclimatado a la costa noroeste de

América, y hay fiordos en Noruega en los que el 90% de los peces provienen de fugas de granjas. Estos peces suponen un grave problema ecológico y pueden “contaminar” a los peces salvajes, amenazando así su supervivencia (DFO, 1999).

Las medidas profilácticas para evitar la dispersión de patógenos de peces incluyen la exigencia de un certificado ictiosanitario con el objeto de disciplinar el transporte de peces y el requerimiento de que, a cada nueva adquisición de lotes de peces o huevos por parte de los piscicultores, aquellos se sometan a un baño aséptico y a un periodo de cuarentena. Asimismo, el estudio de los mecanismos de dispersión de los patógenos y la secuencia de eventos que conducen a la infección y posterior desarrollo de una enfermedad es crucial para lograr una prevención y un control eficaz de esas enfermedades. En este sentido, el presente estudio nació con la idea de cubrir un hueco en el ámbito de conocimiento de la Ictiopatología Viral, como es el análisis virológico de peces procedentes de poblaciones naturales. El análisis de los virus que parasitan los peces de forma natural, peces alejados de sufrir cualquier posible manipulación humana, salvo aquella meramente extractiva, como es la pesca, nos permitirá tener un conocimiento más profundo de la virología de peces, antes y después de la intervención humana, y evaluar su posible efecto en condiciones de cultivo.

CAPÍTULO 1

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE VIRUS EN EL BANCO PESQUERO FLEMISH CAP (TERRANOVA)



RESUMEN

En el presente estudio se analizaron un total de 250 peces sin síntomas aparentes de enfermedad, pertenecientes a 8 especies: gallineta (*Sebastes mentella*), fletán negro (*Reinhardtius hippoglossoides*), platija americana (*Hippoglossoides platessoides*), coreano (*Glyptocephalus cynoglossus*), bacalao (*Gadus morhua*), granadero (*Macrourus berglax*), perro del norte (*Anarhichas lupus*) y *Antimora rostrata* que se capturaron en el transcurso de una campaña de investigación pesquera realizada a bordo del buque oceanográfico Cornide de Saavedra en aguas de Terranova, en el banco pesquero Flemish Cap, durante los meses de junio y julio de 1999.

El análisis virológico de muestras de tejido de esos peces permitió el aislamiento de 229 cepas en las líneas celulares CHSE-214, EPC, BB y TV-1, a partir de 85 muestras positivas. Estas cepas se sometieron a pruebas identificativas de carácter físico-químico (resistencia al cloroformo) y serológico (inmunodot), así como RT-PCR. Dado que con estas técnicas no se obtuvieron resultados concluyentes en muchos casos, 57 de estos aislados fueron sometidos a visualización mediante microscopía electrónica de transmisión. Este análisis reveló que, independientemente de la línea celular en la que se habían aislado, la mayoría de ellos presentaba una mezcla de birnavirus (con un diámetro de alrededor de 55 nm) y estructuras tubulares asociadas (con un diámetro de 50 nm aproximadamente y una longitud de 100 nm a 2 µm). Asimismo, se hallaron otras partículas virales en baja proporción (tipo picornavirus/nodavirus/calicivirus, flavivirus, coronavirus, arenavirus/paramixovirus y ortomixovirus/paramixovirus). Se discute la implicación biológica de la presencia de estos tipos virales novedosos en peces.

ABSTRACT

In the present study we have analyzed a total of 250 apparently healthy fish, belonging to 8 different species: deepwater redfish (*Sebastes mentella*), Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*), American plaice (*Hippoglossoides platessoides*), witch flounder (*Glyptocephalus cynoglossus*), Atlantic cod (*Gadus morhua*), onion-eye grenadier (*Macrourus berglax*), Atlantic wolf-fish (*Anarhichas lupus*) and blue antimora (*Antimora rostrata*). These fish were caught in the summer of 1999 during a marine research campaign carried out in the Flemish Cap fishery, close to Newfoundland.

The virological analysis of samples from these fish led to the isolation of 229 viral strains, from a total of 85 positive fish samples, in four different cell lines: CHSE-214, EPC, BB and TV-1. These strains were first identified by physical-chemical (chloroform resistance) and serological (immunodot) assays, as well as RT-PCR methods. Due to the non-conclusive results obtained in some cases with these methods, 57 of those isolates were subjected to visualization by transmission electron microscopy. This analysis revealed that, regardless of the cell line in which they had been isolated, most of them showed a mixture of birnaviruses-resembling icosahedral particles (with a diameter of around 55 nm) and associated tubular structures (with a diameter of approximately 50 nm and a length between 100 nm and 2 µm). In addition, viral particles resembling picornavirus/nodavirus/calicivirus, flavivirus, coronavirus, arenavirus/paramyxovirus and orthomyxovirus/paramyxovirus were also found in low proportions. The biological meaning of the presence of those new viruses in wild populations is discussed.

INTRODUCCIÓN

El control del estado sanitario de los peces confinados en granjas de cultivo ha permitido la detección y/o el aislamiento de numerosos virus, entre los que hay representantes de casi todas las familias de virus animales, siendo las más estudiadas *Iridoviridae* y *Herpesviridae* entre los virus de ADN, y *Birnaviridae* y *Rhabdoviridae*, entre los virus de ARN.

Los virus se pueden transmitir a través del agua, de la orina, de los productos sexuales, mediante invertebrados acuáticos, parásitos sanguíneos, por las heces de aves piscívoras o mediante los aparejos de los pescadores. Por otra parte se ha demostrado la interacción piscicultura-bancos salvajes, tanto mediante la transmisión de peces cautivos a salvajes (Munro y col., 1976; McAllister y Bebak, 1997; Raynard y col., 2001), como en la dirección opuesta, de peces salvajes a cultivados (Konrad y col., 1984; Rowley y col., 2001).

Los aislamientos de virus a partir de peces salvajes se han atribuido normalmente al contacto con descargas o productos de piscifactorías (Amend y col., 1984; Konrad y col., 1984; Snow y col., 1999; Takano y col., 2000; Rowley y col., 2001) debido a que la mayoría de los análisis se realizan en las proximidades de estas instalaciones. De acuerdo con algunos autores, niveles bajos de exposición vírica no suponen un riesgo significativo para los peces que viven en condiciones naturales, porque sus mecanismos de defensa pueden controlar eficazmente estos niveles (McAllister y Bebak, 1997). Sin embargo, infecciones víricas clínicamente inaparentes pueden debilitar la resistencia a otros agentes infecciosos y suponen un riesgo de distribución de estos patógenos debido al movimiento de los animales. Además, si el agente alcanza poblaciones sanas que no han tenido contacto previo con el patógeno, puede ocasionar elevadas mortalidades en esas poblaciones de peces.

Aunque se ha culpado de la distribución de los virus en el medio a las actividades relacionadas con la acuicultura, se sabe desde hace tiempo que los virus parasitan naturalmente los peces salvajes y cohabitan con ellos en equilibrio, estando su relación gobernada por las leyes parásito-hospedador. Sin embargo, con la excepción de algunas enfermedades virales fácilmente observables por el desarrollo de síntomas clínicos macroscópicos, como hiperplasia de la piel, hemorragias o úlceras, el resto de las dolencias comunes en peces salvajes son raramente reconocibles por el hombre y pueden pasar desapercibidas en poblaciones salvajes.

A pesar de la dificultad de llevar a cabo estudios sobre peces salvajes, existe una clara necesidad de examinar poblaciones naturales y determinar qué virus las parasitan para conocer el impacto que estos parásitos podrían tener si se somete a estos peces a condiciones de cultivo intensivo. Al verse confinados y controlados artificialmente, el equilibrio natural se rompe, facilitando el desarrollo de enfermedades fulminantes, debido, sobre todo, a que el sistema inmune de los peces se deprime como consecuencia del estrés que la cautividad les ocasiona.

En este sentido, y con la intención de realizar un análisis virológico exhaustivo de una población natural de peces, llevamos a cabo un estudio epidemiológico en el banco pesquero Flemish Cap (Terranova). Debido a que España y Portugal son los países de la UE más directamente interesados en los caladeros del Flemish Cap, desde 1988 el Instituto de Investigaciones Mariñas (CSIC) y el Instituto Español de Oceanografía (IEO) de Vigo, junto con el Instituto de Investigaçã das Pescas e do Mar (IPIMAR) de Portugal realizan campañas anuales de investigación pesquera en este banco - en el que se pescó tradicionalmente bacalao y peces planos y, más recientemente, gallineta, fletán negro y camarón - con el objeto de estimar la abundancia de las poblaciones de peces demersales y analizar la estructura de las más

importantes a través de una prospección aleatoria estratificada de pescas de arrastre de fondo.

En el año 1994, dos miembros de nuestro equipo participaron por primera vez en una campaña de ese tipo (Flemish Cap 94). Cinco años más tarde, debido a los interesantes resultados obtenidos en esa expedición, me uní a la tripulación del Cornide de Saavedra (Flemish Cap 99), con el fin de ampliar ese estudio inicial con la toma de más muestras y de un número mayor de especies de peces.

1. Descripción del banco pesquero

Flemish Cap (FC) es una pesquería atlántica localizada en aguas internacionales próximas al mar de Labrador, centrado a 47,5° N, 45° O y con una superficie de 10.555 millas cuadradas. Su situación, aislado de la plataforma costera americana y lejos de toda zona económica, en particular más allá de las 200 millas canadienses, hace de este banco pesquero una zona donde las actividades humanas se limitan a la meramente extractiva, estando la explotación de sus recursos regulada en función de los acuerdos internacionales de la NAFO (*Northwest Atlantic Fisheries Organization*) (Figura 1.1). Un estrecho cañón de unos 1.100 m de profundidad, denominado Flemish Pass, separa este caladero de los grandes bancos de Terranova y le confiere un cierto carácter de aislamiento, lo que en principio llevó a creer que las poblaciones de este banco eran independientes al ver limitada su migración (Lavender y col., 2000). Sin embargo, estudios recientes abogan por la existencia de un modelo migratorio para algunas especies que habitan en el Flemish Cap (Roques y col., 2002; de Cárdenas, 2004).

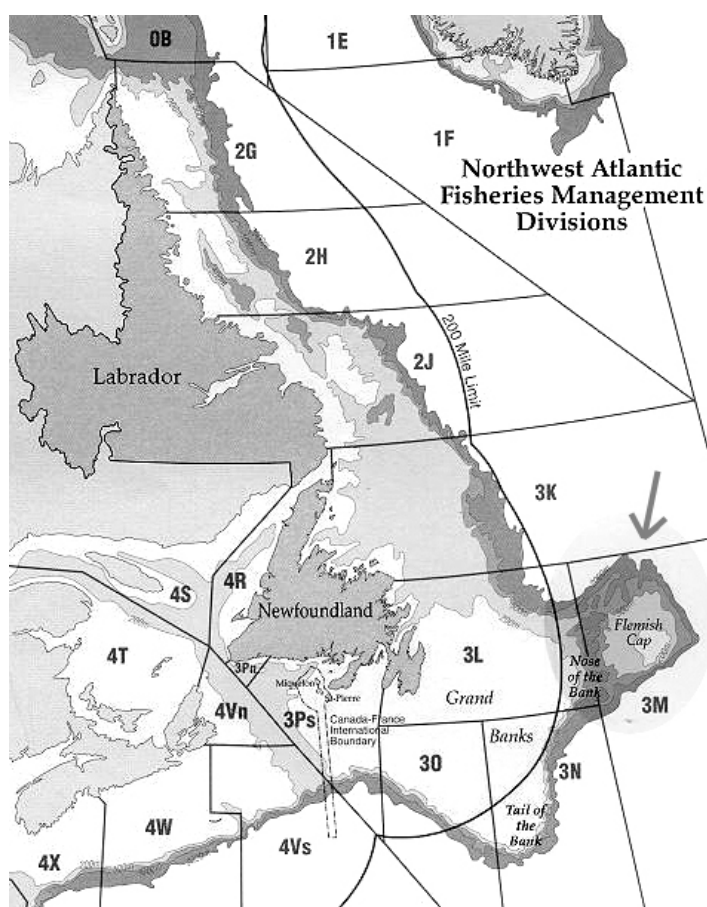


Figura 1.1. Situación geográfica del banco pesquero Flemish Cap, donde se tomaron las muestras para este estudio.

2. Descripción de los peces analizados

Se capturaron peces, aparentemente sanos, en varios transectos de rastreo, entre los 179 y los 668 m de profundidad, pertenecientes a 8 especies diferentes (Figura 1.2):

- Gallineta (Orden *Scopaeiformes*, familia *Sebastidae*)
- Platija americana, fletán negro y coreano (Orden *Pleuronectiformes*, familia *Pleuronectidae*)
- Bacalao, *Antimora rostrata* y granadero (Orden *Gadiformes*, familias *Gadidae*, *Moridae* y *Macrouridae*, respectivamente)
- Perro del norte (Orden *Perciformes*, familia *Anarhichadidae*)

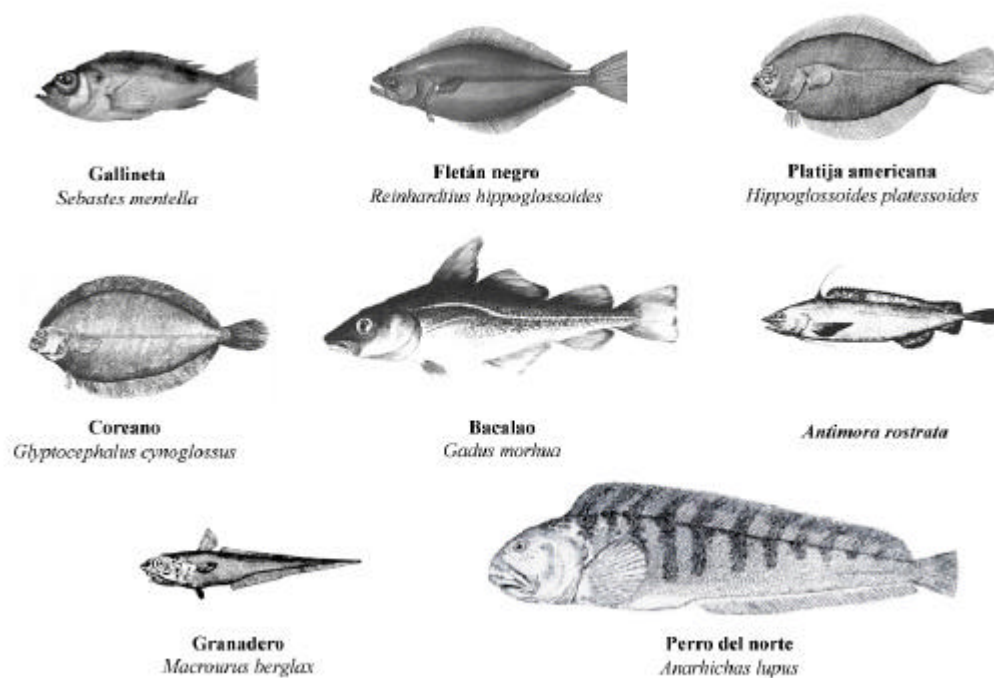


Figura 1.2. Peces analizados en el presente estudio.

A continuación describimos, brevemente, la distribución de estas especies, las cuales pueden ser pescadas en diferentes localizaciones además de en el Flemish Cap (Figura 1.3).

Gallineta (*Sebastes mentella*). Habita en aguas profundas (de 30 a 100 m) sobre todo en fondos rocosos de 300 a 500 m, con un estilo de vida gregario (Hureau y Litvinenko, 1986). Se encuentra en el Atlántico este: mar de Noruega, desde las islas Lofoten hasta las costas de Spitsbergen y también en la parte sur del mar de Barents, en Islandia y en Groenlandia. En el Atlántico oeste viven a lo largo de la costa de Canadá (desde la bahía de Baffin hasta Nueva Escocia) (Robin y Ray, 1986).

Fletán negro (*Reinhardtius hippoglossoides*). Se captura frecuentemente a niveles pelágicos (los jóvenes de 50 a 200 m; los adultos de 200 a 2000 m), en el Ártico

y también en el Pacífico norte: mar de Japón, Alaska, en las islas Aleutianas y al sudeste y norte de Baja California, México. En el Atlántico norte vive desde Nueva Jersey (EEUU) hasta Spitsbergen (islas Svalbard) y desde el sur del mar de Barents hasta Irlanda (Nielsen, 1986).

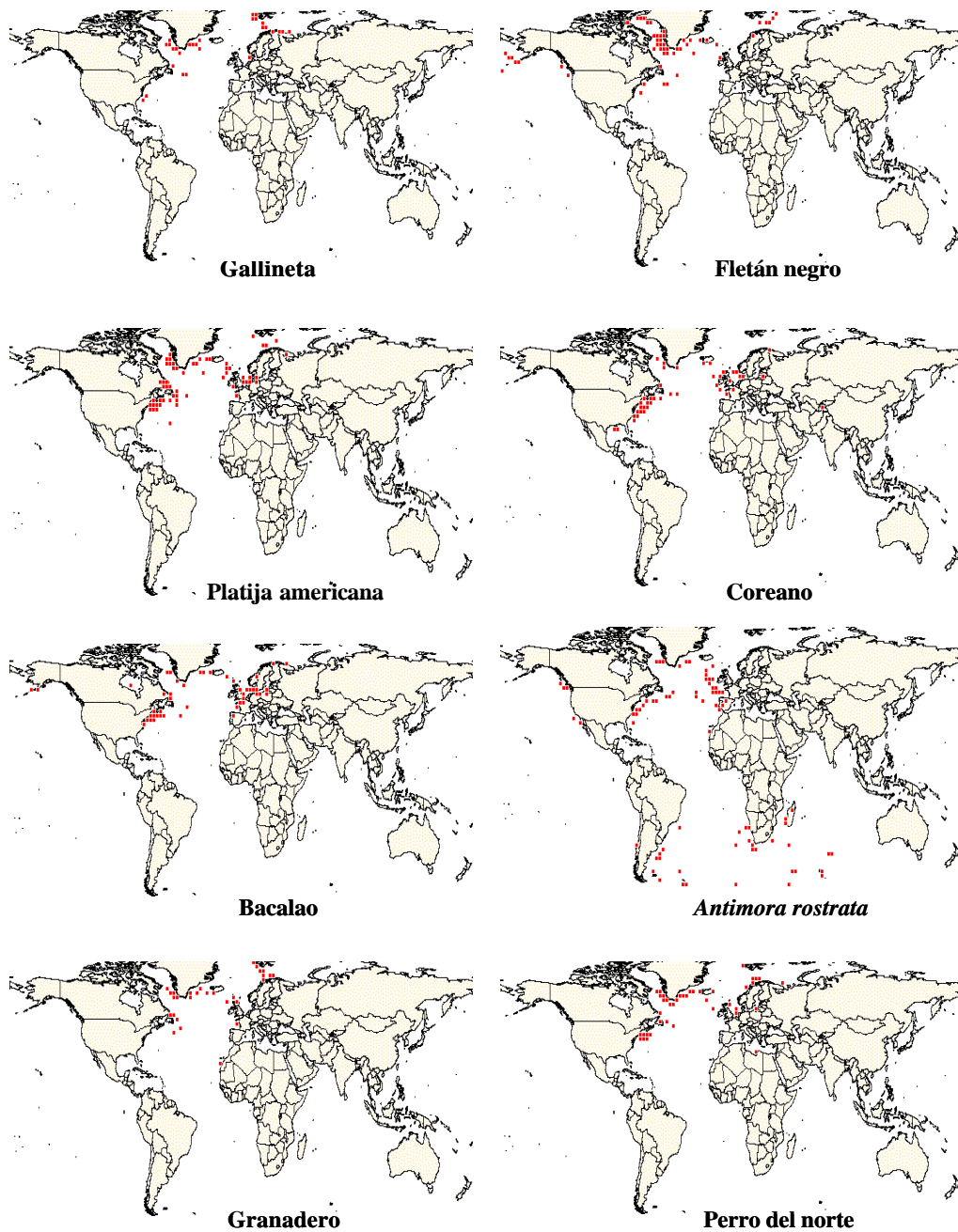


Figura 1.3. Mapas de distribución de los peces empleados en este estudio. Los puntos rojos indican los lugares donde estos peces han sido capturados (tomado de www.fishbase.org).

Platija americana (*Hippoglossoides platessoides*). Abunda predominantemente a profundidades de entre 90 y 250 m y en fondos blandos (Bowering y Brodie, 1991). Vive en el Atlántico Este, en la costa este de Groenlandia y desde el canal de la Mancha a la costa de Murmansk, así como en el Atlántico Oeste, al sur de Labrador en Canadá y desde el oeste de Groenlandia hasta la isla Rhode en EEUU (Robin y Ray, 1986).

Coreano (*Glyptocephalus cynoglossus*). Habita en fondos blandos y fangosos de aguas bastante profundas (de 50 a 300 m, e incluso a 1.500 m) (Frimodt, 1995). En el Atlántico este vive desde el norte de España hasta el norte de Noruega y en el Atlántico oeste desde el golfo de San Lorenzo y los grandes bancos de Canadá hasta el norte de Carolina en EEUU (Robin y Ray, 1986).

Bacalao (*Gadus morhua*). Es un pez oceánico, ampliamente distribuido en una gran variedad de hábitats, desde aguas próximas a la costa hasta aguas profundas de la plataforma continental (se mantiene generalmente de 30 a 200 m de profundidad) (Frimodt, 1995). En el Atlántico norte vive desde el cabo de Hatteras hasta la bahía de Ungava a lo largo de la costa norteamericana, en el este y oeste de Groenlandia, alrededor de Islandia y en las costas de Europa desde el golfo de Vizcaya hasta el mar de Barents, incluyendo la región que circunda la isla Bear. Las poblaciones más importantes están en el ártico noruego, en el mar de Barents y el de Islandia; las poblaciones de Groenlandia y Terranova se han reducido dramáticamente (Muus y Nielsen, 1999).

***Antimora rostrata*.** Habita en todos los océanos excepto el Pacífico norte. Es una especie bentónica, que habita en las pendientes del talud continental y en los fondos abisales (de 650 a 2.700 m) (Cohen, 1986).

Granadero (*Macrourus berglax*). Se encuentra comúnmente a profundidades de 300-500 m. En el Atlántico norte habita desde el cañón de Norfolk y el banco de

George hasta Labrador, el estrecho de Davis, este y oeste de Groenlandia, Islandia, y desde la plataforma atlántica del norte de Irlanda hasta las islas Faroe, la costa noruega, hasta Spitsbergen, y el mar de Barents (Cohen y col., 1990).

Perro del norte (*Anarhichas lupus*). Habita en suelos rocosos; en ocasiones arenosos o fangosos, a 1-500 m de profundidad y en solitario (Frimodt, 1995). Vive en el Atlántico Nordeste (sur de Spitsbergen hasta el mar Blanco, las costas escandinavas, el mar del Norte, las islas Británicas, Islandia y la costa sudeste de Groenlandia), así como en el Atlántico Noroeste (sur de Labrador en Canadá y oeste de Groenlandia hasta el cabo Cod en Massachusetts, EEUU; raramente en Nueva Jersey) (Robin y Ray, 1986).

Debido a su importancia económica, los peces incluidos en el presente estudio (excepto *A. rostrata*) son objeto de captura en las pesquerías del norte del océano Atlántico, especialmente el fletán negro, la gallineta y la platija americana. En cuanto a su interés para la acuicultura, el perro del norte es una de las nuevas especies experimentales (Pavlov y col., 1997; Bjerkås y col., 1998; McCarthy y col., 1999), mientras que el bacalao está convirtiéndose en una importante especie para el cultivo intensivo (Kristiansen y col., 2000), y es “la gran esperanza blanca” de los productores de salmón europeos, que sufren una dura competencia por parte de los eficientes productores chilenos. Además el fletán atlántico, un pariente cercano del fletán negro, es una especie que ya se cultiva con éxito en la actualidad (Harboe y col., 1998; Karlsen y col., 1998; Mangor-Jensen y col., 1998; Opstad y col., 1998; Terjersen y col., 1998).

3. Principales familias virales que afectan a peces en condiciones naturales

A continuación presentamos un compendio de las 12 principales familias de virus descritos en poblaciones naturales de peces: 3 de virus ADN (familias *Iridoviridae*, *Herpesviridae* y *Adenoviridae*) y 9 de virus ARN (familias *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Retroviridae*, *Caliciviridae*, *Picornaviridae*, *Nodaviridae*, *Reoviridae* y *Birnaviridae*).

3.1. VIRUS ADN

3.1.1. Familia *Iridoviridae*

Esta familia comprende virus de simetría icosaédrica, con un diámetro que oscila entre 120 y 350 nm. Generalmente poseen una envuelta, que no proviene de la membrana de la célula huésped, sino que se forma *de novo*. Consta de cuatro géneros: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus* y *Lymphocystivirus* e incluye además un virus no adscrito a ningún género, el “goldfish virus 1” (van Regenmortel y col., 2000).

Durante los últimos años, varios virus tipo-iridovirus han sido reconocidos como causantes de severas enfermedades sistémicas en peces salvajes, cultivados y ornamentales. Entre las más conocidas, se deben citar la necrosis eritrocítica viral (VEN, *Viral Erythrocytic Necrosis*), causada por el virus VENV, y la linfocistis causada por el virus de la linfocistis (LCDV, *Lymphocystis Disease Virus*).

Además han sido descritos otros iridovirus como el que causa el síndrome ulceroso de bacalao de las costas de Dinamarca (Jensen y Larsen, 1982), el iridovirus del pez rojo (*Carassius auratus*) (Berry y col., 1983; Wolf, 1988), el iridovirus del esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) (WSIV, *White Sturgeon Iridovirus*) (Hedrick y col., 1990) y el de la perca americana (*Micropterus salmoides*) (LMBV: *Largemouth Bass Virus*) (Essbauer y Ahne, 2001; Grizzle y col., 2002) en

Norteamérica, así como el iridovirus de la perca europea (*Perca fluviatilis*) que afectó a percas del sudeste de Australia (Langdon y col., 1986).

Virus de la necrosis eritrocítica. La enfermedad causada por este virus, VEN, anteriormente denominada PEN (*Piscine Erythrocytic Necrosis*), afecta principalmente a peces marinos salvajes y, en segundo lugar, a especies anádromas, aunque Sherburne y Bean (1979) describieron la existencia de esta enfermedad en cultivos de eperlano americano (*Osmerus mordax*), un pez de agua dulce.

Desde la primera descripción de este virus en 2 especies marinas capturadas en la costa atlántica de Norteamérica: bacalao (*Gadus morhua*) y espinoso atlántico (*Myoxocephalus octodecemspinosus*) (Laird y Bullock, 1969; Walker, 1971) el virus se ha detectado en Canadá, Terranova, Groenlandia, Reino Unido y en la costa portuguesa, y en otras especies como arenque atlántico (*Clupea harengus harengus*), sábalo (*Alosa pseudoharengus*), salmón del Pacífico (*Oncorhynchus tshawytscha*), lorcho (*Blennius pholis*), mugil común (*Mugil cephalus*), platija europea (*Platichthys flesus*), lamprea marina (*Petromyzon marinus*) y lirio (*Micromessistius poutassou*) (Sherburne, 1973, 1977; Bell y Margolis, 1976; Evelyn y Traxler, 1978; Smail y Egglestone, 1980; Reno y Nicholson, 1981; Kahn y Newman, 1982; Eiras, 1984; Sherburne, 1984; Eiras y Santos, 1992).

Virus de la linfocistis. Este virus pertenece al género *Lymphocystivirus*, siendo la cepa tipo de este género el aislado LCDV-1 de solla (*Pleuronectes platessa*). Numerosas especies de peces que juegan un importante papel en pesquerías y piscifactorías son muy susceptibles a la infección por LCDV; así, la enfermedad de la linfocistis ha sido descrita en más de 100 especies de peces en todo el mundo (Wolf,

1988). Las primeras descripciones de este virus en peces salvajes se produjeron a comienzos de la década de los 70 en lorchos (*Hypsoblennius spp.*) (Stephens y col., 1970) y lubina estriada (*Roccus saxatilis*) en EEUU (Krantz, 1970), corbina (*Micropogon undulates*) y corbina de arena (*Cynoscion arenarius*) del golfo de México (Christmas y Howse, 1970) y *Cynoscion spp.* en Georgia (EEUU) (Smith, 1972), y en peces planos del mar del Norte (Mann, 1970; Perkins y col., 1972) y platijas juveniles de Escocia (Roberts, 1970).

En Norteamérica y Europa es larga la lista de especies salvajes a partir de las que se ha aislado este virus, que también ha sido aislado en Japón, a partir de lubina (*Lateolabrax japonicus*) (Miyazaki y Egusa, 1972), en África en peces cíclidos de lagos del este africano (*Tilapia amphimelas*, *T. esculenta*, *T. variabilis*, *Haplochromis spp.* y *H. Elegans*) (Paperna, 1973), y en Australia en *Macropodus opercularis* (Ashburner, 1975) y dorada australiana (*Pagrus auratus*) (Durham y col., 1996).

3.1.2. Familia *Herpesviridae*

Los herpesvirus son viriones envueltos de morfología cuasiesférica, con un diámetro que oscila entre 100 y 200 nm y cuya cápside icosaédrica tiene 100-110 nm de diámetro. Esta familia comprende 9 géneros que se agrupan en 3 subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*, y un género independiente denominado Virus Ictalúricos tipo Herpes, en el que se incluyen los herpesvirus que afectan a peces (van Regenmortel y col., 2000).

Los herpesvirus inducen diversas enfermedades en el hospedador, desde infecciones de carácter subclínico hasta severos síndromes hemorrágicos acompañados de elevadas mortalidades; además su potencial oncogénico ha sido puesto de manifiesto por varios autores (Kimura y col., 1981; Sano y col., 1983).

Sólo una minoría de herpesvirus ha sido detectados en peces salvajes. La primera de estas detecciones se produjo en Canadá y en EEUU, donde se observaron lucios (*E. lucius* y *E. masquinongy*) con hiperplasias epidérmicas (Yamamoto y col., 1983; Wolf, 1988) causadas por el herpesvirus EsHV-1 (*Esocid herpesvirus 1*) (Roizman y col., 1981). Otros virus conocidos son el *Herpesvirus vitreum* (PeHV-1, *Percid herpesvirus-1*), aislado a partir de lucioperca con hiperplasia epidérmica en cuencas de Canadá (Wolf, 1988), y el *Herpesvirus scophthalmi* (PIHV-1, *Pleuronectid herpesvirus 1*), detectado en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) de Escocia y Dinamarca, tanto en poblaciones naturales como en peces cultivados (Bloch y Larsen, 1993).

Además hay numerosas referencias relativas a la implicación de los herpesvirus en diferentes síndromes o a la detección de partículas tipo herpesvirus en distintas especies de peces, como bacalao del Pacífico (*Gadus macrocephalus*) en el mar de Bering (McArn y col., 1978; Wolf, 1988), eperlanos europeos (*Osmerus eperlanus*) mostrando papilomatosis en el mar Báltico y en EEUU (Anders, 1989; Morrison y col., 1996) y eperlano americano con tumores epiteliales en EEUU (Herman y col., 1997). En 1989 Miyazaki y col. detectaron mortalidades masivas causadas por un herpesvirus en falso fletán japonés (*Paralichthys olivaceus*), que padecían la denominada necrosis epidérmica viral (VENF, *Viral Epidermal Necrosis of Flounders*). También se han encontrado partículas tipo-herpesvirus en macrófagos de *angelfish* (*Pterophyllum altum*), importados a Dinamarca del Amazonas (Mellegard y Bloch, 1988).

3.1.3. Familia *Adenoviridae*

Los adenovirus son virus sin envuelta, icosaédricos y con un diámetro que oscila entre 70-90 nm. Esta familia comprende los géneros *Mastadenovirus* y *Aviadenovirus*,

aunque los adenovirus de vertebrados inferiores no se han asignado a ninguno de estos géneros (van Regenmortel y col., 2000).

Varias partículas tipo-adenovirus han sido aisladas de peces salvajes. El primer aislamiento de este tipo se llevó a cabo en Noruega, a partir de bacalao (Jensen y Bloch, 1980). También se han asociado con un adenovirus las elevadas mortalidades que afectaron al esturión blanco en California (Ghittino y Ghittino, 1985; Wolf, 1988). Anders (1988) describió infecciones causadas por adenovirus en limandas del mar del Norte, que exhibían hiperplasia o papilomas. Por último, Miyazaki y col. (2000) describieron partículas tipo-adenovirus asociadas con leucemia linfocítica, en doradas japonesas.

3.2. VIRUS ARN

3.2.1. Familia *Orthomyxoviridae*

Los ortomixovirus son virus esféricos o pleomórficos, de 80-120 nm de diámetro, incluyendo una envuelta con proyecciones glicoproteicas (de 10-14 nm de largo y 4-6 nm de diámetro). Esta familia contiene los géneros *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C* y *Thogotovirus*. Los virus de peces no han sido aún incluidos en esta clasificación (van Regenmortel y col., 2000).

La única detección de ortomixovirus en un pez no salmónido se realizó en anguilas (*Anguilla anguilla*) de Alemania, y se denominó virus sincitial de la anguila (EV, *Eel Syncitial Virus*) (Wolf, 1988). No obstante, el ortomixovirus más conocido es el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV, *Infectious Salmon Anaemia Virus*), de gran importancia económica debido a las pérdidas que ocasiona en los cultivos de salmón atlántico (*Salmo salar*), su principal especie susceptible (Thorud y Djupvik, 1988). Basándose en su secuencia genómica, Krossøy y col. (1999), propusieron que

ISAV formase parte de un nuevo género de la familia *Orthomyxoviridae*, el género *Aquaorthomyxovirus*.

El ISAV se ha aislado a partir de salmones atlánticos en Noruega (Dannevig y col., 1995), Canadá (Byrne y col., 1998; Mullins y col., 1998) y Escocia (Rodger y col., 1998) y recientemente ha sido aislado a partir de salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*) en Chile, lejos de las áreas donde ISAV había sido detectado anteriormente (Kibenge y col., 2001).

La infección se extiende por las corrientes marinas, aunque también a través del contacto con peces salvajes infectados (Rimstad y Mjaaland, 2002). De hecho, en el área de distribución de ISAV son comunes los salmónidos salvajes portadores asintomáticos, sugiriendo que infecciones de carácter asintomático o leve pueden ocurrir con cierta frecuencia en poblaciones salvajes (Nylund y col., 1999; Devold y col., 2000; Raynard y col., 2001).

3.2.2. Familia *Paramyxoviridae*

Los paramixovirus son virus envueltos de 125-250 nm de diámetro. La familia consta de 5 géneros denominados *Respirovirus*, *Morbillivirus*, *Rubulavirus*, *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*, no incluyendo ninguno a los paramixovirus de peces (van Regenmortel y col., 2000). Se han aislado partículas tipo-paramixovirus en poblaciones salvajes de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y de lucio (Neumann y col., 1986), así como de salmones chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) remontando el río en Oregón, EEUU (Winton y col., 1985), durante el desarrollo de análisis rutinarios, lo cual hace suponer que los salmones probablemente se hubiesen infectado en el océano.

3.2.3. Familia *Rhabdoviridae*

Los viriones de esta familia poseen una característica forma de bala con una longitud de 100-430 nm de longitud y 45-100 nm de diámetro. La familia se compone de 6 géneros: *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus* y *Novirhabdovirus* (van Regenmortel y col., 2000). Dos géneros de rhabdovirus son conocidos por infectar peces, *Vesiculovirus* y *Novirhabdovirus* (Walker y col., 2000), aunque son los miembros del género *Novirhabdovirus* los que tienen una mayor incidencia en la patología de peces, incluyendo el rhabdovirus del *snakehead* (SHRV, *Snakehead Rhabdovirus*) (Wattanavavijarn y col., 1986; Kasornchandra y col., 1992), el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV, *Infectious Haematopietic Necrosis Virus*) y el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV, *Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus*). Por otra parte, se han aislado virus tipo rhabdovirus de bramas salvajes (*Abramis brama*) durante un brote de enfermedad que ocasionó grandes mortalidades en el norte de Irlanda, y posteriormente en poblaciones asintomáticas de peces en el mismo río, tanto de brama y rutilos (*Rutilus rutilus*) salvajes, como de trucha común (*Salmo trutta*) y de trucha arcoiris en cultivo (Rowley y col., 2001).

Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa. Es el agente causal de una devastadora y letal enfermedad que afecta a salmónidos cultivados y salvajes. El virus es enzoótico en el oeste de Norteamérica desde donde se ha extendido a Asia y a Europa. Las primeras detecciones de IHN en peces salvajes fueron realizadas en salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) de la Columbia Británica (Canadá) (Williams y Amend, 1976); y en varios puntos de la costa y lagos de Alaska (Grischkowsky y Amend, 1976; Traxler, 1983, 1986). Recientemente, nuestro equipo de investigación ha detectado virus

tipo-IHNV a partir de 2 especies de peces marinos - fletán negro y coreano - ambos capturados en el banco pesquero Flemish Cap (Terranova) (Bandín y col., 1997).

Virus de la septicemia hemorrágica viral. Este virus causa elevadas mortalidades en trucha arcoiris cultivada en Europa (Wolf, 1988), aunque en los últimos años se ha demostrado su presencia en un amplio espectro de especies hospedadoras, tanto marinas como de agua dulce.

Hasta principios de los 80, el virus había sido detectado casi exclusivamente en peces de cultivo. Los primeros aislamientos de VHSV a partir de peces salvajes se produjeron en Dinamarca a partir de bacalaos afectados por un síndrome ulceroso (Jensen y col., 1979), y en bancos salvajes de truchas arcoiris (Vestergård-Jørgensen, 1982). El virus se ha detectado en otros puntos del norte de Europa, mar Báltico, mar del Norte, Escocia, Alemania y Francia, y en una gran variedad de especies salvajes, que incluyen trucha común, lucio, coregono (*Coregonus spp.*), anguila, arenque atlántico (*Clupea harengus*), merlán (*Merlangius merlangus*), eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*), barbuda (*Rhinomenus cimbrius*), bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), pejerrey (*Argentina sphyraena*), lacha (*Sprattus sprattus*) y faneca noruega (*Trisopterus esmarkii*) (Enzmann y Konrad, 1984; Konrad y col., 1984; Ahne y Thomsen, 1985; Castric y col., 1992; Dixon y col., 1997; Mortensen y col., 1999; King y col., 2001).

El VHSV se ha aislado también en Norteamérica en bancos salvajes de salmón coho (Eaton y col., 1991), bacalao del Pacífico (Meyers y col., 1992, 1999), arenque del Pacífico (Meyers y col., 1994; Hershberger y col., 1999), merluza del Pacífico (*Merluccius productus*) y abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) (Meyers y col., 1999) y en el Flemish Cap (Terranova) a partir de fletán (Dopazo y col., 2002).

En Japón, se aisló VHSV a partir de falso fletán japonés salvaje asintomático (Takano y col., 2000, 2001), pero también en epizootias de la misma especie en cultivo (Isshiki y col., 2001). Más recientemente, se ha aislado VHSV a partir de lanzón japonés salvaje (*Ammodytes personatus*) (Watanabe y col., 2002). Dado que estos peces sirven de alimento crudo para los falsos fletanes japoneses en cultivo, parece probable una transmisión de VHSV a través del alimento.

Toda la información disponible hasta la fecha apoya la idea de un origen marino y salvaje del virus VHSV. De hecho, en 1999 Snow y col. comunicaron el aislamiento de cepas de VHSV alrededor de las islas Británicas, genéticamente relacionados con las cepas responsables de pérdidas en granjas de rodaballo; además, confirmaron la existencia de una relación entre las cepas marinas y las cepas que causaban gran mortalidad entre las truchas arcoiris continentales de Europa.

3.2.4. Familia *Retroviridae*

Los viriones son esféricos, envueltos y con un diámetro entre 80-100 nm. Las proyecciones glicoproteicas de la superficie tienen alrededor de 8 nm de longitud. El *core* interno encapsida la nucleocápside viral. Los retrovirus de peces se han clasificado dentro del género *Epsilonretrovirus* (van Regenmortel y col., 2000). Entre los más conocidos están el virus del sarcoma dérmico de lucioperca (WDSV, *Walleye Dermal Sarcoma Virus*) (Walker, 1969; Yamamoto y col., 1985) y el virus de la hiperplasia epidérmica de lucioperca tipo 1 (WEHV-1, *Walleye Epidermal Hyperplasia Virus Type 1*), aunque éstos no han sido aislados en el medio salvaje.

Entre las patologías retrovirales asociadas a peces salvajes podemos citar: la proliferación epidérmica de perca y lucio en Suecia (Winqvist y col., 1968) y Canadá (Yamamoto y col., 1984); el papiloma del *white sucker* (*Catostomus commersoni*) en

Norteamérica, cuya incidencia ha sido relacionada directamente con el nivel de contaminación (Sonstegard, 1977a,b); la infección eritrocítica viral (VEI, *Viral Erythrocytic Infection*) que afecta a lubinas (*Dicentrarchus labrax*) del mar Mediterráneo y que fue descrita por primera vez por Pintó y col. (1989), quienes posteriormente confirmaron su etiología retroviral (Pintó y col., 1991, 1995); la neurofibromatosis del *damsel fish* (DNF, *Damsel fish Neurofibromatosis*), enfermedad neoplásica que afecta al *damsel fish* (*Pomacentrus partitus*) de los arrecifes coralinos de Florida (Schmale, 1991; Schmale y col., 1996); la leucemia plasmacitoide (PL, *Plasmacytoid Leukemia*), enfermedad común en los salmones chinook cultivados en la Columbia Británica (Canadá), pero también detectada en salmones salvajes en EEUU y Chile (Kent y col., 1997).

3.2.5. Familia *Caliciviridae*

Los calicivirus son desnudos, de simetría icosaédrica y 27-40 nm de diámetro. El género *Vesivirus* incluye el virus de los leones marinos de San Miguel (SMSV, *San Miguel Sea Lions Virus*), que afecta también a peces como el opaleye (*Girella nigricans*), que vive asociado a leones marinos en California (Smith y col., 1980a,b, 1981).

3.2.6. Familias *Picornaviridae* y *Nodaviridae*

Ambos son viriones icosaédricos de 25-35 nm de diámetro y carentes de envuelta lipídica, lo que los hace difícilmente diferenciables morfológicamente.

Se han descrito partículas tipo-picornavirus en varios peces en cultivo, que no han sido asignados a ninguno de los géneros de esta familia (van Regenmortel y col.,

2000); en peces salvajes sólo se han detectado enterovirus patógenos para humanos (Cotor y col., 1990; Myjak y col., 1995).

La familia *Nodaviridae* comprende los géneros *Alphanodavirus* y *Betanodavirus*, siendo este segundo el que afecta exclusivamente a peces (van Regenmortel y col., 2000). Los nodavirus de peces se han aislado a partir de más de 30 especies, tanto de cultivo como salvajes y son responsables de la encefalopatía y retinopatía viral (VER, *Viral Encephalopathy and Retinopathy*), también conocida como necrosis nerviosa viral (VNN, *Viral Nervous Necrosis*) o encefalitis de peces (Munday y Nakai, 1997; Munday y col., 2002). Hasta la fecha, los nodavirus han sido descritos en varios peces pleuronécticos marinos y salvajes, como en el fletán, el *barfin flounder* (*Verasper moseri*) y el rodaballo, y también en el bacalao del Pacífico de Australia (Munday y Nakai, 1997). Más recientemente, se ha aislado un nodavirus a partir de mendo limón salvaje en Canadá (Barke y col., 2002).

3.2.7. Familia *Reoviridae*

Los reovirus que afectan a animales acuáticos se agrupan bajo el género *Aquareovirus* (van Regenmortel y col., 2000). Los miembros de este género son virus no envueltos, de aproximadamente 80 nm de diámetro con una doble cápside y 11 segmentos de ARNbc. Incluye 26 reovirus de peces, tanto de cultivo como salvajes, y 2 de moluscos (Essbauer y Ahne, 2001). La mayoría de los aislados no son patógenos para sus especies hospedadoras (Hetrick y col., 1992).

El primer aquareovirus que afectaba a peces salvajes fue el GSV (*Golden Shiner Virus*) (Plumb y col., 1979), que se aisló en 1979 en el sur de EEUU a partir de una población de *golden shiners* (*Notemigonus crysoleucas*), peces usados como cebo de pesca, que sufrían elevadas mortalidades; un virus semejante fue aislado a partir de

tenca (*Tinca tinca*) y cacho (*Leuciscus cephalus*) en Alemania (Ahne y Kölbl, 1987) y de salmón atlántico en Maryland (EEUU) y New Brunswick (Canadá) (Moore y McMenemy, 1988). Poco después Winton y col. (1981) aislaron un nuevo reovirus acuático (CSV, *Chum Salmon Virus*) a partir de ejemplares adultos de salmón chum (*Oncorhynchus keta*) que regresaban a una piscifactoría en Hokkaido (Japón).

Otros aquareovirus de peces salvajes son el CSR (*Coho Salmon Reovirus*) aislado a partir de salmones coho adultos que regresaban a un río de Oregón (EEUU) (Winton y col., 1989) y el SBR (*Striped Bass Reovirus*), detectado en lubinas estriadas (*Morone saxatilis*) de la bahía de Chesapeake (Baya y col., 1990). En 1991, Varner y Lewis aislaron en Texas (EEUU) un reovirus a partir de *angelfish* moribundos, una de las especies favoritas para acuarios, que exhibían el síndrome de la erosión de la cabeza y de la línea lateral (HLLE, *Head and Lateral Line Erosion*).

3.2.8. Familia *Birnaviridae*

La familia *Birnaviridae* contiene los géneros *Aquabirnavirus*, *Avibirnavirus* y *Entombirnavirus*. Son virus de cápside icosaédrica, de 60 nm de diámetro y sin envuelta lipídica. El género *Aquabirnavirus* comprende birnavirus que infectan peces, moluscos y crustáceos, constituyendo el grupo más grande de esta familia. Las 2 especies tipo de este género son el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV, *Infectious Pancreatic Necrosis Virus*) y el virus de la ascitis de la seriola japonesa (YAV, *Yellowtail Ascites Virus*) (van Regenmortel y col., 2000).

IPNV fue aislado por primera vez a partir de trucha salvelino (*Salvelinus fontinalis*) en EEUU (Wolf y col., 1959). Actualmente, han sido reconocidas cepas de IPNV en muchos países del mundo entre especies de más de 20 familias de peces teleósteos.

La primera detección de virus IPNV en peces salvajes fue realizada en 1972 por Sonstegard y col. en Ontario (Canadá), quienes aislaron el virus de vísceras de *white suckers* asintomáticos, corriente abajo de una piscifactoría de salmónidos con un historial epizootico de IPNV.

Algunos años más tarde, Munro y col. (1976) detectaron IPNV en salmón, trucha común, trucha arcoiris, piscardo, perca y lampreas, en el que se puede considerar el primer estudio de la distribución y prevalencia de este virus entre poblaciones de peces salvajes en Escocia.

En 1980, Newman describió la existencia de una epizootia entre algunas poblaciones de *Atlantic menhaden (Brevoortia tyrannus)* juveniles a lo largo de la costa noreste de los EEUU de los que se aisló IPNV (Stephens y col., 1980). En esa misma década se aisló el virus de lenguados de Florida (*Paralichthys lethostigma*) con alta mortalidad en Carolina del Norte (EEUU) (Helms, 1981; McAllister y col., 1983), de *hogchoker*, *Atlantic silverside* y verrugato croca (McAllister y col. 1984) y de trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) salvaje asintomática en Canadá (Souter y col., 1984).

En un estudio realizado por nuestro equipo, como parte de una campaña de investigación sobre las poblaciones de peces del banco pesquero Flemish Cap (Terranova), llevada a cabo en 1994, se aislaron virus tipo IPNV de 4 especies de peces: bacalao, fletán negro, platija americana y coreano (Bandín y col., 1997), sugiriendo que virus tipo IPNV pueden parasitar de modo natural las especies de este banco pesquero. El virus se ha detectado también en poblaciones salvajes de platija europea y limanda en el mar Báltico y mar del Norte (Mortensen y col., 1999), y en la costa oeste de Tasmania (Australia) en platija de Melbourne (*Rhombosolea tapirina*), bacalao de Nueva Zelanda (*Pseudophycis spp.*), galludo chato (*Squalus megalops*) y abadejo rosado (*Genypterus blacodes*) (Crane y col., 2000).

En los últimos años se ha publicado que IPNV es uno de los mayores responsables de la mortalidad de fletán del Atlántico cultivado en Noruega, Islandia, Escocia y Canadá y se cree que hay suficientes motivos para considerar que IPNV está ampliamente distribuido entre las poblaciones de fletanes noruegos, tanto cultivados como salvajes (Biering y col., 1997; Bergh y col., 2001).

El primer aislamiento de un birnavirus diferente de IPNV, el YAV, tuvo lugar en 1986 a partir de seriola japonesa (*Seriola quinqueradiata*) salvaje de la costa de Tosa Bay (Japón) (Isshiki y col., 1989). A partir de esta fecha, se aislaron otros birnavirus similares a partir de diferentes especies de peces marinos con ascitis procedentes del suroeste de Japón, incluyendo seriola japonesa, falso fletán japonés, seriola australiana (*S. aureovittata*) y *great amberjack* (*S. dumerili*). Las características serológicas del YAV y de estos birnavirus similares a YAV resultaron ser muy diferentes a las de la especie tipo IPNV (Kusuda y col., 1993). Otros virus semejantes han sido aislados de otras especies (Takano y col., 2001; Watanabe y col., 2002). Todos estos aislados diferentes de IPNV se han agrupado bajo el término MABV (*Marine Aquatic Birnaviruses*), que comprende un nuevo genogrupo claramente distinto a la especie tipo de los aquabirnavirus (Hosono y col., 1996; Zhang y Suzuki, 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

1.1. Líneas celulares

Para el aislamiento de la mayor variedad de virus posible, en este estudio se eligió un amplio rango de líneas celulares de peces (Tabla 1.1) cuya susceptibilidad a diferentes tipos de virus es bien conocida. Dos fueron líneas celulares de origen epitelial: CHSE-214, derivada de embrión de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Nims y col., 1970) y EPC, células de epiteloma papiloso de carpa (*Cyprinus carpio*) (Tomasec y Fijan, 1971); otras dos fueron líneas celulares de origen fibroblástico: BB, células de tronco caudal de “brown bullhead” (*Ictalurus nebulosus*) (Wolf y Quimby, 1969) y TV-1, células de tronco caudal de rodaballo juvenil (*Scophthalmus maximus*) (Fernández-Puentes y col., 1993a,b).

Tabla 1.1. Líneas celulares empleadas y condiciones de cultivo.

Línea celular	Tejido	Especie de origen		Morfología	Condiciones de cultivo	
		Nombre común	Nombre científico		Temperatura de crecimiento	Temperatura de mantenimiento
CHSE-214	Embrión	Salmón chinook	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Epitelial	15°C	15°C
EPC	Epitelioma papiloso	Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>		20°C	15°C
BB	Tronco caudal	<i>Brown bullhead</i>	<i>Ictalurus nebulosus</i>	Fibroblástica	25°C	15°C
TV-1	Tronco caudal	Rodaballo	<i>Scophthalmus maximus</i>		20°C	15°C

1.2. Condiciones de cultivo

Todas las líneas celulares se cultivaron en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) suplementado con penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y suero fetal bovino (FBS) al 10%.

Para su crecimiento, las células CHSE-214 se incubaron a 15°C, mientras que las líneas celulares EPC y TV-1 se incubaron a 20°C y las células BB a 25°C. Una vez obtenidas las monocapas confluentes se utilizó una temperatura de mantenimiento de 15°C para todas las líneas celulares.

La individualización celular para la obtención de subcultivos se llevó a cabo con tripsina al 0,1% en tampón diluyente (NaCl 140 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; KCl 2,68 mM; KCl 2,68 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; EDTA sódica 0,54 mM; 0,1% rojo fenol; pH 7), según el procedimiento estándar (Kuchler, 1977).

Los recuentos de células viables se realizaron en cámaras de Neubauer utilizando un colorante vital, azul tripán al 0,02% en tampón PBS (NaCl 0,14 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; KCl 2,68 mM; Na₂HPO₄ 0,54 mM; pH 7,4), tal y como describe Kuchler (1977).

2. Recogida y procesamiento de las muestras

Durante la campaña de investigación pesquera Flemish Cap 99, se recogieron muestras de bazo y riñón de un total de 538 peces, aparentemente sanos, de las 8 especies descritas previamente (Tabla 1.2). Una vez recogidas, las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su posterior análisis en nuestro laboratorio.

Las muestras se nombraron de acuerdo con su origen, asignándoles 3 dígitos, que hacen referencia, en este orden, al número de pesca en el que fueron capturados, al nombre común de la especie (G: gallineta; F: fletán; B: bacalao; P: platija americana; K: coreano; R: granadero; RR: perro del norte; A: *Antimora rostrata*) y al orden en que los peces de una misma especie fueron capturados durante cada pesca.

Tabla 1.2. Número de muestras recogidas e inoculadas.

Peces	Número de capturas	Número de muestras recogidas	Número de muestras inoculadas
Gallineta <i>Sebastes mentella</i>	45.529	246	100
Fletán negro <i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	4.910	241	100
Platija americana <i>Hippoglossoides platessoides</i>	313	28	10
Bacalao <i>Gadus morhua</i>	210	19	10
Granadero <i>Macrourus berglax</i>	386	18	10
Coreano <i>Glyptocephalus cynoglossus</i>	143	21	10
Perro del norte <i>Anarhichas lupus</i>	724	5	5
<i>Antimora rostrata</i>	411	5	5
Total	52.626	538	250

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Amos (1985) y modificado posteriormente por Ledo y col. (1987). Después de homogenizar los órganos en un *estomacher* Lab-Blender 80 (Seward Medical UAC House), se realizó una dilución 1:10 (p/v) con tampón Earle's suplementado con antibióticos (1000 UI/ml de penicilina, 1000 µg/ml de estreptomicina, 500 µg/ml de gentamicina y 10-20 µg/ml de fungizona). A continuación, la suspensión se centrifugó a baja velocidad (1.500 x g) durante 20 minutos a 4°C para precipitar los restos celulares. El sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril y se incubó a temperatura ambiente durante un mínimo de 4 horas (o en ocasiones se mantuvo toda la noche a 4°C) para permitir la actuación de los antibióticos y eliminar así la posible contaminación bacteriana y fúngica; posteriormente la suspensión se congeló a -20°C hasta su análisis. Sólo 250 de las 538 muestras congeladas fueron sometidas a análisis virológico, eligiendo para cada especie un número proporcional de muestras a analizar, en función

del porcentaje de capturas de cada especie y de la disponibilidad para el muestreo virológico (Tabla 1.2).

3. Aislamiento de virus en cultivo celular

Para el aislamiento de virus, de cada homogenado se realizaron las diluciones 1:10 y 1:100, que se inocularon por duplicado en placas de 48 pocillos (100 μ l por pocillo). A continuación, las placas se incubaron a 15°C y se visualizaron diariamente, durante un mínimo de 15 días (máximo de 45 días), para detectar la aparición de efecto citopático (ECP).

Las muestras positivas se sometieron a 3 pases consecutivos con aparición de ECP para incrementar el número de partículas infectivas. En los casos en que el primer pase no produjo ECP se realizó un “pase en blanco” antes de considerar la muestra como negativa.

4. Prueba de resistencia al cloroformo

Este ensayo permite determinar la presencia o ausencia de envuelta lipídica en el agente viral debido a que el cloroformo disuelve las membranas lipídicas. La sensibilidad de los aislados virales al cloroformo se examinó llevando a cabo una modificación del método de Jørgensen (1972). Para ello se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión viral para analizar (virus crudo) y cloroformo en un vial *Eppendorf* y se mantuvieron en agitación durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se centrifugaron los viales a 10.000 x g durante 1 minuto y se recogió la fase acuosa para proceder a su titulación en placas de 96 pocillos en la línea celular en la que se había

aislado la muestra, tal y como se describe a continuación. Paralelamente se tituló la misma muestra viral no sometida al tratamiento con cloroformo. Como controles de virus no envuelto y envuelto se emplearon la cepa WB del virus IPNV y la cepa *Applegate River* de IHNV, respectivamente.

El virus se considera resistente al tratamiento y, por tanto, carente de envuelta lipídica, si el título no varía o si disminuye menos de un logaritmo al compararlo con el título de la suspensión viral sin tratar.

5. Titulación viral

Las titulaciones virales se realizaron en placas de 96 pocillos con monocapas confluentes de las líneas celulares CHSE-214, EPC, BB y TV-1. Para ello, se realizaron diluciones seriadas del virus problema, preparadas en tampón Earle's suplementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µl/ml) y se inocularon 3 réplicas de cada dilución (100 µl /pocillo). Las placas se incubaron a 15°C y la lectura final del resultado se realizó a los 15 días post-inoculación. Los títulos se calcularon siguiendo el método de Reed y Muench (1938) y se expresaron como la mayor dilución del virus que da lugar a ECP en la mitad de los pocillos inoculados (TCID₅₀/ml).

6. Inmunodot

Para este ensayo se empleó el método descrito por Heberling y Kalter (1986). Como soporte sólido se emplearon membranas de nitrocelulosa de 0,22 µm (Sartorius). La membrana se activó sumergiéndola en tampón PBS durante 10 minutos, secándose inmediatamente con aire caliente. Las muestras virales (100 µl por muestra) se cargaron

en la membrana mediante la utilización de una célula dot-blot Minifold ISRC 96 (Schleicher & Schuell) con aplicación de vacío. La membrana se bloqueó sumergiéndola en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se sometió a 4 lavados, de 5 minutos cada uno, con tampón PBS-Tween 20 (0,02% Tween 20 en PBS) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución 1:500 de un antisuero anti-IPNV policlonal frente a los serotipos Ab, Sp y WB. A continuación se repitió el lavado como se indicó anteriormente, y la membrana se incubó en una dilución 1:500 del conjugado (IgG, ligada a peroxidasa, obtenida en cabra contra IgG de conejo, Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el lavado, se añadió la solución reveladora (50 μ l de 4-Cl- α -naftol diluido en 1 ml de metanol frío, 50 ml de PBS y 30 μ l de H₂O₂ al 30%). La reacción específica de los antisueros con cada uno de los virus ensayados se apreció mediante la aparición de una mota de color azul.

Como controles positivos se emplearon los virus homólogos del antisuero ensayado, es decir, Ab, Sp y WB; como control negativo, se utilizó EMEM sin suero y el virus VHSV.

7. Purificación parcial de virus

Un total de 57 muestras seleccionadas aleatoriamente se sometieron a dos protocolos diferentes de purificación parcial, uno específico para virus no envueltos y otro para envueltos, con el objetivo de posibilitar la posterior visualización de partículas virales bajo microscopía electrónica de transmisión (MET).

7.1. Purificación parcial para virus no envueltos

El virus se inoculó en frascos de 75 cm² con tapices celulares confluentes. Tras la visualización de ECP generalizado, la suspensión de células se centrifugó a 2.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se guardó a 4°C y el precipitado se resuspendió en 10 ml de tampón SSC 1X (NaCl 0,15 M; citrato sódico 0,015 M), se sonicó durante 30 segundos para liberar las partículas virales asociadas a los restos celulares y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Los sobrenadantes resultantes de las 2 centrifugaciones se mezclaron en un tubo y se sometieron a centrifugación durante 1 hora a 120.000 x g. El precipitado se resuspendió en 500 µl de tampón SSC 1X, se centrifugó en un lecho de sacarosa al 35% (p/v en tampón SSC 1X) durante 90 minutos a 100.000 x g. El nuevo precipitado se resuspendió en 50 µl de tampón SSC 1X y se conservó a - 20°C hasta su utilización.

7.2. Purificación parcial para virus envueltos

Al igual que en el caso anterior, las cepas virales se inocularon en frascos medianos (75 cm²) y, tras la visualización de ECP generalizado, la suspensión de células se centrifugó a 2.000 x g durante 30 minutos a 4°C. Al sobrenadante se le añadió 0,05% de glutaraldehído y se ultracentrifugó a 80.000 x g sobre un lecho de sacarosa (25% p/v) durante 1 hora a 10°C. El precipitado se resuspendió en 50 µl de tampón TN (Tris HCl 10 mM, pH 7,6; NaCl 150 mM).

8. Visualización de virus mediante microscopía electrónica

Para la visualización de la morfología y tamaño de los aislados virales bajo MET (Tabla 1.3.), se empleó la tinción de contraste negativo mediante ácido fosfotúngstico.

Para ello una rejilla de cobre de 400 *mesh*, con película de formvar (polivinilformaldehído en 1,2 dicloroetano cloroformo) se cubrió con una gota de la suspensión viral (alrededor de 30 μ l) durante 10 minutos. A continuación, la rejilla se escurrió sobre papel de filtro y se contrastó con ácido fosfotúngstico al 1,5% (pH 6,09) durante 40 segundos y al final se escurrió de nuevo. Los virus se visualizaron con un microscopio electrónico de transmisión Philips CM 12.

Tabla 1.3. Número de muestras analizadas mediante MET, en función de la especie de origen.

Peces	Número de muestras visualizadas
Gallineta	14
Fletán negro	21
Platija americana	3
Bacalao	2
Granadero	4
Coreano	1
Perro del norte	0
<i>Antimora rostrata</i>	1
Total	46

9. Clonación en placa mediante diluciones seriadas

Con el objeto de separar diferentes tipos de virus presentes en una misma muestra se realizaron diluciones seriadas (de 10^{-1} a 10^{-7}) de los aislados que desarrollaron ECP en las 4 líneas celulares empleadas y se procedió a la inoculación de 6 réplicas de cada una de las diluciones en placas de 48 pocillos de CHSE-214 y/o TV-1. Las placas se incubaron a 15°C durante 20 días. Los 6 clones obtenidos a partir de cada aislado (los últimos pocillos de cada dilución con ECP) se sometieron a purificación parcial como se describió en el apartado 7. Los 6 clones se denominaron

con una letra mayúscula subíndice (de la A a la F), precedida del nombre del aislado de origen.

10. Identificación molecular mediante RT-PCR

La confirmación de la identificación de los aislados se llevó a cabo aplicando RT-PCR (transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa) a virus semipurificado. Para ello se empleó, para el virus IPNV la pareja de cebadores Pr D (Tabla 1.4), descrita por Blake y col. (1995), que amplifica una secuencia de 174 pb en la región que codifica para la proteína NS (VP4) del segmento A de IPNV, y para el virus VHSV la pareja VHSV-cm3 (Tabla 1.4), descrita por Dopazo y col. (2002), que amplifica una región de 358 pb en la región del gen N.

Tabla 1.4. Descripción de los cebadores empleados para la identificación de los aislados.

Cebadores		Secuencia	Posición	Región codificante	Longitud esperada del producto de PCR
Pr D	D ₁	5'-AAAGCCATAGCCGCCATGAAC-3'	2139-2160 ^a	NS (VP4)	174 pb
	D ₂	5'-TTCATCAGCTGGCCAGGTAC-3'	2291-2312 ^a		
VHSV-cm3	VHS3-cm3a	5'-AGGCGTTGTCCGTGCT-3'	278-297 ^b	Gen N	358 pb
	VHS3-cm3b	5'-ACCCTGCGAGTTTCCTGA-3'	635-615 ^b		

^a Posición de los cebadores según la secuencia de la cepa Jasper (Duncan y Dobos, 1986) (número de acceso de la GenBank M18049). ^b Posición de los cebadores según la secuencia de la cepa F1 (número de acceso de la GenBank AY356633).

El ARN bicatenal se liberó diluyendo las muestras de virus crudo 1:50 en agua estéril desionizada, hirviéndolas durante 10 minutos y transfiriéndolas inmediatamente a un baño de hielo. A continuación 5 µl de la muestra de ARN se añadieron a 45 µl de una mezcla de reacción constituida por 5 µl de tampón de PCR 10X (Applied Biosystems), 5 µl de MgCl₂ (2,5 mM, Applied Biosystems), 5 µl de

desoxirribonucleótidos trifosfato (200 μ M cada uno, Promega, Inc.), 0,625 μ l de cada uno de los cebadores (20 μ mol/ μ l), 0,5 μ l de Taq polimerasa (5 U/ μ l, Applied Biosystems), 0,5 μ l de la transcriptasa inversa AMV (9 U/ μ l, Promega), 0,25 μ l de RNasin (40 U/ μ l, Promega) y 27,5 μ l de agua libre de nucleasas. Los tubos se centrifugaron durante 5 segundos a 10.000 x g.

Después de la reacción de transcripción inversa (1 ciclo durante 15 minutos a 50°C y 1 ciclo durante 2 minutos a 95°C), las muestras se sometieron a 30 ciclos de PCR (desnaturalización 30 segundos a 95°C, renaturalización durante 30 segundos a 50°C y extensión durante 1 minuto a 72°C) en un termociclador PTC-100 (*Programmable Thermal Controller*, MJ Research, Inc.), finalizando con una extensión final a 72°C durante 7 minutos.

Una alícuota de los productos de RT-PCR (10 μ l) se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% (*DNA Grade*, Fisher Scientific) en tampón TBE 1X a 200 V durante 45 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 μ g/ml en agua destilada) y se visualizaron usando luz ultravioleta (UV).

RESULTADOS

1. Aislamiento viral en líneas celulares de peces

De las 250 muestras inoculadas, 85 (34%) desarrollaron ECP en el segundo o tercer pase, tras un período de incubación de aproximadamente 20 días (Tabla 1.5). El mayor porcentaje de positivos se obtuvo con las muestras procedentes de granadero (100%) y el menor correspondió a las muestras de coreano (10%); debemos hacer especial mención a la ausencia de aislamiento viral en las muestras procedentes de perro

del norte. El 40% de las muestras de platija americana y de *Antimora rostrata*, el 39% de las de fletán negro, el 27% de las de gallineta y el 20% de las de bacalao mostraron ECP en alguna de las líneas celulares utilizadas.

Tabla 1.5. Porcentajes de prevalencia total y por especies.

Peces	Tamaño de la población capturada	Número de peces analizados	Número de muestras positivas ^a	Prevalencia	
				Límite detectable ^b	Observado
Gallineta	45.529	100	27	? 3%	27%
Fletán negro	4.910	100	39	? 3%	39%
Platija americana	313	10	4	~15%	40%
Bacalao	210	10	2	~15%	20%
Granadero	386	10	10	~15%	100%
Coreano	143	10	1	~15%	10%
Perro del norte	724	5	0	15-20%	0%
<i>Antimora rostrata</i>	411	5	2	15-20%	40%
Total	52.626	250	85	? 1%	34%

^a Se consideraron como muestras positivas aquellas que desarrollaron ECP. ^b Límite inferior de prevalencia detectable en función de las tablas de Amend y Wedemeyer (1970) para detección de portadores asintomáticos en poblaciones de peces.

Todas las muestras inoculadas desarrollaron ECP en más de una línea celular, aunque únicamente el 13% de las muestras positivas desarrollaron ECP en las 4 líneas empleadas, tal como se indica en la tabla 1.6.

La línea celular BB resultó ser la más susceptible, ya que 75 muestras (88,2%) produjeron ECP en estas células, seguida de la línea EPC, con 67 muestras positivas (78,8%), y finalmente las líneas CHSE-214 y TV-1, con 39 (45,9%) y 48 (56,5%) muestras positivas, respectivamente.

Tabla 1.6. Desarrollo de ECP en líneas celulares.

	CHSE-214	EPC	BB	TV-1	Número de muestras positivas (%)
4 líneas celulares	+	+	+	+	11 (13%)
3 líneas celulares		+	+	+	19
	+	+	+		10
	+	+		+	4
2 líneas celulares	+		+	+	4
		+	+		20
			+	+	7
	+		+		4
	+	+		3	37 (43,5%)
+			+	3	
Total	39	67	75	48	85
Número total de aislados			229		

+, desarrollo de ECP.

2. Prueba de resistencia al cloroformo

Aislados virales de todas las muestras fueron sometidos a tratamiento con cloroformo en cada una de las líneas celulares en las que desarrollaron ECP. Todos los aislados en las líneas celulares CHSE-214 (39 aislados) y EPC (67) fueron resistentes al tratamiento con cloroformo (virus desnudos). De los 75 aislados en BB, la mayoría (63) fueron resistentes al tratamiento, resultado semejante al obtenido con los 48 aislados en TV-1 (29 resistentes).

Es interesante destacar que, en el caso de 11 de las 85 muestras positivas (7 de fletán negro, 2 de gallineta, 1 de granadero y 1 de platija), los resultados obtenidos fueron diferentes dependiendo de la línea celular utilizada (Tabla 1.7). De este modo, de la muestra 9G2, procedente de gallineta, el aislado en CHSE-214 resultó ser desnudo (resistente al cloroformo), mientras que los aislados en las líneas fibroblásticas BB y TV-1 mostraron envuelta. Las muestras 9R2, 14F9, 17F1 y 20G3, dieron también resultados contradictorios en las 3 líneas celulares ensayadas, resultando ser no

envueltos los aislados en ECP y BB, y envuelto el aislado en TV-1. En el caso de la muestra 20F1, resultaron ser virus envueltos los aislados obtenidos en BB y TV-1 y no envuelto el de EPC. En el caso de la muestra 20F10, fueron desnudos los aislados de CHSE-214 y BB, y envuelto el de TV-1. También dieron resultados dispares las muestras 12F4 (desnudo en BB; envuelto en TV-1), 17F7 (aislado en CHSE-214, desnudo; envuelto en BB) y 19F2 y 33P2 (desnudos en EPC; envueltos en BB). Es necesario destacar, en el caso de estas 2 últimas muestras, que el tratamiento con cloroformo del aislado en EPC provocó un incremento del título de 2 y 3 logaritmos (respectivamente) con respecto al control.

Tabla 1.7. Muestras en la que los resultados obtenidos fueron contradictorios en la prueba de resistencia al cloroformo.

	CHSE-214	EPC	BB	TV-1
9G2	NE		E	E
9R2		NE	NE	E
14F9		NE	NE	E
17F1		NE	NE	E
20F1		NE	E	E
20F10	NE		NE	E
20G3		NE	NE	E
12F4			NE	E
17F7	NE		E	
19F2		NE*	E	
33P2		NE*	E	

NE, no envuelto. E, envuelto. * Casos en los que el título del aislado sometido a tratamiento con cloroformo fue superior al título de los aislados sin tratar.

3. Inmunodot

Se analizaron los aislados de un total de 28 muestras virales en las 4 líneas celulares, observándose una variación de los resultados obtenidos en función de la línea

celular de origen. Así, los aislados de CHSE-214 y TV-1 fueron identificados mayoritariamente como tipo-IPNV, mientras que la mayoría de los de BB y EPC presentaron un alto porcentaje de positivos dudosos o débiles (resultados no mostrados).

4. Microscopía electrónica

La visualización de las micrografías electrónicas reveló la existencia de mezclas de 2-3 tipos de virus en la mayoría de los aislados analizados. En todos los aislados en CHSE-214, TV-1 y EPC se encontraron partículas icosaédricas tipo-birnavirus, de un tamaño de alrededor de 55 nm (Figura 1.4 A y B); en la línea BB sólo se visualizó este tipo de partículas en el 20% de los casos. Es interesante señalar que en la mayoría de los casos estas partículas icosaédricas iban acompañadas de unas estructuras de morfología tubular (en número limitado) con un diámetro de aproximadamente 50 nm y una longitud que variaba entre 100 nm y 2 µm (Figura 1.4 C y D). Estas estructuras tubulares se observaron en el 100% de los casos en CHSE-214, en el 64% en TV-1 y en el 26% en EPC, y estaban ausentes en BB.

En muchos casos (60% de los aislados en BB, 47% de EPC, 45% en TV-1 y 9% en CHSE-214) se visualizaron otro tipo de partículas virales diferentes a birnavirus. Es de destacar, además, que fue frecuente la presencia de 2 o más tipos virales en la misma muestra original, principalmente en coinfección con virus tipo birnavirus; de hecho, en muchos casos la visualización de partículas virales distintas a las de tipo-birnavirus fue sólo posible tras su separación mediante clonación por diluciones seriadas. Esos otros tipos de partículas se agruparon en 7 tipos morfológicos.

En el tipo I se incluyeron partículas icosaédricas desnudas de morfología similar a la de los tipo-birnavirus descritos antes, pero de diámetro inferior. Debemos citar aquí

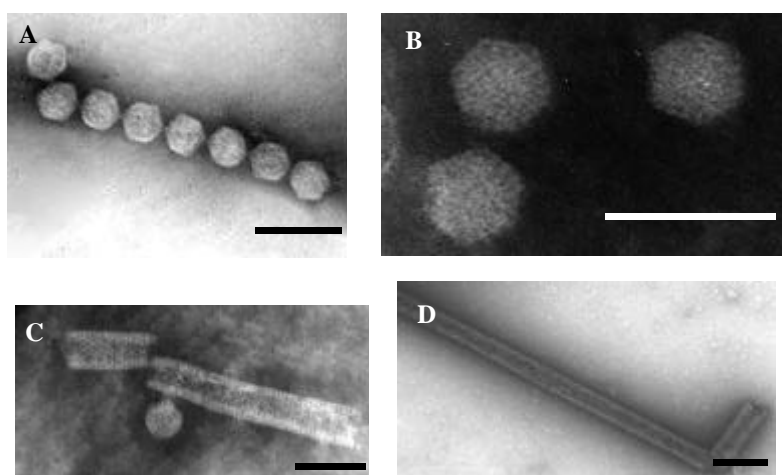


Figura 1.4. Micrografías electrónicas de partículas virales contrastadas negativamente con ácido fosfotúngstico. **A y B.** Partículas icosaédricas desnudas, tipo birnavirus, de un diámetro de alrededor de 55 nm (aislados 20G1_B-CHSE y 20F2-CHSE, respectivamente). **C.** Partícula icosaédrica de 55 nm acompañada de una partícula tubular rota de alrededor de 460 nm de longitud en el aislado 19G7_E-TV-1. **D.** Partícula tubular mostrando subunidades en disposición hexagonal en el aislado 19G7_E-TV-1. Barras, 100 nm.

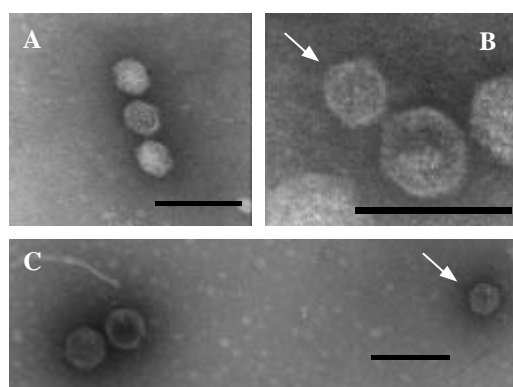


Figura 1.5. Tipo morfológico I. Micrografías electrónicas de partículas virales de morfología icosaédrica de tamaños inferiores a las de tipo-birnavirus. **A.** Partículas de 35 nm de diámetro observadas en las muestras 19G5 (aislado en BB) y 6P4 (aislado en EPC) (debe desestimarse la medida longitudinal de unos 40 nm, probablemente provocada por el astigmatismo). **B.** Partículas de 40 nm, visualizadas en el aislado 6B1-TV-1. **C.** Icosaedros de 40 a 45 nm, visualizadas en 20F2-EPC. Barras, 100 nm.

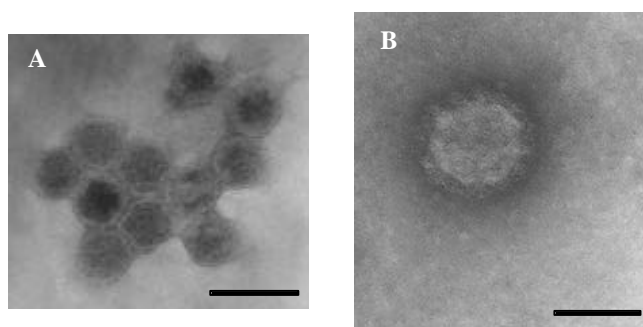


Figura 1.6. Tipos morfológicos II y IV. **A.** Tipo II: partículas de morfología esférica, de unos 52 nm de diámetro y tegumento de 10 nm, visualizadas en 6B1_A-TV-1. **B.** Tipo IV: partículas ovals y envueltas, de un tamaño de 110 x 123 nm en 6B1_C-TV-1. Barras, 100 nm.

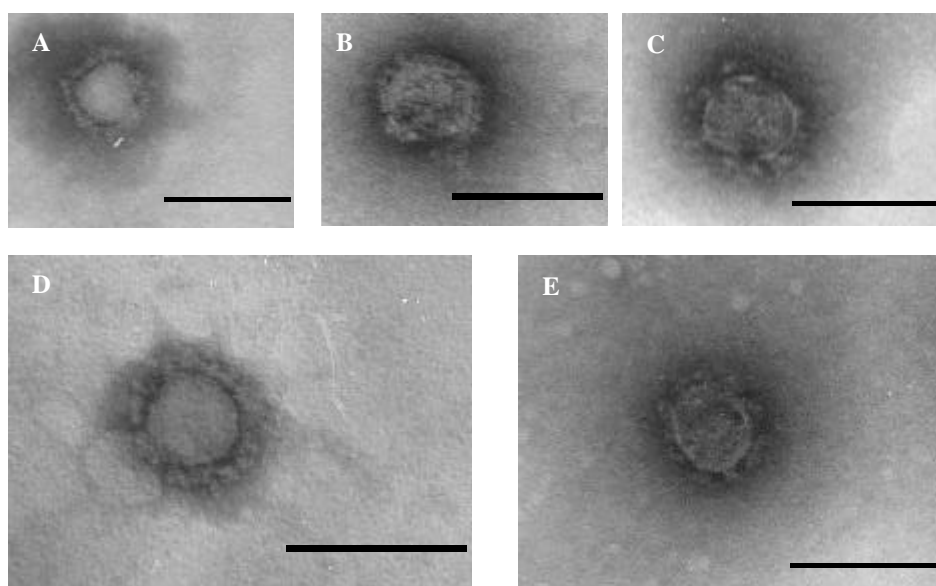


Figura 1.7. Tipo morfológico III. Partículas esféricas envueltas, con un diámetro de $72,0 \pm 4,6$ nm. **A.** Aislado 19F2-BB. **B.** Aislado 19F3_B-TV-1. **C.** Aislado 19G1-BB. **D.** Aislado 19G3_D-TV-1. **E.** Aislado 17A4-EPC. Barras, 100 nm.

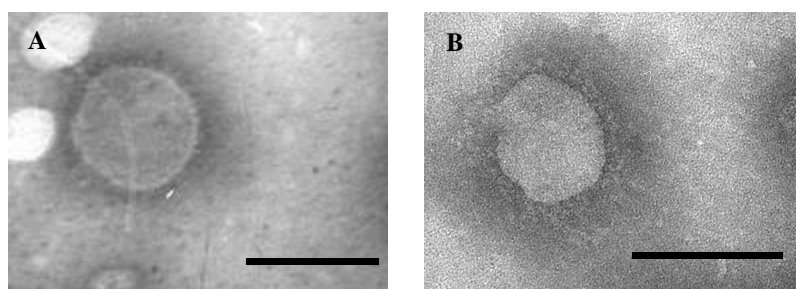


Figura 1.8. Tipo morfológico V. **A.** Partículas esféricas envueltas de 95 nm de diámetro (aislado 19G3-EPC). **B.** Partículas pleomórficas envueltas, de 86 x 106 nm (9G1-TV-1). Barras, 100 nm.

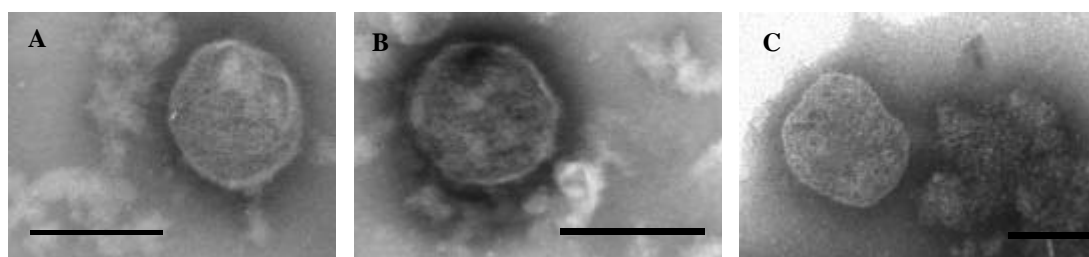


Figura 1.9. Tipos morfológicos VI y VII. **A y B.** Tipo VI: 2 partículas esféricas envueltas de 100 ? 112 nm, en el aislado 5B1_E-CHSE-214. **C.** Tipo VII: partículas pleomórficas envueltas, de 130 x 145 nm (aislado 19G3-TV-1). Barras, 100 nm.

partículas de 35 nm visualizadas en las muestras 19G5 (aislado en BB) y 6P4 (aislado en EPC), muestras originalmente obtenidas a partir de gallineta y platija americana, respectivamente (Figura 1.5 A). Partículas de un tamaño ligeramente superior (40 nm) se observaron en el aislado 6B1-TV-1, procedente de bacalao (Figura 1.5 B); otros icosaedros de tamaño entre 40 y 45 nm se visualizaron en el aislado 20F2-EPC, obtenido originalmente de fletán (Figura 1.5 C).

Un segundo tipo morfológico (tipo II) se visualizó en la muestra 6B1 (aislado 6B1-TV-1, clones A y C) (Figura 1.6 A), caracterizado por una morfología esférica de un diámetro de unos 52 nm, con un fino tegumento de unos 10 nm de espesor. En el clon 6B1_C-TV-1 se visualizó también otro tipo de partículas virales (tipo morfológico IV), ovales y envueltas, de un tamaño de 110 x 123 nm (Figura 1.6 B).

El tipo III, detectado en las muestras 14F5, 14F6, 19F2 y 19F3 (de fletán), 19G1, 20G1 y 19G3 (de gallineta) y 17A4 (de *A. rostrata*) se caracterizó por presentar un aspecto esférico, de un diámetro de $53,4 \pm 3,5$ nm y una envuelta de unos 9-10 nm de espesor, que le da un diámetro final de $72,0 \pm 4,6$ nm (Figura 1.7).

Partículas semejantes a las de tipo IV, pero de diferente diámetro fueron detectadas en una serie de aislados. Así, partículas esféricas (de alrededor de 95 nm) o pleomórficas (de 86 x 106 nm), con envuelta o corona de espículas de unos 8 a 10 nm de espesor, se visualizaron en los aislados de las muestras 19G3 (en EPC) y 9G1 (en TV-1) (tipo morfológico V; Figura 1.8). En el tipo VI se incluyeron partículas esféricas envueltas, de 100 x 112 nm (aislado 5B1_E-CHSE-214) y en el tipo VII partículas pleomórficas y envueltas de 130 ? 145 nm (aislado 19G3-TV-1) (Figura 1.9).

5. Identificación molecular mediante RT-PCR

La visualización, en geles de agarosa, del fragmento específico amplificado de 174 pb de la región de la NS (VP4) del segmento A de IPNV (Figura 1.10) confirmó que las partículas icosaédricas desnudas de alrededor de 55 nm observadas mediante MET en la mayoría de los aislados, eran partículas tipo birnavirus.

Por otra parte, la RT-PCR realizada con los cebadores específicos para VHSV no dio resultados positivos en ninguno de los aislados analizados (datos no mostrados).

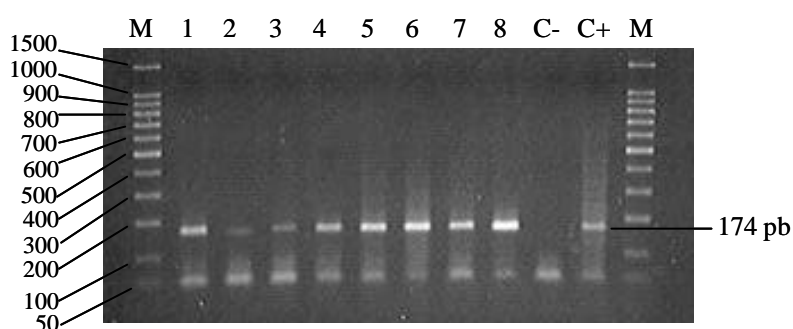


Figura 1.10. Productos de amplificación de RT-PCR obtenidos con la pareja de cebadores PrD sobre los aislados 19F3_B (canal 1), 5B1_D (2), 19F3_A (3), 9R3 (4), 17R5 (5), 19G5 (6), 20F2 (7), 6B1_D (8). C-: control negativo (agua destilada); C+: control positivo (ARN de la cepa WB de IPNV). M: estándar de peso molecular (*100 bp DNA Ladder*, Promega: 11 fragmentos en un rango de 100 a 1000 pb con incremento de 100 pb y una banda adicional de 1500 pb).

DISCUSIÓN

El aislamiento de virus de peces en lugares geográficamente muy distantes apoya la idea de una distribución mundial de estos agentes, que cada vez se descubren en una mayor variedad de ambientes. De hecho, aunque la mayor parte de los virus caracterizados hasta la fecha proceden de peces cultivados, existe un interés creciente

por el estudio de virus de peces silvestres. Esta atención se debe a que, por una parte, se ha planteado que el ambiente marino puede ser el origen de algunos virus que causan mortalidades importantes en peces cultivados (Konrad y col., 1984; Rowley y col., 2001) y a que, por otra parte, se considera de gran importancia conocer los patógenos que puedan condicionar la introducción de nuevas especies en cultivo. El interés en la existencia de una relación entre el medio salvaje y la acuicultura se ha plasmado en la reciente creación de la red europea DIPNET (*Disease Interaction and Pathogens exchange between farmed and wild aquatic animal populations*) cuyo primer objetivo es demostrar y conocer el efecto de la interacción entre ambos medios con el fin futuro de diseñar estrategias de control de posibles riesgos (ver www.dipnet.info).

En el año 1994, con el objeto de llevar a cabo un estudio de virus de peces procedentes de bancos pesqueros, se realizó una primera campaña de investigación en el Flemish Cap (Terranova), en la que se detectaron tanto virus de tipo IPNV como VHSV (Bandín y col., 1997). Con el fin de ampliar el estudio anterior, en el año 1999 se realizó una segunda campaña, examinando un mayor número de especies que se sometieron a un exhaustivo análisis virológico. El presente trabajo refleja los resultados obtenidos relativos tanto a la detección como al aislamiento de virus en las 8 especies de peces analizadas, así como a la identificación que se llevó a cabo de un número representativo de aislados.

El primer resultado interesante que se debe mencionar es el elevado porcentaje de muestras positivas obtenidas. Así, las 85 muestras positivas para presencia de virus representan un 34% del total de 250 peces analizados. Si bien el número de peces analizados podría parecer insuficiente para un banco de peces de alto nivel de capturas, como el Flemish Cap, para el tamaño de la población capturada en la campaña FC99 (52.626 peces) y siguiendo las tablas de Amend y Wedemeyer (1970) para

determinación del tamaño de la muestra en función del tamaño de la población, el protocolo seguido aseguraría (con un 95% de confianza en una distribución de Poisson) la detección de al menos un individuo portador en una población en que el virus estuviese presente con una incidencia tan baja como el 1%. Por ello, el 34% de muestras positivas se puede considerar como un dato fiable de la prevalencia de infecciones virales en los peces de este banco pesquero. Por especies, los datos son ligeramente distintos. Así, los tamaños de muestra más altos correspondieron a gallineta y fetán negro, asegurando límites inferiores detectables de prevalencia del 3%. Para el resto de las especies, los tamaños de muestra fueron tan bajos (motivado por las limitaciones planteadas por los organizadores y patrocinadores de la campaña) que los límites detectables no bajaron del 15% de prevalencia. No obstante, aunque *a priori* estos valores de prevalencia detectable podrían parecer excesivos para los esperables en un banco salvaje, los resultados obtenidos sorprendieron nuestras propias expectativas, pues en la mayor parte de las especies los datos de prevalencia superaron el mínimo de fiabilidad, con las únicas excepciones de coreano y perro del norte. Es remarcable que todos los individuos de granadero fueron portadores de virus, sin despreciar los altos porcentajes obtenidos en gallineta (27%), fletán (39%) y en *A. rostrata* y platija (40%). Estos altos porcentajes de prevalencia no tienen que ser necesariamente indicativos de la existencia de un brote epizootico en un banco pesquero. De hecho, la ausencia de sintomatología definida en los peces capturados y analizados, así como los largos períodos de incubación necesarios para el desarrollo de ECP en los tapices inoculados, son más significativos de las bajas cargas virales características de poblaciones portadoras.

Debido a la utilización de diversas líneas celulares, el número de aislados virales (229) fue muy superior al de las 85 muestras positivas. La identificación de los aislados

virales se realizó a través de 4 tipos de ensayos. En primer lugar, se realizó un ensayo para determinar si poseían o no envuelta lipídica mediante la prueba de resistencia al cloroformo. Los resultados obtenidos muestran la presencia de una mayoría de virus no envueltos. Sin embargo, es interesante señalar que en 11 de las muestras analizadas los resultados fueron diferentes dependiendo de la línea celular utilizada, lo que sugiere la posible existencia de al menos 2 tipos virales en cada una de ellas, uno con envuelta lipídica y otro sin ella. Además, entre los aislados carentes de envuelta lipídica se encontraron algunos en los que el título viral se incrementaba tras el tratamiento con cloroformo, lo cual nos hizo sospechar de la existencia de una mezcla de virus, de tal forma que al eliminar con el solvente lipídico la capacidad de replicación de los virus envueltos, se facilitarían la proliferación de las cepas sin envuelta.

La abundancia de aislados sin envuelta nos hizo sospechar de la presencia de birnavirus acuáticos, hipótesis de partida fácil de asumir en base a los resultados de la campaña anterior (FC 94; Bandín y col., 1997) y a la elevada ubicuidad de este tipo de virus. Este hecho se demostró mediante la técnica de inmunogold empleando una mezcla de antisueros anti-IPNV, comprobando que en la mayor parte de los casos los aislados desnudos daban una cierta reactividad con el antisuero. Es de destacar, no obstante, que en algunos casos la reactividad era tan baja que nos hizo sospechar la presencia de algún otro tipo de virus desnudos. La etiología de *Aquabirnavirus* de la mayoría de los aislados fue confirmada por RT-PCR, técnica que nuevamente nos hizo sospechar (por los positivos débiles ocasionalmente obtenidos) que en algún caso los birnavirus podían al menos estar mezclados con algún otro virus desnudo. Estos resultados confirman la distribución mundial de los birnavirus acuáticos y añaden 3 nuevas especies (gallineta, granadero y *A. rostrata*) a la lista del elevado rango de hospedadores de estos virus, que aunque se aislaron por primera vez a partir de

salmónidos en los años 60 (Wolf, 1988), hoy en día se sabe que parasitan numerosas clases de animales acuáticos en todo el mundo: *Teleostei*, *Agnatha*, *Mollusca* y *Crustacea* (Reno, 1999).

Considerando que en la anterior campaña FC 94 se habían detectado virus VHSV (Dopazo y col., 2002), y teniendo en cuenta la presencia de virus envueltos entre los aislados obtenidos en el presente estudio, consideramos probable la presencia de este virus en los peces de esta campaña. El hecho de no detectar VHSV por RT-PCR planteó la necesidad de aplicar microscopía electrónica para descubrir qué otros tipos virales podían estar presentes, probablemente en coinfección con birnavirus. En las micrografías electrónicas obtenidas se observó un absoluto predominio de birnavirus en los aislados analizados, cuya identidad se confirmó mediante inmunodot (datos no mostrados); sin embargo, también se confirmó la existencia de mezclas de virus. Independientemente de la línea celular en la que las muestras fueron inoculadas, la mayoría de ellas mostraron una mezcla de birnavirus y estructuras de morfología tubular, con un diámetro de aproximadamente 50 nm y longitudes que variaban entre los 100 nm y las 2 μ m. Cabe señalar, además, que la presencia de estos túbulos fue mayoritaria en algunos de los clones obtenidos mediante diluciones seriadas, pero siempre estaban “contaminados” con partículas icosaédricas tipo-IPNV, aunque fuese en muy baja proporción. Por otro lado, aunque la clonación en placa permitió potenciar la presencia mayoritaria de una u otra morfología, nunca se logró una separación absoluta. La presencia de estructuras tubulares semejantes a las visualizadas por nosotros y asociadas a birnavirus, de los 3 géneros que componen la familia *Birnaviridae* ha sido descrita por otros autores (Harkness y col., 1975; Teninges y col., 1979; Novoa, 1996; Granzow y col., 1997a); sin embargo, su origen, génesis y

significado biológico no está del todo claro, por lo que fueron objeto de un exhaustivo estudio que presentaremos en el capítulo tercero.

Los birnavirus acuáticos tienen una alta capacidad replicativa en cultivo celular (Wolf, 1988), lo cual suele ser motivo de dificultad en el aislamiento de otros tipos virales en coinfección. En el presente estudio, la visualización directa de los aislados al MET destacaba la presencia mayoritaria de birnavirus, permitiendo la observación ocasional de otros tipos morfológicos. En este sentido, la clonación en placa aunque no facilitó la separación en cultivo celular de otros tipos virales diferentes al IPNV, sí fue suficientemente resolutoria como para permitir su visualización.

Todas las partículas virales observadas, excepto las de tipo birnavirus, se han agrupado en 7 tipos morfológicos en función de su estructura y tamaño, ninguno de los cuales se correspondió con virus de tipo rabdovirus, confirmándose de este modo la ausencia de este tipo viral. Las partículas incluidas en el tipo I podrían ser de tipo picornavirus (35 nm) o nodavirus (40 nm); incluso, tanto por tamaño como por morfología, el tipo I entraría dentro del rango de los calicivirus (icosaedros desnudos de 27-40 nm de diámetro) siendo imposible distinguir en cuál de estas familias se clasificarían. Por otra parte, podría pensarse que las partículas icosaédricas desnudas, de 40-45 nm podrían ser hepadnavirus, aunque esto no deja de ser una mera especulación al no disponer de más datos que los morfológicos. Tanto picornavirus como nodavirus, se han detectado con anterioridad en peces, tanto de cultivo como salvajes, si bien los picornavirus detectados en peces silvestres no eran patógenos para peces, sino para humanos (Cotor y col., 1990; Myjak y col., 1995), y normalmente se asocian a aguas contaminadas, por lo que *a priori* descartamos que pueda tratarse de picornavirus, dada la ubicación del banco pesquero FC, lejos de la costa. Sin embargo, el hallazgo de este tipo de partículas en aislados procedentes de fletán y bacalao, peces en los que se ha

descrito previamente la existencia de nodavirus (Munday y Nakai, 1997), hace que parezca más probable que se trate de este grupo viral. No obstante, los calicivirus también se han detectado en ambientes salvajes, en opaleye y león marino (Smith y col., 1980a,b, 1981), por lo que no pueden ser descartados.

Los tipos morfológicos II y IV no se ajustan exactamente a ningún tipo viral concreto, aunque se aproximan a los tipos flavivirus o hepadnavirus, en el caso del tipo II, y coronavirus, en el tipo IV. El tipo morfológico más abundante, el tipo III, detectado en fletán, gallineta y *A. rostrata*, se ajusta perfectamente en tamaño y morfología al tipo flavivirus. Aunque este tipo viral es de gran trascendencia en clínica humana y animal, habiendo sido detectado incluso en invertebrados, hasta el momento no había sido detectado en peces, aunque sí se conocen algunos miembros que afectan a aves marinas (Tidona y col., 2002).

Las partículas virales agrupadas en el tipo V, detectado únicamente en gallineta, con morfología esférica o pleomórfica, podrían ser clasificadas como de tipo arenavirus. Aunque hasta el presente sólo se han detectado arenavirus en humanos, primates y roedores (Tidona y col., 2002), el tamaño y morfología de estas partículas nos ha hecho descartar el resto de familias virales.

Por otro lado, las partículas esféricas y envueltas, clasificadas como tipo morfológico VI, y observadas en bacalao, podrían ser, en función de sus características, tanto arenavirus como paramixovirus, aunque morfológicamente se aproximan más al tipo paramixovirus. Hasta la fecha, como se ha mencionado con anterioridad, se desconoce la existencia de arenavirus que parasiten peces o cualquier otro organismo marino. Por otro lado, aunque poco abundantes en la literatura sobre patología de peces, sí se han aislado partículas tipo-paramixovirus en salmones (Winton y col., 1985), truchas y lucios (Neumann y col., 1986) salvajes, así como en rodaballo en cultivo

(Lamas y col., 1996). Además algunos miembros del género *Morbillivirus* parasitan cetáceos (Smith y col., 1987; Blixenkronne-Moller y col., 1996) y focas (Krag y Schonheyder, 1996) por lo que podrían transmitirse a través del contacto con estos animales marinos; tampoco podemos descartar otra posible vía de transmisión en dirección opuesta, es decir, de peces a cetáceos o focas, a través del consumo.

Por último, se han observado también en gallineta partículas virales con envuelta y de morfología pleomórfica (tipo VII), que podrían ser con más probabilidad de tipo ortomixovirus, aunque sin descartar paramixovirus o coronavirus. El hecho de que miembros de los géneros *Influenzavirus A* y *B*, pertenecientes a la familia *Orthomyxoviridae*, parasiten de modo natural a ballenas y focas (Lang y col., 1981; Nielsen y col., 2001; Ohishi y col., 2002), así como a humanos, aves y otros animales, apoya la posibilidad de que se trate de ortomixovirus.

Además, los peces también son una especie hospedadora de un ortomixovirus, el ISAV, que ha sido aislado a partir de salmón salvaje (Dannevig y col., 1995; Byrne y col., 1998; Mullins y col., 1998; Rodger y col., 1998; Kibenge y col., 2001) y que se cree que se extiende por las corrientes marinas, aunque también a través del contacto con peces salvajes infectados (Rimstad y Mjaaland, 2002). De hecho, en el área de distribución de ISAV son comunes los salmónidos salvajes portadores asintomáticos, sugiriendo que infecciones de carácter asintomático o leve pueden ocurrir con cierta frecuencia en poblaciones salvajes (Nylund y col., 1999; Devold y col., 2000; Raynard y col., 2001).

Por otra parte, y dada la abundancia de aislados virales obtenidos en este estudio, se puede considerar a la mayoría de los peces analizados como portadores asintomáticos de birnavirus y/u otros virus, bien como consecuencia del sufrimiento de una infección anterior que hizo que estos peces retuviesen pequeñas cantidades de virus, o bien como

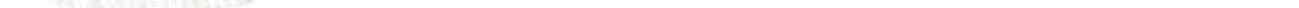
portadores naturales de estos virus. Esta segunda opción se maneja como la más probable, debido al equilibrio que normalmente alcanzan las relaciones hospedador-parásito en la naturaleza, con el fin de garantizar la supervivencia de ambos, y nos lleva a plantear unas preguntas formuladas por Moewus-Kobb en 1965 que no han sido respondidas todavía: ¿cómo puede ocurrir una transmisión horizontal entre peces en el mar, donde las poblaciones piscícolas están tan dispersas en comparación con las elevadas densidades de las poblaciones en cautiverio? ¿Es esta transmisión efectuada mediante vectores parásitos u hospedadores-reservorio?

A pesar de la imposibilidad de aislar en cultivo puro y propagar virus diferentes a birnavirus, probablemente debido a que las condiciones de cultivo utilizadas facilitaron la rápida proliferación de los birnavirus impidiendo el desarrollo de otros tipos virales, los resultados de microscopía electrónica evidencian que los peces del medio natural representan una fuente importante de nuevos virus, la mayoría de los cuales nunca han sido detectados en peces. La mayoría de los virus descritos en peces salvajes se deben a la existencia de epizootias o síntomas de enfermedad como úlceras, hemorragias o tumores (Winqvist y col., 1968; Sonstegard, 1977a,b; Jensen y col., 1979; Stephens y col., 1980; Jensen y Larsen, 1982; McAllister y col., 1983; Yamamoto y col., 1983, 1984; Anders, 1988, 1989; Wolf, 1988; Miyazaki y col., 1989; Morrison y col., 1996; Herman y col., 1997). Sólo en algunos casos excepcionales se han detectado virus en peces salvajes que no sufrían ninguna enfermedad, como consecuencia de la realización de controles rutinarios (Winton y col., 1985; Dixon y col., 1997; Crane y col., 2000; Dopazo y col., 2002; Watanabe y col., 2002). Este hecho pone de manifiesto la necesidad de incrementar el número de estudios de carácter epidemiológico en las poblaciones naturales de peces, para realizar un seguimiento de los patógenos virales que parasitan estos peces, más allá de los que ocasionan síntomas aparentes. El mero

hecho de haber llegado a detectar la presencia en poblaciones naturales de peces (que constituyen importantes bancos pesqueros de interés comercial) de virus de grupos virales de gran importancia en clínica humana y animal debería de ser suficiente para tener en cuenta el posible riesgo de introducción de estos virus en la cadena alimenticia, amén de desconocer el posible efecto de su introducción en acuicultura.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZACIÓN DE BIRNAVIRUS AISLADOS DE PECES CAPTURADOS EN EL BANCO PESQUERO FLEMISH CAP



RESUMEN

En este capítulo se llevó a cabo la caracterización, mediante métodos moleculares, de 24 birnavirus marinos procedentes de 6 especies de peces: fletán negro, gallineta, bacalao, granadero, platija y coreano, capturados en el banco pesquero Flemish Cap (FC) durante la campaña de investigación realizada en el año 1999. El análisis electroforético de los segmentos genómicos y de los polipéptidos, así como el análisis mediante Western blot de sus proteínas virales, revelaron una gran similitud entre la mayoría de estos birnavirus, independientemente de la especie a partir de la cual se habían aislado. Estos resultados se confirmaron mediante el estudio de los fragmentos de restricción (RFLPs) de una región del segmento A, y la secuenciación de dos regiones del segmento A (NS y VP2). Además, tanto los resultados de RFLPs como los de secuenciación revelaron la existencia de una estrecha relación entre estos birnavirus y las cepas DM y WB del serotipo A1 de IPNV, aisladas en la costa oeste de EEUU.

Dos de estos birnavirus, las cepas 6B1_D y 20G1_D, procedentes de bacalao y gallineta, respectivamente, mostraron un perfil de ARN diferente al resto de las cepas; sin embargo, tanto el análisis mediante RFLPs, como el estudio de sus secuencias, no revelaron la existencia de diferencias a nivel del segmento A.

ABSTRACT

In this chapter we have carried out the characterization, through molecular methods, of 24 marine birnaviruses from 6 fish species: Greenland halibut, deepwater redfish, Atlantic cod, onion-eye grenadier, American plaice and witch flounder, caught in the Flemish Cap (FC) fishery during a research campaign in 1999. Electrophoretic analysis of their genomic segments and their polypeptides, as well as analysis by Western blot of their viral proteins, revealed the existence of high similarity between most of them, regardless of the species from which they had been isolated. These results were confirmed by analysing the restriction fragments (RFLPs) of a region from the genomic segment A, as well as by sequencing two regions (NS and VP2) from the same genomic segment. Furthermore, these results also revealed the existence of a close relationship between these birnaviruses and the DM and WB strains, belonging to the A1 serotype of IPNV and isolated from the Western coast of USA.

Two of these birnaviruses, strains 6B1_D and 20G1_D, from Atlantic cod and deepwater redfish respectively, showed a different RNA profile. However, RFLPs and sequence analysis did not reveal the presence of any differences in the regions of segment A analysed.

INTRODUCCIÓN

1. Familia *Birnaviridae*

El nombre de la familia, *Birnaviridae*, fue aprobado por el Comité Internacional de Taxonomía Vírica (ICTV) en el año 1986, con el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) como especie tipo de la familia. Este nombre hace referencia a su naturaleza genómica, puesto que se trata de virus cuyo genoma está constituido por ARN bicatenal bisegmentado (Dobos y col., 1979). En esta familia se distinguen 3 géneros: *Aquabirnavirus*, *Avibirnavirus* y *Entomobirnavirus*, que han sido establecidos en función del tipo de hospedador. Todos los miembros tienen en común las características generales, en cuanto a la organización de su genoma, el número de polipéptidos y la morfología, aspectos que se describirán en detalle en el apartado dedicado a IPNV (Dobos y col., 1979; Murphy y col., 1995).

1.1. Género *Avibirnavirus* (Avi-, del latín *avis*, pájaro)

La especie tipo de este género es el virus de la enfermedad de la bursa de los pollos (IBDV). Esta enfermedad se conoce también como enfermedad de Gumboro debido al lugar en el que fue descrito por primera vez en 1962 (Cheville, 1967). IBDV posee una distribución mundial y puede ocasionar serios daños en la industria del pollo. En base a la ausencia de neutralización cruzada *in vitro*, se han definido 2 serotipos: el serotipo I infecta sólo pollos, mientras que el serotipo II infecta pavos y pollos, siendo su importancia, a nivel patogénico, desconocida (McFerran y col., 1980).

1.2. Género *Entomobirnavirus* (Entomo-, del griego *entomon*, insecto)

La especie tipo de este género es el virus X de la *Drosophila* (DXV), que fue aislado por primera vez en 1979 en moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*)

(Dobos y col., 1979). Sin embargo, se ha demostrado que su abanico de hospedadores es más amplio, incluyendo a insectos como los *Culicoides spp*, si bien su distribución es desconocida. Se sabe que las moscas infectadas se vuelven más sensibles a la falta de oxígeno, sin embargo, no han sido descrito los órganos diana ni los detalles histopatológicos de esta enfermedad (Teninges y col., 1979; Murphy y col., 1995).

1.3. Género *Aquabirnavirus* (Aqua-, del latín *aqua*, agua)

El género *Aquabirnavirus* comprende birnavirus que infectan peces, moluscos y crustáceos, constituyendo el grupo más grande de esta familia. La especie tipo de este género es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), sobre el que versan la mayor parte de los trabajos publicados. También incluye el virus de la ascitis del medregal del Japón (YAV), que afecta a peces, y los virus de tellina (TV) y de ostra (OV), ambos virus de moluscos bivalvos.

La necrosis pancreática infecciosa, en principio conocida como enteritis catarral aguda, se describió desde los comienzos del cultivo comercial de las truchas como una enfermedad altamente virulenta y mortal que afectaba a los alevines más jóvenes. Sin embargo, hasta 1960 no se consiguió aislar el agente causal de la enfermedad y así demostrar su naturaleza vírica (Wolf y col., 1960), convirtiéndose IPNV en el primer virus aislado a partir de peces. El uso de una línea celular continua procedente de gónada de trucha arcoiris hizo posible el estudio de este virus.

El virus se transmite tanto vertical como horizontalmente sin la actuación de ningún vector conocido. La replicación ocurre en la mayoría de los órganos internos de trucha arcoiris (McKnight y Roberts, 1976) y, tras la exposición al agente, el tiempo de incubación es de aproximadamente una semana, o menos en el caso de alevines. Los síntomas de la infección son la natación errática y en círculos, distensión abdominal,

exoftalmia y pigmentación oscura. El intestino empalidece y secciones tisulares muestran necrosis en el páncreas y en la mucosa intestinal (Porterfield, 1989; Murphy y col., 1995). Los supervivientes de esta enfermedad pueden portar el virus toda su vida (Wolf, 1988).

Aunque en principio se pensaba que sólo afectaba a peces salmónidos, IPNV infecta un amplio número de peces teleósteos, algunos vertebrados cartilagosos e invertebrados. Tras la primera identificación de IPNV en Norteamérica, el virus ha sido aislado en aguas de todo el mundo, desde Europa hasta Sudamérica, así como en Asia y África. Debido a que muchos de estos aislados no producen necrosis pancreática se ha acuñado el término de birnavirus acuáticos para hacer referencia a todos ellos (Hill y Way, 1995).

2. Descripción de los birnavirus acuáticos

2.1. Morfología

La observación al microscopio electrónico (Figura 2.1) revela virus desnudos, con una única cápside icosaédrica, cuyo diámetro oscila entre 55 y 65 nm (Lightner y Post, 1969; Kelly y Loh, 1972; Chang y col., 1978; Dobos y col., 1979; Özel y Gelderblom, 1985). Inicialmente se estimó que el número de subunidades capsoméricas era de 180, compartidas en 92 capsómeros (Cohen y col., 1973), pero posteriores estudios sugieren que el número de capsómeros debería ser de 132 (Özel y Gelderblom, 1985).

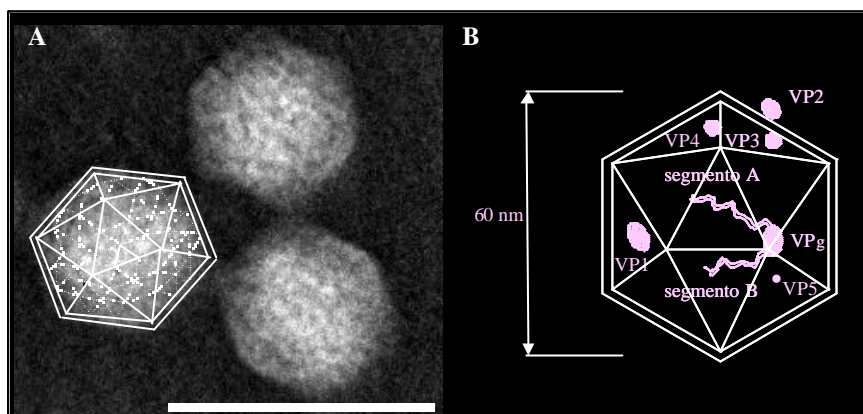


Figura 2.1. Estructura del virión de birnavirus acuáticos. **A.** Micrografía electrónica. **B.** Dibujo esquemático en el que se muestra su genoma y sus proteínas constituyentes. Barra, 100 nm.

2.2. Propiedades biofísicas

El coeficiente de sedimentación del virus IPNV es de 435 S y el peso molecular del virión es de 55×10^6 Da, del cual el ARN representa el 8,7%. Su densidad en CsCl es de $1,33 \text{ g/cm}^3$, y el de las cápsidas vacías de $1,29 \text{ g/cm}^3$ (Dobos y col., 1977).

Al ser un virus desnudo, es muy resistente a solventes lipídicos y a temperaturas y pHs extremos, de tal forma que sobrevive casi un año a 4°C y aproximadamente dos meses a 15°C (Dorson, 1982). La demostrada estabilidad de estos virus en ambientes naturales tanto de agua dulce como marina (Desautels y MacKelvie, 1975; Toranzo y Hetrick, 1982) facilita enormemente su transmisión.

2.3. Propiedades bioquímicas

Genoma

El genoma del virión está formado por 2 segmentos (denominados A y B) de ARN de doble cadena (ARNbc) de $2,5$ y $2,4 \times 10^3$ Da, respectivamente (Dobos y col.,

1977) (Figura 2.2). Su coeficiente de sedimentación es de 14 S y, por ser ARNbc, es resistente a la actuación de las ARNasas.

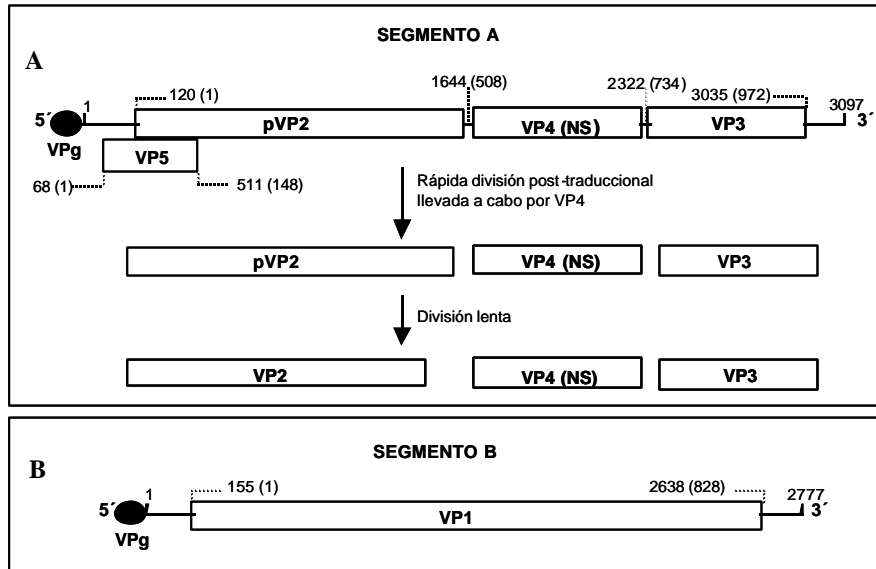


Figura 2.2. Representación esquemática de la organización y expresión genómica de birnavirus acuáticos. **A.** El segmento A da lugar a las proteínas virales VP2, la proteasa VP4 (NS) y la VP3, después del procesamiento de la poliproteína, y a la VP5 a partir del procesamiento de la ORF de menor tamaño. **B.** El segmento B codifica la VP1, que además de ejercer la función de polimerasa viral, se encuentra unida al extremo 5' de los dos segmentos en forma de VPg. Los números en los extremos 5' y 3' indican el primer y el último nucleótido y los números que se encuentran encima y debajo de las ORFs hacen referencia a los números de los nucleótidos y aquellos entre paréntesis a los aminoácidos correspondientes.

El segmento A es bicistrónico, es decir, contiene dos pautas de lectura abierta (ORFs) solapadas. La menor, de 444 nucleótidos, se encuentra localizada en el extremo 5' del segmento y codifica un polipéptido de 17 kDa altamente básico (Duncan y col., 1987; Håvarstein y col., 1990). Este producto ha sido identificado sólo en células infectadas y no en viriones purificados; además, no le ha sido asignada todavía una función (Magyar y Dobos, 1994; Heppell y col., 1995a). La ORF de mayor longitud

(ORF PP: 2916 nucleótidos) codifica una poliproteína que contiene las dos principales proteínas estructurales y una proteasa (NH₂-pVP2-NS-VP3-COOH) (Dobos y Rowe, 1977; Duncan y col., 1987; Nagy y col. 1987).

El segmento B, de menor tamaño (2784 nucleótidos), posee una ORF (ORF VP1) que codifica un único polipéptido de 94 kDa, con funciones de proteína estructural y ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) (Duncan y col., 1991).

Estos segmentos poseen regiones no codificantes de considerable tamaño en ambos extremos de la molécula, secuencias que deben de ser importantes para el reconocimiento de la polimerasa, para el inicio de la traducción y, posiblemente, para el empaquetamiento del genoma (Duncan y col., 1991). Existe una elevada homología entre estas regiones no-codificantes de los segmentos A y B, mientras que entre las regiones codificantes existe una mayor divergencia.

Los ARNs de diferentes birnavirus acuáticos pueden ser diferenciados mediante electroforesis en geles de acrilamida, apreciándose diferencias en los pesos moleculares de los segmentos; esta variabilidad se ha utilizado para tipar las cepas del virus (MacDonald y Gower, 1981; Hedrick y Okamoto, 1983; Stephens y Hetrick, 1983; Hedrick y col., 1986a; Dopazo, 1991; Cutrín y col., 2000).

Proteínas estructurales

Alrededor del 90% de la masa viral corresponde a las proteínas y se ha demostrado, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, que el virión maduro está constituido esencialmente por 4 polipéptidos (Tabla 2.1). Además, se ha comprobado que existe una ligera variación en los pesos moleculares de estos polipéptidos cuando proceden de virus de diferentes animales acuáticos o de distintas áreas, lo que llevó a algunos autores a usar estas diferencias para la identificación de los

principales serotipos de IPNV (Hedrick y col., 1985; Hsu y col., 1993a,b; Kusuda y col., 1993).

Tabla 2.1. Descripción de los polipéptidos de birnavirus acuáticos.

ARN	Proteína codificada	Tamaño	Función	Localización
Segmento B	VP1 y VPg	100 kDa	ARN polimerasa	Interna
			Estructural	Unida al ARN
Segmento A	VP2	54 kDa	Estructural y antigénica	Cápside (cara externa)
	VP4 (NS)	29 kDa	Proteasa	Interna
	VP3	31 kDa	Estructural	Cápside (cara interna)
	VP3a	29 kDa	Estructural	Cápside (cara interna)
	VP5	17 kDa	Desconocida	Interna

La proteína de mayor tamaño y la menos abundante, que representa el 4% del contenido proteico total, es la VP1 (de alrededor de 100 kDa) y ha sido encontrada tanto en su forma libre (VP1), como ligada al genoma (VPg). En esta última forma, se une covalentemente al extremo 5' del ARN, a través de un enlace fosfodiéster, concretamente a un residuo de serina (Persson y MacDonald, 1982; Calvert y col., 1991).

La principal proteína estructural de las partículas virales maduras, VP2 (54 kDa), se genera durante la maduración post-traducciona de pVP2 (62 kDa) (Dobos y Rowe, 1977). Se trata del único componente de la cápside, constituyendo el 62% de la masa proteica total, con 544 unidades por virión (Dobos y col., 1977). Es la proteína antigénica mayoritaria; en las cepas del serotipo A, la parte central de VP2 contiene 3 epítopos neutralizantes, dos de los cuales son variables (Frost y col., 1995; Heppell y

col., 1995b; Tarrab y col., 1995). Existen zonas de esta proteína que podrían ser lugares potenciales de glicosilación, pudiendo contener carbohidratos (Estay y col., 1990), aunque existen discrepancias en este sentido. Así, mientras que Pérez y col. (1996) sostienen que se trata de una proteína no glicosilada, Espinoza y col. (2000) notificaron la presencia de VP2 glicosilada en el citoplasma. En preparaciones de viriones purificados se han encontrado además túbulos con un diámetro aproximado de 50 nm, contruidos a partir de subunidades repetidas regularmente y compuestos principalmente de pVP2 (Granzow y col., 1997a; Crane y col., 2000; Espinoza y col., 2000), de los que se desconoce todavía su función. Mientras que este tipo de túbulos, llamados de tipo I, se observaron en células infectadas con cualquiera de los miembros de la familia *Birnaviridae* (Teninges y col., 1979; Schwanz-Pfützner y col., 1984; Özel y Gelderblom, 1985), los túbulos tipo II, que contienen VP4, sólo han sido detectados en células infectadas con IBDV, también a partir de preparaciones de viriones purificados (Granzow y col., 1997b).

La segunda proteína más abundante es la VP3, representando el 28% del contenido proteico; sin embargo, si se tiene en cuenta su tamaño (31 kDa), el número de unidades de VP3 debe ser mayor que el de VP2. Una forma variante de VP3, la VP3a (29 kDa), también se encuentra en el virión y su cantidad fluctúa entre diferentes aislados, situándose en torno al 6% del contenido proteico total. La ubicación de VP3 es interna, sin embargo, diferentes estudios de neutralización sugieren que una pequeña secuencia aminoacídica puede estar expuesta en la superficie de la cápside (Caswell-Reno y col., 1986; Tarrab y col., 1993; Park y Gajin, 1996).

La proteína NS o VP4 es una proteasa autocatalítica que es escindida post-traduccionalmente de la poliproteína durante la replicación viral, para generar pVP2 y VP3, siendo posteriormente degradada (Manning y col., 1990). Tiene un tamaño similar

al de VP3 y VP3a, lo que hace que, tanto su identificación como su aislamiento, sean muy laboriosos. Esta proteína nunca ha sido detectada en células infectadas; sin embargo, mediante su expresión en *Escherichia coli* y produciendo anticuerpos contra NS, es posible detectar ínfimas cantidades del enzima en viriones purificados (Magyar y Dobos, 1994; Heppell y col., 1995a).

La última proteína estructural, la VP5, de 17 kDa, es rica en arginina; está codificada por la pequeña ORF del segmento A, que precede y solapa parcialmente la ORF PP (Håvarstein y col., 1990). Constituye el polipéptido de menor tamaño y, aunque no existe evidencia de que esté presente en viriones purificados, se ha detectado en células infectadas con IPNV (Magyar y Dobos, 1994). Recientemente se ha demostrado que el inicio de la traducción de esta proteína en las cepas VR-299 y Sp comienza en el segundo codón de iniciación, y que la ausencia de su expresión no influye en el crecimiento del virus *in vitro* (Weber y col., 2001); de hecho existen cepas que no codifican esta proteína (Heppell y col., 1995a). Se cree, además, que este polipéptido podría estar implicado en la regulación del sistema anti-apoptótico de la célula hospedadora, favoreciendo la producción de la progenie (Hong y col., 2002).

2.4. Ciclo de replicación

El ciclo de replicación completo de birnavirus acuáticos no ha sido establecido en detalle (Figura 2.3). La mayor parte de los trabajos en este campo fueron realizados hace más de 15 años, quedando varios aspectos de la replicación viral por explorar. Un ciclo de replicación viral puede durar entre 16 y 20 horas a 22°C (Malsberger y Cerini, 1965), desembocando en la consecuente liberación de viriones maduros, acompañado de la lisis celular.

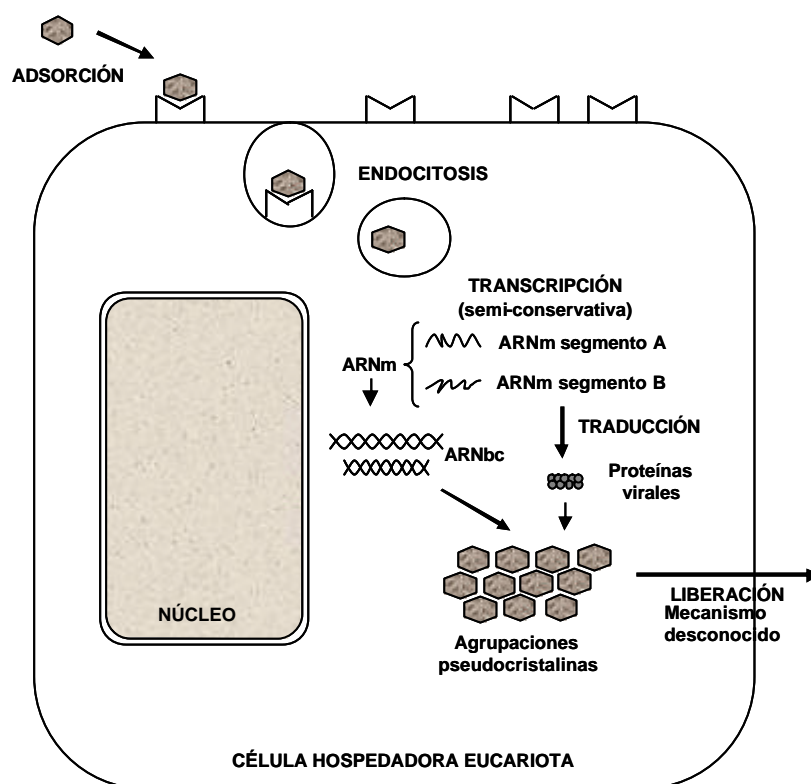


Figura 2.3. Representación del ciclo de replicación de birnavirus acuáticos.

Condiciones para la multiplicación

La producción óptima de IPNV se obtiene entre 18°C y 24°C, mientras que a temperaturas superiores, tiene lugar un drástico descenso en la multiplicación. Por encima de los 28°C no se detecta progenie en las células hospedadoras, por lo que se considera este valor como la temperatura no permisiva del virus (Roberts y Dobos, 1983). La mayoría de las líneas celulares de anfibios no son capaces de producir la replicación del virus IPNV, a pesar de que crecen a temperaturas inferiores a 22°C. El virus tampoco es capaz de replicar en células procedentes de aves y mamíferos, en parte porque estas células crecen a temperaturas superiores a 24°C y también porque no poseen los receptores específicos necesarios para la adsorción y penetración del virus.

El cultivo de este virus puede llevarse a cabo en una gran variedad de líneas celulares de cultivo continuo procedentes de peces teleósteos (Tabla 2.2). Las células RTG-2 fueron las primeras y más utilizadas en la mayor parte de las investigaciones iniciales sobre el diagnóstico y cultivo experimental del virus. Sin embargo, en la actualidad las células CHSE-214 son más ampliamente empleadas porque, a diferencia de las RTG-2, no producen interferón, lo que hace que se obtengan títulos más altos (MacDonald y Kennedy, 1979). Otra línea celular que se emplea con frecuencia es la BF-2, aunque parece ser que determinadas cepas de IPNV no replican en estas células (Rivas, 1991). Asimismo se ha publicado que la línea celular TV-1 es adecuada para la replicación de este virus (Fernández- Puentes y col., 1993a,b). Por último, varios estudios han demostrado que las líneas EPC, FHM y BB muestran una sensibilidad reducida y variable para la detección de IPNV (Jørgensen y Grauballe, 1971; Jørgensen y Kehlet, 1971; Nicholson y Byrne, 1973; Scherrer y Cohen, 1975; Kelly y col., 1978; Bovo y col., 1985; Hedrick y col., 1986b).

Tabla 2.2. Líneas celulares susceptibles a birnavirus acuáticos.

Línea celular	Origen	Especie	Morfología	Temperatura		Referencia Original
				Rango	Óptima	
CHSE-214	Embrión de salmón chinook	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Epitelial	4-27	21	Nims y col., 1970
RTG-2	Gónada de trucha arcoiris	<i>Salmo gairdneri</i>	Fibroblástica	4-26	20	Wolf y Quimby, 1962a,b
BF-2	Pedúnculo de bluegill	<i>Lepomis macrochirus</i>	Fibroblástica	15-33	21-25	Wolf y Quimby, 1966
EPC	Epitelioma papiloso de carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	Epitelial	4-35	25-30	Tomasec y Fijan, 1971
BB	Tronco caudal de brown bullhead	<i>Ictalurus nebulosus</i>	Fibroblástica	4-39	25-30	Wolf y Quimby, 1969
FHM	Tronco caudal de fathead minnow	<i>Pimephales promelas</i>	Epitelial	4-36	25	Gravell y Malsberger, 1965
TV-1	Tronco caudal de rodaballo	<i>Scophthalmus maximus</i>	Fibroblástica	10-30	20	Fernández-Puentes y col., 1993a,b

A principios de los años 80, Darragh y MacDonald (1982) realizaron estudios para evaluar las restricciones en el rango de hospedadores de IPNV. Estos autores encontraron que una cepa que no era capaz de replicar en la línea celular FHM era, sin embargo, capaz de sintetizar los polipéptidos virales específicos cuando su ARN había sido transferido a la cápside de otra cepa capaz de replicar en estas células. Estos resultados sugieren que la adsorción podría ser el factor restrictivo para la replicación en diferentes líneas celulares.

Para mantener una alta infectividad específica en una cepa de IPNV, es importante tener presente la producción de partículas defectivas. De este modo, los pases repetidos de IPNV a una alta multiplicidad de infección reducen la infectividad del virus (MacDonald, 1978; MacDonald y Yamamoto, 1978).

Interacción con la célula huésped

Son dos los componentes celulares que están implicados en la adsorción de IPNV a la célula, uno específico y otro no específico (Kuznar y col., 1995). Ninguno de estos dos componentes ha sido identificado, pero se ha sugerido que el virus IPNV reconoce un polipéptido de elevado peso molecular de diferentes líneas celulares de peces (Dobos, 1995a). Estudios realizados con polipéptidos marcados radioactivamente indican que el virus se une a la célula a través de la proteína VP2 (Dobos, 1995a). Cuando una partícula viral se une a un receptor celular, se desencadena una respuesta en la célula que provoca la alteración de los demás receptores, de tal forma que ninguna otra partícula viral pueda infectar esta célula.

Inmediatamente después de la adsorción, las partículas virales se detectan en el citoplasma de la célula en el interior de vesículas (Couve y col., 1992; Granzow y col.,

1997a), lo que sugiere que IPNV, como otros virus no envueltos, penetra en la célula por endocitosis.

Transcripción y traducción

La replicación de IPNV tiene lugar en el citoplasma de las células infectadas y este proceso no inhibe la síntesis de las proteínas celulares (Nicholson, 1971). El ARNm específico del virus se detecta por primera vez a las 2 horas post-infección; la síntesis alcanza su máximo a las 8-10 horas p.i. y finaliza a las 14 horas (Somogyi y Dobos, 1980). La cantidad de ARNm expresado por el segmento A es entre 2 y 3 veces mayor que la cantidad de ARNm específico del segmento B. *In vitro* se ha mostrado que la transcripción está dirigida por la VP1 y ocurre vía un proceso semi-conservativo, donde sólo es sintetizada la cadena positiva (Dobos, 1995b). Se han identificado complejos formados por VP1 y oligonucleótidos en células infectadas, oligonucleótidos que son idénticos a los extremos 5' de los ARN monocatenarios (ARNmc) de IPNV y se alargan para dar lugar a ARNmc y ARNbc intermediarios para, finalmente, alcanzar la forma de VPg-ARNbc (Magyar y col., 1998). La traducción del ARNm a proteínas virales comienza a las 3-4 horas p.i.

Ensamblaje y liberación

Durante el ensamblaje es posible la observación de pseudocristales de virus en el citoplasma mediante el microscopio electrónico (Granzow y col., 1997a) y entre las 16 y las 20 horas p.i., los viriones maduros son liberados, originando un característico efecto citopático (ECP) en la célula huésped (Wolf, 1966). El mecanismo de liberación de los virus se desconoce y, en cultivo celular, alrededor de la mitad de los virus permanecen asociados a las células.

2.5. Serología y clasificación

Aunque las diferencias, en cuanto a la composición química, entre los birnavirus acuáticos son leves, las relaciones serológicas entre ellos son complejas. En este sentido, la caracterización serológica de este grupo de virus es muy importante por razones epidemiológicas y también para el desarrollo de vacunas.

La primera evidencia de la existencia de diferentes serotipos de birnavirus acuáticos fue que los anticuerpos producidos contra virus aislados en EEUU no neutralizaban completamente otros virus aislados en Francia (Wolf y Quimby, 1971). El número creciente de birnavirus aislados a partir de una gran variedad de especies y lugares dio lugar a estudios que serotipaban los nuevos aislados (Lientz y Springer, 1973; McMichael y col., 1975; MacDonald y Gower, 1981; Okamoto y col., 1983). Los birnavirus acuáticos fueron definitivamente clasificados por Hill y Way (1995) en dos serogrupos (A y B), que no presentan reactividad cruzada por neutralización pero sí en inmunofluorescencia (Tabla 2.3). La inmensa mayoría de los birnavirus acuáticos, independientemente de las especies hospedadores o del origen geográfico, están relacionados antigénicamente y forman un serogrupo mayoritario, el serogrupo A. Este serogrupo se divide en nueve serotipos A1-A9 (Hill y Way, 1995). Todas las cepas arquetipo fueron aisladas originalmente en Norteamérica o Europa y la mayoría ocasionaron enfermedad en salmónidos. Las excepciones son la cepa He (serotipo A4) procedente de lucio (*Esox lucius*) y la cepa Te-2 (serotipo A5), aislado originalmente a partir de un molusco bivalvo, tellina (*Tellina tenuis*). Sin embargo, hay aislados de estos dos serotipos que proceden de salmónidos y más del 80% de los aislados del serogrupo A se detectaron en peces salmónidos.

Un número más reducido (menos de 10 cepas) se agrupan en el serogrupo B. Estas cepas se aislaron de peces e invertebrados marinos de Europa (Hill y Way, 1988)

y algunas son virulentas para truchas, ya que causan la típica necrosis pancreática en trucha salvelino (Ahne y col., 1989); otros son completamente avirulentos para salmónidos y no salmónidos (Hill y Dixon, 1987; Olesen y col., 1988).

Christie y col. (1988) sugirieron la existencia de un nuevo serotipo (N1) basándose en la reacción de virus aislados de salmones de piscifactorías noruegas, que correspondería al serotipo A10 según la clasificación de Hill y Way (1995). Sin embargo, hoy en día se acepta que los aislados noruegos pertenecen al serotipo A2.

Tabla 2.3. Clasificación serológica de birnavirus acuáticos.

Serotipo	CEPA TIPO	ORIGEN			REFERENCIA			
		Otras cepas	Especie	País				
SEROGRUPO A								
A1	WB (West Buxton)	West Buxton	Salmónidos	EEUU	Lientz y Springer, 1973			
		VR-299	Trucha arcoiris	EEUU	Wolf y col., 1960			
		WB-like	Salmónidos	América, África y Asia				
			Rodaballo	Noruega	Novoa y col., 1993			
			Robaliza	EEUU	Schutz y col., 1984			
A2	Sp (Sparajup)	Sparajup	Trucha	Dinamarca	Jørgensen y Brengballe, 1969			
			Sp-like	Salmónidos		Europa y Asia		
			N1	Rodaballo		Noruega	Mortensen y col., 1990	
		SBV	N1	Dorada	Camarón	Italia	Bovo y col., 1984	
					Vieira	Francia	Bonami y col., 1983	
				OV	Ostras	Noruega	Noruega	Mortensen y col., 1990
						Gran Bretaña	Gran Bretaña	Hill, 1976a
						Dinamarca	Dinamarca	Jørgensen y Grauballe, 1971
A3	Ab (Abild)	Abild	Trucha	Dinamarca	Jørgensen y Grauballe, 1971			
			Ab-like	Salmónidos		Europa y Asia		
		EVE	Rodaballo	Francia	Castric y col., 1987			
			Anguila	Japón	Sano y col., 1981			
A4	He (Hecht)	CV-HB-1	Almeja	Taiwán	Lo y col., 1988			
			Lucio	Alemania	Ahne, 1978			
A5	Te-2 (Tellina)	Tellina-2	Tellina	Gran Bretaña	Hill, 1976b			
A6	C1 (Canadá 1)	Canadá 1	Trucha	Canadá	MacDonald y col., 1983			
		AS	Salmón	Escocia	Munro y col., 1983			
A7	C2 (Canadá 2)	Canadá 2	Trucha	Canadá	MacDonald y col., 1983			
A8	C3 (Canadá 3)	Canadá 3	Trucha salvelino	Canadá	MacDonald y col., 1983			
A9	Ja (Jasper)	Jasper	Trucha	Canadá	Yamamoto, 1974			
SEROGRUPO B								
B1	TV-1 (Tellina virus-1)	Tellina 1	Tellina	Gran Bretaña	Hill, 1976b			
			Ostra	Gran Bretaña	Hill y Alderman, 1979			
		OV-2	Trucha	Alemania	Ahne y col., 1989			
			Carpa	Gran Bretaña	Hill, 1982			
			Limanda	Dinamarca	Olesen y col., 1988			

Aunque existe una variación en el patrón de reactividad de los birnavirus acuáticos, también existe una estabilidad a nivel de epitopo. Estos virus permanecen estables antigénicamente durante largos períodos de tiempo *in vivo*, llegando a 14 años en virus aislados de una población de truchas (Caswell-Reno y col., 1986). Esta estabilidad antigénica hace que una vacuna contra un determinado serotipo permanezca efectiva contra ese serotipo mucho tiempo.

2.6. Hospedadores y distribución geográfica

Los birnavirus constituyen el grupo de virus patógenos de especies marinas más ubicuo que se conoce hasta la fecha. Durante los años 60, siguiendo los pasos de Wolf, muchos investigadores detectaron el virus en salmónidos, sobre todo durante brotes epizoóticos. Durante los años 70 y 80 se realizó un escrutinio en peces no salmónidos cultivados y salvajes, lo que llevó al aislamiento de birnavirus acuáticos a partir de un rango de huéspedes muy amplio.

Estos virus se han aislado a partir de unas 80 especies de teleósteos, moluscos, crustáceos, agnatos y rotíferos, procediendo muchos de estos aislados de animales aparentemente sanos. Además, desde el primer aislamiento de IPNV en el este de los EEUU (Wolf y col., 1960), este virus ha sido aislado de un número creciente de zonas, siendo su distribución mundial.

Antes de finales de los años 80, el virus estaba presente en la mayor parte de Norteamérica. Sin embargo, debido a la concienciación de la transmisión vertical de este virus y a la regulación de los movimientos de los huevos de peces, la mayoría de los estados y provincias eliminaron o redujeron significativamente el virus de sus piscifactorías, especialmente en el oeste de los EEUU y en el este de Canadá.

Desafortunadamente la situación en Europa y Asia no es tan positiva. El virus se ha encontrado en casi todos los países de Europa (Melby y col., 1994), y su dispersión se debe a la transferencia de *stocks* contaminados y a la incapacidad de empezar la producción con *stocks* libres de virus sin dañar a la industria. Su amplia distribución en Asia se debe probablemente a la elevada frecuencia con que se producen importaciones de peces de otros países, especialmente de EEUU y Europa.

Con respecto a la distribución de los serotipos, el serotipo A1 (WB) se distribuye extensamente por los EEUU y también en Canadá. Los aislamientos de A1 en otros países se consideran consecuencia, generalmente, de la importación de huevos o peces de los EEUU (Sano, 1971; McAllister y Reyes, 1984; Bragg y Combrink, 1987). En este sentido, en España se han aislado cepas de este serotipo a partir de rodaballo (Novoa y col., 1993) y de salmón atlántico y trucha arcoiris (Cutrín y col., 2004).

Los serotipos A2 (Sp) y A3 (Ab) están ampliamente diseminados no sólo por Europa, sino también por muchos países de Asia. El serotipo A3 se ha detectado además en peces salvajes de aguas alejadas de la costa de los EEUU (McAllister y col., 1984). Los virus pertenecientes a los serotipos A4 (He) y A5 (Te-2) se han detectado exclusivamente en Europa. Los cuatro serotipos originalmente detectados en Canadá (C1, C2, C3 y Ja), están restringidos a ese país y cuencas contiguas en EEUU (Caswell-Reno y col., 1990). Ninguno de los serotipos canadienses fue encontrado fuera de Canadá, a pesar de que muchos peces han sido exportados a otros países.

Esta distribución serológico-geográfica no parece respaldar la hipótesis de que los birnavirus acuáticos hayan sido expandidos de continente en continente debido a la importación de peces y huevos. Parece más probable que el virus tuviese una distribución mundial anterior a su amplia diseminación en salmónidos desde el siglo XIX (Reno, 1999).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

La línea celular CHSE-214 se utilizó para la replicación viral por sus características de cultivo y la gran sensibilidad que poseen al IPNV (Kelly y col., 1978; Wolf, 1988; Dopazo, 1991; Novoa, 1993). Además, para el análisis del perfil proteico se empleó también la línea celular EPC. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio EMEM suplementado con penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y suero bovino fetal (FBS) al 10% y para su crecimiento se incubaron a 15 y a 25°C, respectivamente.

2. Cepas empleadas

2.1. Cepas del Flemish Cap

Para la realización de este capítulo se utilizaron un total de 24 aislados de birnavirus (Tabla 2.5) identificados previamente (capítulo 1), seleccionados en función de la especie de procedencia y de la representatividad de dicha especie en las capturas del Flemish Cap (FC) 99. Así, la mitad (12) se aislaron de fletán negro, 4 de gallineta, 3 de bacalao, 2 de platija, 2 de granadero y 1 de coreano. En la tabla 2.5 se han señalado los diferentes tipos de ensayos a los que se han sometido estas cepas para su caracterización, y que describimos a continuación.

2.2. Cepas de referencia

Para establecer una comparación con los perfiles genómicos y de restricción de nuestros aislados virales se emplearon las siguientes cepas de referencia de IPNV:

Ab (Abild): se aisló por primera vez en Dinamarca (Jørgensen y Grauballe, 1971) en la localidad de Abild a partir de trucha arcoiris; fue depositada en la ATCC (*American Type Culture Collection*) como VR-1319; es la cepa de referencia del serotipo A3.

Sp (Sparajup): fue aislada por Jørgensen y Brengballe (1969) en Dinamarca, en la localidad de Sparajup, a partir de trucha arcoiris: se depositó en la ATCC con el nombre de VR-1318; es la cepa de referencia del serotipo A2.

WB (West Buxton): fue aislada en el estado de Maine, en los EEUU, por Lientz y Springer (1973) a partir de trucha arcoiris. Incluida en la ATCC como VR-877, es considerada como la cepa de referencia del serotipo A1. De este serotipo se incluyó además la cepa Buhl, como control positivo en la comparación de los perfiles proteicos.

Tabla 2.5. Descripción de los aislados virales usados en este estudio y pruebas a las que fueron sometidos.

Especie de origen	Cepa	Perfiles genómicos	Perfiles proteicos	Western blot	RFLPs	Secuencia de NS y VP2
Fletán negro	12F1	x				
	14F4	x				
	14F5	x				
	14F6	x				
	14F7	x				
	17F2	x				
	17F3	x				
	17F9	x				
	19F3 _B	x	x	x	x	x
	20F2	x	x	x	x	x
	20F7	x				
20F9	x					
Coreano	5K1	x				
Bacalao	5B1 _D	x	x	x	x	x
	6B1 _A	x				
	6B1 _D	x	x	x	x	x
Platija	6P1	x				
	6P4	x				
Granadero	9R3	x	x	x	x	x
	17R5	x	x	x	x	x
Gallineta	19G3 _E	x				
	19G5	x	x	x	x	x
	19G7 _E	x				
	20G1 _D	x			x	x

Las cepas C1 (Canadá 1), C2 (Canadá 2) y Ja (Jasper), fueron aisladas en Canadá a partir de trucha arcoiris (Yamamoto, 1974; MacDonald y col., 1983) y se consideran las cepas de referencia de los serotipos A6, A7 y A9, respectivamente.

Además de las anteriores, para realizar el análisis comparativo de las secuencias de nuestros aislados con las de todas las cepas arquetipo del serogrupo A de IPNV se utilizaron también las secuencias de las cepas C3 (Canadá 3), He (Hecht) y Te-2 (Tellina), representantes de los serotipos A8, A4 y A5, respectivamente. La cepa C3 procede de trucha salvelino de Canadá (MacDonald y col., 1983), mientras que el origen de He y Te-2 es europeo, lucio de Alemania (Ahne, 1978) y tellina de Gran Bretaña (Hill, 1976b), respectivamente.

3. Comparación de los electroferotipos genómicos

Para este ensayo se llevó a cabo una semipurificación para virus no envueltos, tal y como se ha descrito en el capítulo 1 (apartado 7.1), de cada uno de los 24 aislados objeto de estudio, así como de las cepas de referencia Ab, Sp, WB, Ja, C1 y C2. El aquareovirus de salmón atlántico HBR se empleó como marcador de peso molecular (Dopazo y col., 1992). Una alícuota de 10 µl de cada virus semipurificado, resuspendido en SSC 1X, se incubó con SDS al 0,1 % y 2 µg/ml de proteinasa K durante 20 minutos a 56°C. Tras añadir 15 µl de tampón de carga FSB 2X (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%; β-mercaptoetanol 10%; azul de bromofenol 0,002%), las muestras se sometieron a 100°C durante 5 minutos y rápidamente se enfriaron en hielo. Posteriormente, las muestras se cargaron en un gel vertical de poliacrilamida-SDS al 7,5% y fueron sometidas a electroforesis en un sistema Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad) durante 5 horas a 150 V en tampón Tris-glicina 1X (0,003% Tris, 0,144% glicina,

0,001% SDS en agua Milli-Q) (Laemmli, 1970). Las bandas de ácido nucleico se visualizaron mediante tinción del gel con bromuro de etidio (5 µg/ml en agua destilada) durante 30 minutos y se fotografiaron bajo luz UV. La masa molecular de los segmentos de ARN genómicos se calculó mediante una recta de regresión obtenida usando como patrón los 11 segmentos genómicos del aquareovirus HBR.

4. Análisis de los electroferotipos proteicos

Los aislados del FC utilizados en este ensayo se inocularon en frascos de 25 cm² con monocapas confluentes de CHSE-214 y EPC. Tras observar ECP incipiente se recogieron los virus crudos y se sometieron a centrifugación a 1.500 x g durante 30 minutos para desechar los restos celulares. Los sobrenadantes se ultracentrifugaron durante 90 minutos a 90.000 x g y los precipitados se resuspendieron en 100 µl de tampón TNE (Tris-HCl 50mM pH 7,6; EDTA 0,5mM pH 8,0; NaCl 10mM). El medio de cultivo de las células sin infectar se incluyó como control negativo. La cepa Buhl de IPNV, perteneciente al serotipo A1, se empleó como control positivo.

Las proteínas estructurales de los viriones purificados se separaron mediante electroforesis vertical en geles de acrilamida-SDS al 12% durante 90 minutos a 150V, utilizando el sistema Mini-PROTEAN[®] II. Para ello previamente se mezclaron 7,5 µl de virus purificado con 7,5 µl de tampón de carga FSB 2X, hirviendo durante 10 minutos. Los geles se tiñeron con azul de *Coomassie* durante 30 minutos a temperatura ambiente y se destiñeron (con una solución de etanol al 95%, ácido acético glacial y agua destilada, en una proporción 4,5:4,5:1) durante 2 horas. Posteriormente se secaron en vacío a 50°C durante 45 minutos (*Slab Gel Dryer SGD 4050*, Savant). El cálculo del

peso molecular se llevó a cabo utilizando el estándar de peso molecular *Prestained SDS Molecular Weight Marker* (Sigma).

5. Western blot

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm (Bio-Rad) durante 90 minutos a 80 V utilizando el tampón de transferencia de Towbin y col. (1979). Las membranas se bloquearon durante 1 hora con leche en polvo al 10% diluida en PBS a 37°C. Tras el bloqueo las membranas se incubaron con un antisuero policlonal contra IPNV obtenido en conejo (diluido 1:1000 en PBS) durante 2 horas en constante agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces (20 minutos cada vez) con PBS-Tween 20 (0,05%) y se incubaron con el conjugado con fosfatasa alcalina (IgG de cabra, anti-conejo:FA, adsorbida con IgG humana; Stressgen) diluido 1:1000 con PBS-Tween 20 (0,05%). Las membranas se lavaron de nuevo con PBS y se revelaron con el sustrato de la fosfatasa (*AP conjugate substrate*, Bio-Rad) a temperatura ambiente durante un período de 5 a 20 minutos hasta obtener una tinción óptima. Las membranas se escanearon y los pesos moleculares de las proteínas virales se determinaron por comparación con los de los marcadores de peso molecular (Sigma).

6. Análisis de los fragmentos de restricción (RFLPs)

Para este análisis se empleó el método 2-SRA (*Two-Step Restriction Assay*) descrito previamente por Cutrín y col. (2004).

6.1. Extracción de ARN

Los 10 aislados del FC analizados mediante RFLPs se inocularon en frascos de 25 cm² con tapices confluentes de células CHSE-214 y, cuando el ECP era incipiente, se llevó a cabo una extracción de ARN total, empleando el kit *Trizol[®] LS Reagent* (BRL). Para ello, se mezclaron en un vial *Eppendorf* 200 µl del virus crudo y 700 µl de trizol y, después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se le añadieron 200 µl de cloroformo. Después de agitar los viales vigorosamente, se centrifugaron durante 15 minutos a 12.000 x g a 4°C en una microcentrífuga *Eppendorf*, y la fase acuosa se transfirió a otro vial. A esta fase acuosa se le añadieron 500 µl de isopropanol y, después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Después de centrifugar a 7.500 x g durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se vació completamente, se secó en un secador al vacío (*Speed Vac*, Savant) y se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas. El ARN así extraído se congeló a -20°C hasta su utilización.

6.2. Obtención del fragmento de restricción mediante RT-PCR

Para el análisis de restricción se eligió un fragmento de 1179 pb, correspondiente a la región de la VP2, previamente utilizada por otros investigadores (Novoa y col., 1993; Lee y col., 1996; Biering y col., 1997; Cutrín y col., 2004), empleando la pareja de cebadores A1/A2 (Tabla 2.6). Para la amplificación del fragmento se aplicó RT-PCR mediante el kit *SuperScript[™] One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq* (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo utilizando una alícuota de 5 µl del ARN extraído que se mezcló con 1 µl de cada uno de los cebadores y 5 µl de agua libre de nucleasas, y se sometió a desnaturalización durante 5 minutos a 98°C y renaturalización a 48°C durante 10

minutos. A continuación, se añadieron 25 µl de la mezcla de los 4 nucleótidos básicos (2X Reaction Mix), 13,5 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de MgSO₄ (50 mM) y 0,5 µl de *Superscript™ II RT/Platinum® Taq Mix*. La transcripción inversa se llevó a cabo a 48°C durante 45 minutos, y la reacción se detuvo mediante desnaturalización a 94°C durante 5 minutos. Seguidamente, la mezcla de reacción se sometió a 40 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, rehibridación a 60°C durante 45 segundos y extensión a 68°C durante 4 minutos) en un termociclador *Eppendorf*. Finalmente se procedió a una última fase de extensión a 68°C durante 15 minutos.

Tabla 2.6. Descripción de los cebadores empleados para RFLPs.

Cebadores	Secuencia	Posición *	Longitud esperada del producto de PCR	Región codificante
A1	5'-TGAGATCCATTATGCTTCCAG-3'	151-172	1179 pb	VP2
A2	5'-GACAGGATCATCTTGCCATAGT-3'	1309-1330		

* Las posiciones de los cebadores se indican según la secuencia de la cepa Jasper (Duncan y Dobos, 1986) (número de acceso de la GenBank M18049).

Para proceder a la visualización del producto de RT-PCR, una alícuota de 10 µl se mezcló con 5 µl de tampón de carga (xileno cianol: azul de bromofenol: glicerol, en una proporción 1:1:5) y se cargó en un gel horizontal de agarosa al 1,5% (*SeaKem® LE Agarose*, Biowhitakker Molecular Applications) en tampón TAE 1X (Tris 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 2 mM). Las muestras se sometieron a electroforesis durante 1 hora a 90 V, empleando, como marcador de peso molecular, el *100 bp DNA*

Ladder (Promega). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

6.3. Extracción y purificación del producto de PCR

El volumen restante del producto de RT-PCR se cargó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (*SeaKem[®] LE Agarose*, Biowhitakker Molecular Applications) y se sometió a electroforesis durante 2 horas a 100 V en tampón TAE 1X, utilizando como marcador de peso molecular el *100 bp DNA Ladder* (Promega). El gel se tiñó con bromuro de etidio (5 µg/ml en agua destilada). La banda específica se cortó con un escalpelo y el ADN se purificó con el kit *DNA Gel Extraction* (Montage), según protocolo del fabricante resuspendiendo finalmente el ADN purificado en tampón TAE 1X.

6.4. Tratamiento enzimático

El ADN extraído fue sometido a digestión enzimática con las endonucleasas de restricción *Pvu* II o *Eco* RI. Para el tratamiento se emplearon 5 µl de ADN a los que se les añadieron 15 µl de tampón TE 1X (Tris 10 mM pH 7,4; EDTA 1mM pH 8,0), 1 µl de la enzima de restricción correspondiente (8 a 12 U/µl) y 2 µl del tampón de restricción 10X (suministrado por la casa comercial). Esta mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche y, a continuación, se detuvo la reacción por choque térmico, transfiriendo los viales a -20°C hasta su posterior análisis.

6.5. Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos resultantes de la digestión del ADN se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 2% (*SeaKem[®]*

LE Agarose, Biowhitakker Molecular Applications) durante 3 horas a 100 V. El gel se tiñó con bromuro de etidio (5 µg/ml en agua destilada) durante 30 minutos y, tras el desteñido con agua destilada, se visualizaron las bandas con un transiluminador de luz UV. Como marcador de peso molecular se empleó el *100 bp DNA Ladder* (Promega).

7. Secuenciación de VP4 y VP2

7.1. Elección de cebadores

La secuencia de los cebadores empleados en este apartado se encuentra descrita en la Tabla 2.7 y sus posiciones relativas en el segmento A de IPNV en la Figura 2.4.

La pareja de cebadores Pr D, descrita por Blake y col. (1995) fue utilizada inicialmente para secuenciar una región de 174 pb de la región VP4 que nos permitiese una caracterización preliminar de nuestros aislados.

Tabla 2.7. Descripción de los cebadores empleados para el análisis de las secuencias de los birnavirus estudiados.

Cebadores	Secuencia	Posición ^b	Longitud esperada del producto de PCR	Región codificante
Pr D^a	D₁ 5'-AAAGCCATAGCCGCCCATGAAC-3'	2139-2160	174 pb	NS (VP4)
	D₂ 5'-TCTCATCAGCTGGCCAGGTAC-3'	2291-2312		
Pr IB	IB₁ 5'-ACCAAGACCAACTCAGC-3'	1563-1579	600 pb	NS (VP4)
	IB₂ 5'-GCAGCTGGAGGCCGCTA-3'	1602-1618		
	IB₃ 5'-CTCGTCGACCCCTGGTTG-3'	2184-2201		
Pr IB_{VP2}	IB_{VP2 ext+} 5'-GGGTTTGACAAGCCATACGT -3'	624-643	428 pb	Región hipervariable de VP2
	IB_{VP2 ext-} 5'-TTGGATACGCCGGCCACGGT -3'	1231-1212		
	IB_{VP2 int+} 5'-TACGAAATAGACCTCCCATG-3'	729-748		
	IB_{VP2 int-} 5'-ACCCCCGGCACATTGCCATT-3'	1156-1137		

^a Descritos por Blake y col. (1995). ^b Posición de los cebadores según la secuencia de la cepa Jasper (Duncan y Dobos, 1986) (M18049).

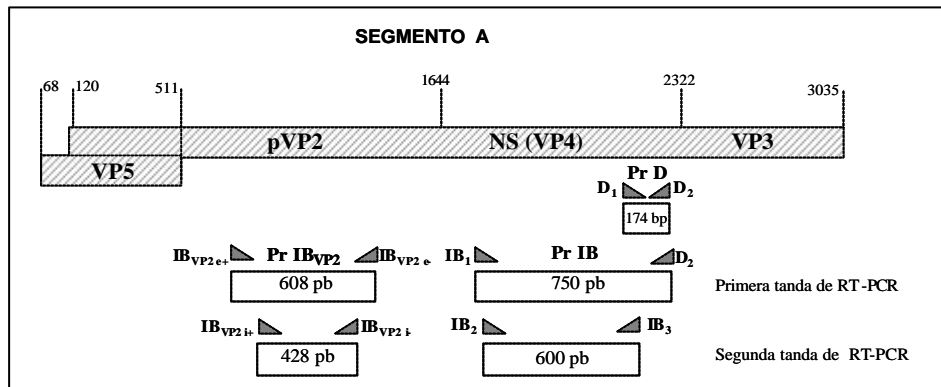


Figura 2.4. Mapa genómico del segmento A con la posición relativa de los cebadores Pr D, Pr IB y Pr IB_{VP2}, según la secuencia de la cepa Jasper (Duncan y Dobos, 1986) (número de acceso de la GenBank M18049).

Los cebadores Pr IB se utilizaron con el fin de secuenciar un fragmento de mayor tamaño (600 pb) de la misma región que permitiese caracterizar más en profundidad nuestras cepas. Finalmente, se emplearon los cebadores Pr IB_{VP2} para obtener un fragmento de 428 pb de la región hipervariable de la proteína VP2, responsable de la especificidad de serotipo de IPNV. En estos 2 casos se decidió realizar una *nested*-PCR, usando dos parejas de cebadores (externos e internos) para amplificar una cantidad de ADN suficiente para secuenciar. Tanto los cebadores Pr IB como Pr IB_{VP2} se sintetizaron en base a las secuencias publicadas del segmento A de las cepas West Buxton (número de acceso de la GenBank AF342727) y Dry Mills (número de acceso de la GenBank AF343571) (Blake y col., 2001), utilizando un sintetizador de ADN (*PCR mate 391*, Applied Biosystems) y se cuantificaron en un espectrofotómetro.

7.2. RT-PCR y *nested*-PCR

La RT-PCR se realizó en las mismas condiciones que las descritas en el capítulo

1. Para la *nested*-PCR, 2 µl del producto de RT-PCR se añadieron a 48 µl de una mezcla

de reacción constituida por 5 µl de tampón de PCR 10X (Applied Biosystems), 5 µl de MgCl₂ (2,5 mM, Applied Biosystems), 5 µl de dNTPs (200 µM cada uno, Promega, Inc.), 0,625 µl de cada cebador interno (20 ? mol/µl), 0,5 µl de Taq polimerasa (5 U/µl, Applied Biosystems) y 31,2 µl de agua libre de nucleasas. Las mezclas se sometieron a 1 ciclo de 2 minutos a 95°C y a 30 ciclos de PCR (en las mismas condiciones de la primera PCR).

Una alicuota de 10 µl de los productos de la *nested*-PCR se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (*DNA Grade*, Fisher Scientific) al 1,5% en tampón TBE a 200 V durante 45 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se observaron usando luz UV y se fotografiaron.

La purificación de los productos de RT-PCR se llevó a cabo con el kit *StrataPrepTM PCR Purification Kit* siguiendo el protocolo del fabricante y el ADN purificado se guardó a 4°C hasta su uso.

7.3. Secuenciación del ADNc

Los productos de PCR purificados se secuenciaron utilizando el método de la incorporación de terminadores dideoxi marcados con colorantes empleando el kit *Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (ABIPrism®). Para ello, 5 µl del producto de PCR purificado se mezclaron con 4 µl de la mezcla de reacción de terminadores y 1,6 µl de cada cebador (2 ? mol/µl). La reacción se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) usando el siguiente programa: 30 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C durante 4 minutos. Los nucleótidos no incorporados se eliminaron mediante columnas hidratadas *SephadexTM G-50 Medium* (Amersham Pharmacia Biotech AB). Las muestras se secaron a vacío en una microcentrífuga y se resuspendieron en 25 µl de TSR (*Template Suppression*

Reagent, Applied Biosystems). A continuación, las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 2 minutos, se transfirieron inmediatamente a hielo y se analizaron en un secuenciador *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (Perkin Elmer).

7.4. Análisis de las secuencias

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron utilizando el *software DNASTAR* (Lasergene). Las secuencias de aminoácidos se obtuvieron con el programa *EditSeq* y los alineamientos de los dos tipos de secuencias se llevaron a cabo con el programa *MegAlign*. Los árboles filogenéticos de tipo *Neighbour-Joining* se construyeron comparando las secuencias con *MegAlign*, empleando para ello el método *Clustal W* de alineamiento múltiple.

Para la construcción de los árboles filogenéticos se emplearon también las secuencias de otros aquabirnavirus depositadas en la base de datos GenBank con los siguientes números de acceso: AF078668 (WB-Vakharia), AF342727 (WB-Blake), AF343571 (DM), M18049 (Ja-Dobos), AF342735 (Ja-ATCC), AF342729 (Ab), AF342731 (Te-2), AF342732 (C1), AF342728 (Sp), AF342733 (C2), AF342734 (C3) y AF342730 (He). Debido a que la secuencia de la cepa WB remitida por Blake y col. (2001) y aquella remitida por Yao y Vakharia (1998) son sutilmente diferentes, hemos decidido incluir ambas. El mismo criterio se usó para incluir 2 secuencias de la cepa Ja, la de la ATCC (Blake y col., 2001) y la remitida por Dobos (Duncan y Dobos, 1986).

RESULTADOS

1. Comparación de los electroferotipos genómicos

El análisis de segmentos genómicos de ARN viral mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de los 24 aislados del FC reveló que la mayoría de estos aislados presentaban un perfil idéntico. En la figura 2.5 se pueden observar los perfiles genómicos obtenidos con algunas de las cepas analizadas. Con la excepción de dos aislados (6B1_D y 20G1_D) los restantes 22 mostraron un perfil genómico estrecho: el segmento A de un tamaño estimado de 2,06 MDa y el B de 1,93 MDa. En cuanto a los aislados que mostraron un perfil diferente, 6B1_D y 20G1_D mostraron perfiles más anchos, con pesos moleculares para los segmentos A y B de 1,98 y 1,80 MDa en el caso del aislado 6B1_D, y de 2,06 y 1,80 MDa en el caso del aislado 20G1_D.

En ninguno de los casos la movilidad de los segmentos genómicos de las cepas del Flemish Cap se correspondió exactamente con la de las cepas de referencia de IPNV incluidas en este estudio (Ab, Sp, WB, C1, C2 y Ja). No obstante, el patrón estrecho mostrado por la mayoría de los aislados del FC fue más próximo al de la cepa de referencia C2, mientras que el patrón ancho de 6B1_D y 20G1_D se aproximó al del resto de cepas de referencia.

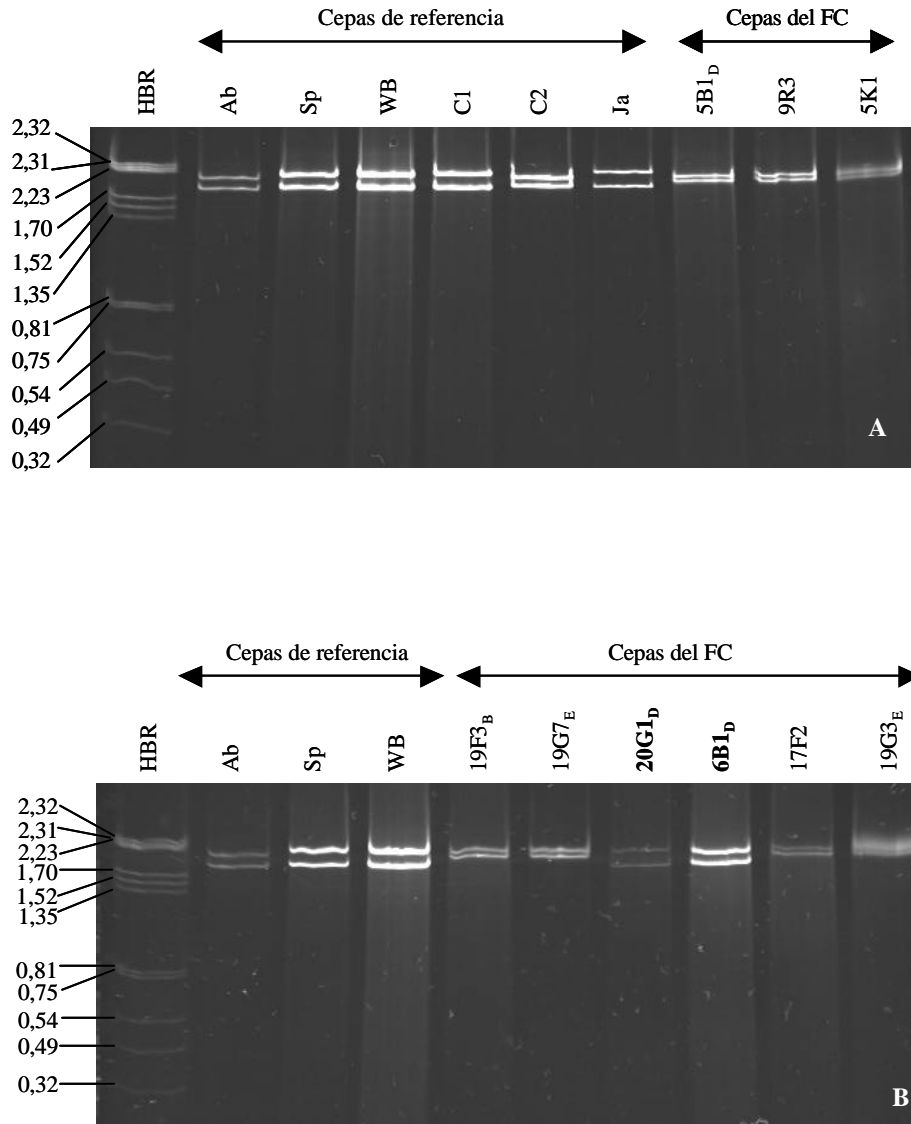


Figura 2.5. A y B. Comparación de los perfiles de ARN de los birnavirus del FC99, en geles de poliacrilamida al 7,5%. Los segmentos del ARN del aquareovirus HBR (Dopazo y col. 1992) se incluyeron como marcadores de peso molecular (cifras expresadas en MDa). En negrita se muestran los aislados con perfil genómico diferente.

2. Análisis del contenido proteico

Los resultados obtenidos con los 7 aislados del FC analizados mostraron que éstos compartían un patrón proteico semejante, con independencia de la línea celular utilizada (Figura 2.6 A). Este patrón estaba formado por 5 proteínas con unos pesos moleculares aproximados de 90, 55, 50, 25 y 20 kDa, correspondientes a las proteínas virales VP1, pVP2, VP2, VP3 y VP3a. Asimismo se observaron numerosas bandas de bajo peso molecular, que fueron las únicas que se apreciaron en el control celular sin inocular (Figura 2.6 A, calle C-).

Los ensayos de Western blot confirmaron que los electroferotipos proteicos de las cepas del FC obtenidos en células CHSE-214 (Figura 2.6 B) estaban formados por 5 bandas proteicas de origen viral, que se corresponderían con las proteínas VP1, pVP2, VP2, VP3 y VP3a.

La figura 2.6 C muestra los perfiles obtenidos con las cepas bajo estudio utilizando células EPC para la propagación viral. Tal y como se aprecia en la fotografía, las proteínas virales VP3 y VP3a sólo se detectaron en las cepas 19F3_B y 17R5 (únicos aislados que mostraron el patrón proteico completo), mientras que las proteínas pVP2 y VP2 se distinguieron claramente en todos los aislados y la proteína VP1 se detectó de forma muy tenue en algunas cepas.

Cabe destacar, además, que en ningún caso se detectaron las bandas de menor tamaño, confirmándose así su origen celular. Tampoco se apreció reacción entre el antisuero y los controles celulares sin infectar (datos no mostrados).

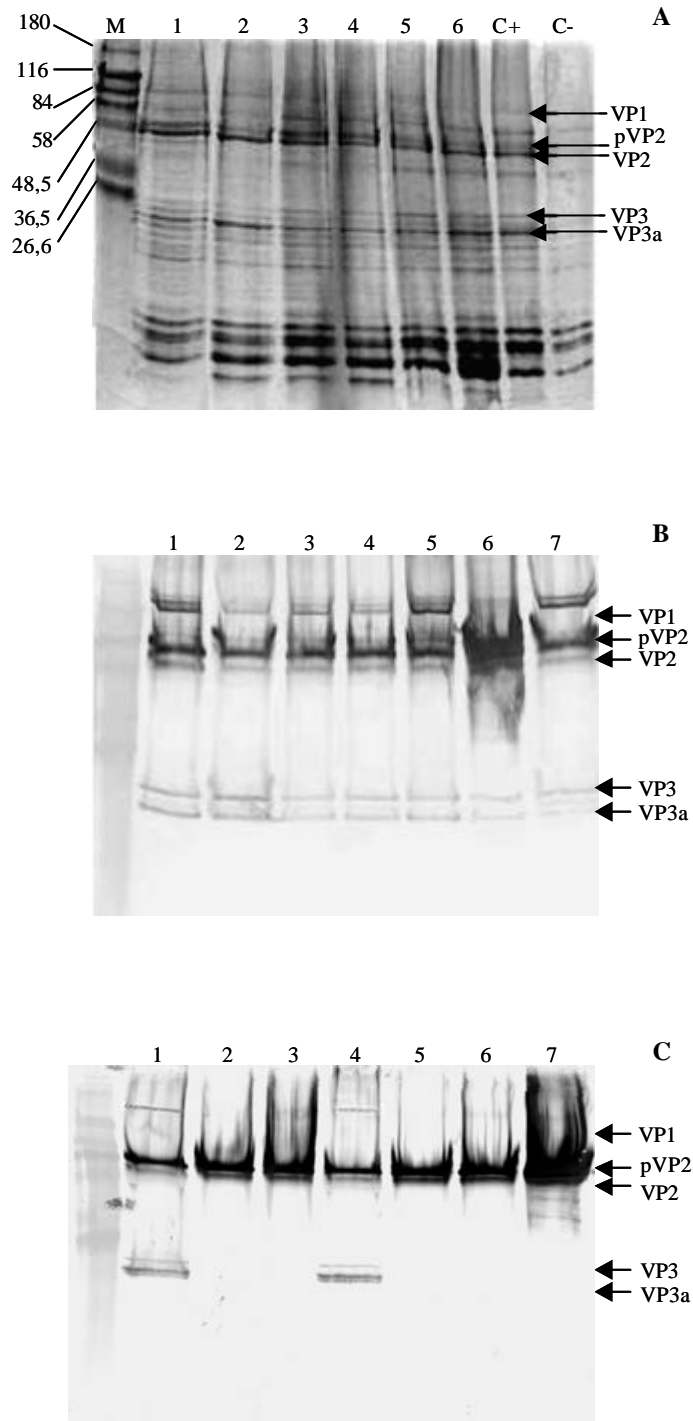


Figura 2.6. Contenido proteico de los aislados virales del FC. **A.** Perfil proteico de los aislados concentrados a partir de células CHSE-214 infectadas. **B.** Ensayo de Western blot aplicado a las proteínas virales obtenidas a partir de células CHSE-214 infectadas. **C.** Ensayo de Western blot aplicado a proteínas virales obtenidas a partir de células EPC infectadas. M: estándar de peso molecular, con los pesos moleculares expresados en kDa (*Prestained SDS molecular weight markers*, Sigma); 1: cepa 19F3_B; 2: cepa 5B1_D; 3: cepa 9R3; 4: cepa 17R5; 5: cepa 19G5; 6: cepa 20F2; 7: cepa 6B1_D; C+: control positivo, cepa Buhl de IPNV; C-: control negativo, células CHSE-214 no infectadas.

3. Análisis de los fragmentos de restricción (RFLPs)

El análisis de RFLPs reveló la ausencia de dianas de corte para la endonucleasa *Pvu* II (Figura 2.7 A), ya que en los geles de agarosa se apreció un único fragmento del mismo tamaño que el fragmento original (1179 pb), lo que según los estudios realizados por Cutrín y col. (2004), es característico de las cepas de referencia WB y He. Este resultado, y siempre siguiendo la técnica descrita por Cutrín y col., nos llevó a tratar el fragmento con la endonucleasa *Eco* RI obteniendo un patrón con 2 fragmentos de corte de 979 y 200 pb, indicativo de la presencia de una única diana de corte, característico de a cepa de referencia WB (Figura 2.7 B).

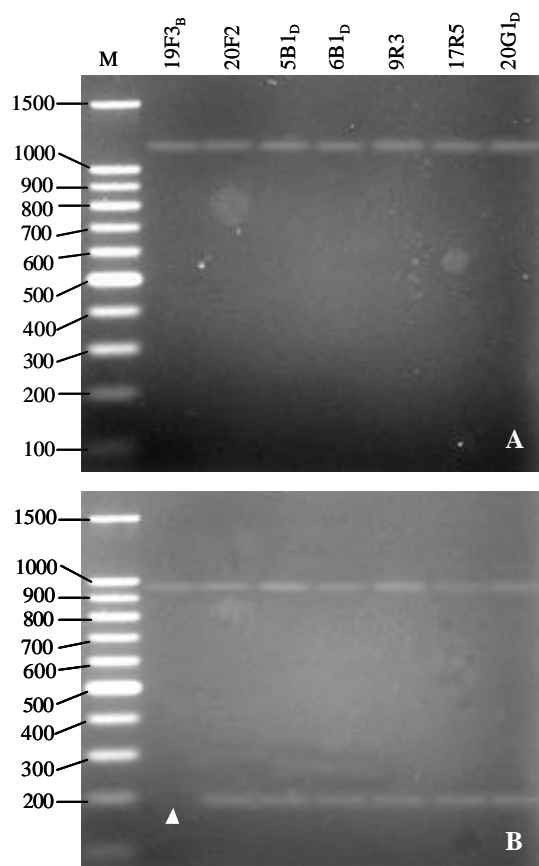


Figura 2.7. Patrones de restricción obtenidos en el tratamiento con las endonucleasas de restricción *Pvu* II (1 único fragmento de 1179 pb) (A) y *Eco* RI (2 fragmentos de 979 y 200 pb) (B). M, estándar de peso molecular de 100 bp *DNA Ladder*, Promega (11 fragmentos, de 100 a 1000 pb, con incremento de 100 pb, y una banda adicional de 1500 pb).

4. Análisis de secuencias

Se analizaron las secuencias de un total de 8 aislados del FC, que previamente habían sido analizados mediante RFLPs. Parte de estas secuencias se encuentran en la base de datos GenBank (números de acceso AY542851 a AY542863). Los resultados de una primera secuenciación realizada sobre un fragmento de 174 pb de la región VP4 del segmento A revelaron que todos los aislados eran idénticos, al menos en esta pequeña región y, además, indistinguibles de la cepa Dry Mills (DM), y con porcentajes de homología del 98,9% a nivel nucleotídico con la cepa West Buxton (WB).

En base a estos primeros resultados y, para detectar posibles diferencias entre estos birnavirus aislados en el FC o entre ellos y la cepa DM, decidimos secuenciar un fragmento de mayor tamaño (527 pb) en esta misma región. Los resultados de la secuenciación de este fragmento revelaron que 7 de las 8 cepas analizadas eran idénticas y que únicamente se apreciaba un nucleótido de diferencia en la cepa 9R3, que originaba un cambio en un aminoácido.

En la tabla 2.8 se muestran los porcentajes de semejanza en esta región entre los aislados del FC y las cepas de referencia, utilizando tanto las secuencias nucleotídicas como las secuencias de aminoácidos deducidas. Dado que las secuencias nucleotídicas de 7 de nuestros aislados son idénticas se representan bajo las siglas FC, como un único grupo, mientras que la cepa 9R3, aparece separada ya que mostró un nucleótido diferente, siendo el porcentaje de homología nucleotídica respecto al resto del 99,9%. Esta diferencia nucleotídica dio lugar a un cambio aminoacídico, representando un porcentaje de homología del 99,5%. En la tabla se observa que los 7 aislados (FC) son idénticos a la cepa DM, con porcentajes de semejanza del 100% a ambos niveles, nucleotídico y aminoacídico.

Además, todos los aislados mostraron una alta relación con las cepas WB, siendo los porcentajes de semejanza respecto a estas cepas de referencia de 99,9 y 99,6% (FC y 9R3, respectivamente) a nivel nucleotídico y de 99,5 y 99,1%, a nivel aminoacídico con WB (Vakharia) y de 99,3 y 99,2% a nivel nucleotídico y 100 y 99,5% a nivel aminoacídico con WB (Blake). Los porcentajes de homología también fueron elevados con las 2 secuencias de Ja analizadas, alrededor del 95% a ambos niveles. Los porcentajes de homología observados con las demás cepas de referencia incluidas en este estudio fueron siempre inferiores al 83%.

Tabla 2.8. Porcentaje de homologías aminoacídica (sobre las celdas negras) y nucleotídica (bajo las celdas negras) entre los aislados en el FC y las cepas de referencia para la región de 527 pb que codifica para la proteína VP4.

Porcentajes de homología de las secuencias de nucleótidos	Porcentajes de homología de las secuencias de aminoácidos														
		99,5	100,0	99,5	100,0	97,7	95,5	82,4	81,5	77,9	80,6	80,6	77,5	77,5	73,0
99,9		99,5	99,1	99,5	97,3	95,0	82,4	81,5	77,9	80,6	80,6	77,5	77,5	73,0	9R3
100,0	99,9		99,5	100,0	97,7	95,5	82,4	81,5	77,9	80,6	80,6	77,5	77,5	73,0	DM
99,9	99,6	99,9		99,5	97,3	95,0	82,0	81,1	77,9	80,2	80,2	77,5	77,5	72,5	WB (V)
99,3	99,2	99,3	99,2		97,7	95,5	82,4	81,5	77,9	80,6	80,6	77,5	77,5	73,0	WB (B)
93,6	93,4	93,6	93,3	94,0		94,1	82,0	81,1	77,5	80,2	80,2	76,6	76,6	72,1	Ja (D)
91,5	91,3	91,5	91,2	91,7	91,3		81,5	79,7	77,9	79,3	79,3	76,6	76,6	72,1	Ja (A)
77,1	76,6	77,1	76,8	77,0	77,2		92,8	89,2	92,8	93,2	86,9	86,5	77,5		Ab
77,2	77,1	77,2	76,9	77,3	77,2	76,9	88,0		92,8	91,0	91,4	85,1	85,6	77,5	Te-2
73,5	73,3	73,5	73,4	73,7	73,8	73,3	85,3	86,5		89,2	89,6	88,7	89,2	74,3	C1
76,8	76,1	76,8	76,5	76,9	77,2	76,3	86,7	87,1	83,7		99,5	86,9	86,9	77,5	N1
76,2	76,1	76,2	75,9	76,1	77,1	76,3	86,6	86,3	82,9	98,5		87,4	87,4	77,5	Sp
73,9	73,8	73,9	73,8	73,9	74,4	74,1	81,6	80,7	84,4	81,9	81,7		98,6	75,7	C2
73,8	73,6	73,8	73,7	73,7	74,2	74,2	81,4	80,4	84,7	81,6	81,4	98,4		75,2	C3
68,1	68,1	68,1	68,0	67,9	68,5	67,5	70,5	71,4	67,8	72,1	71,9	69,0	68,2		He
FC	9R3	DM	WB (V)	WB (B)	Ja (D)	Ja (A)	Ab	Te-2	C1	N1	Sp	C2	C3	He	Cepas

* FC, representación de todas las cepas analizadas, excepto 9R3.

Por otra parte, el análisis del fragmento de 370 pb de la región VP2 mostró que en este caso tampoco había diferencias entre los aislados del FC, con la excepción de la cepa 19G5, la cual presentaba un nucleótido diferente, que no se traduce en una diferencia aminoacídica (Tabla 2.9). La mayoría de los aislados FC fueron idénticos a la cepa DM a ambos niveles, mientras que la cepa 19G5 mostró un porcentaje de homología nucleotídica con DM del 99,7% y aminoacídica del 100%. Además, todas las

cepas mostraron una relación muy íntima con la cepa WB (Vakharia), con porcentajes de semejanza respecto a estas cepas de referencia de más del 99% tanto a nivel nucleotídico, como a nivel aminoacídico.

Con la cepa WB (Blake) también mostraron un elevado índice de homología, aunque ligeramente inferior al anterior, mostrando porcentajes de semejanza de 98,9 y 98,6% (FC y 19G5, respectivamente) a nivel nucleotídico, y de 97,6% a nivel aminoacídico. Con las 2 cepas Ja los porcentajes de homología de las cepas del FC, aunque relativamente altos, fueron inferiores a los descritos previamente: alrededor del 83,5% a nivel nucleotídico y de alrededor del 93% a nivel aminoacídico. Por último, los porcentajes de homología observados entre nuestros aislados y las demás cepas de referencia fueron siempre inferiores al 78%.

Tabla 2.8. Porcentaje de homología aminoacídica (sobre las celdas negras) y nucleotídica (bajo las celdas negras) entre los aislados en el FC y las cepas de referencia para la región de 370 pb que codifica para la proteína VP2.

Porcentajes de homología de las secuencias de aminoácidos																
Porcentajes de homología de las secuencias de nucleótidos		100,0	100,0	99,2	97,6	95,1	90,2	77,2	73,2	74,0	75,6	76,4	71,5	69,1	69,9	FC*
	99,7		100,0	99,2	97,6	95,1	90,2	77,2	73,2	74,0	75,6	76,4	71,5	69,1	69,9	19G5
	100,0	99,7		99,2	97,6	95,1	90,2	77,2	73,2	74,0	75,6	76,4	71,5	69,1	69,9	DM
	99,5	99,2	99,5		96,7	94,3	89,4	76,4	72,4	74,0	75,6	75,6	70,7	68,3	69,1	WB (V)
	98,9	98,6	98,9	98,4		92,7	88,6	77,2	71,5	72,4	74,0	74,8	69,9	67,5	68,3	WB (B)
	83,0	83,0	83,0	82,4	82,4		90,2	78,0	72,4	73,2	74,8	75,6	70,7	69,9	69,9	Ja (D)
	84,3	84,1	84,3	84,3	84,1	87,0		73,2	73,2	72,4	74,0	74,8	72,4	69,9	69,9	Ja (A)
	74,9	74,9	74,9	74,6	74,9	72,2	74,1		73,2	73,2	78,0	77,2	71,5	73,2	69,9	Ab
	70,3	70,3	70,3	70,0	69,7	70,5	70,8	75,9		88,6	75,6	74,8	72,4	72,4	69,1	Te-2
	70,5	70,5	70,5	70,3	70,0	69,2	71,1	77,3	85,4		76,4	76,4	73,2	73,2	65,9	C1
	71,1	70,8	71,1	71,4	70,3	71,6	73,0	77,3	76,8	75,1		97,6	77,2	74,8	80,5	N1
	72,2	71,9	72,2	72,2	71,4	72,4	74,1	76,5	76,8	75,7	96,5		77,2	74,8	80,5	Sp
	69,7	69,5	69,7	69,5	69,5	68,4	70,5	73,5	73,8	76,2	77,0	76,5		94,3	71,5	C2
	69,2	68,9	69,2	68,9	68,6	68,1	70,0	74,1	73,2	76,5	76,2	75,7	96,5		69,1	C3
	65,4	65,1	65,4	65,4	65,3	65,1	65,7	67,8	67,8	67,6	73,0	73,0	70,5	68,1		He
	FC	19G5	DM	WB (V)	WB (B)	Ja (D)	Ja (A)	Ab	Te-2	C1	N1	Sp	C2	C3	He	Cepas

* FC, representación de todas las cepas analizadas, excepto 19G5.

5. Análisis filogenético

La comparación filogenética de las secuencias ha confirmado que nuestros aislados están estrechamente relacionados con las cepas DM y WB de IPNV. De este modo, los árboles filogenéticos basados en los porcentajes de divergencia entre las secuencias de aminoácidos de ambas regiones muestran que, tanto en el caso de la VP4 (Figura 2.8), como en el de la VP2 (Figura 2.9) nuestros aislados se agrupan en el mismo *cluster* que las cepas DM y WB (Vakharia y Blake). Además, a este mismo *cluster* pertenecen las 2 cepas Ja incluidas en este estudio (Dobos y ATCC). Sin embargo, los demás tipos canadienses (C1, C2 y C3) no parece que guarden relación con nuestros aislados, ya que se incluyeron en otros *clusters*. Del mismo modo ocurre con el resto de los serotipos incluidos, que se agruparon en diferentes grupos.

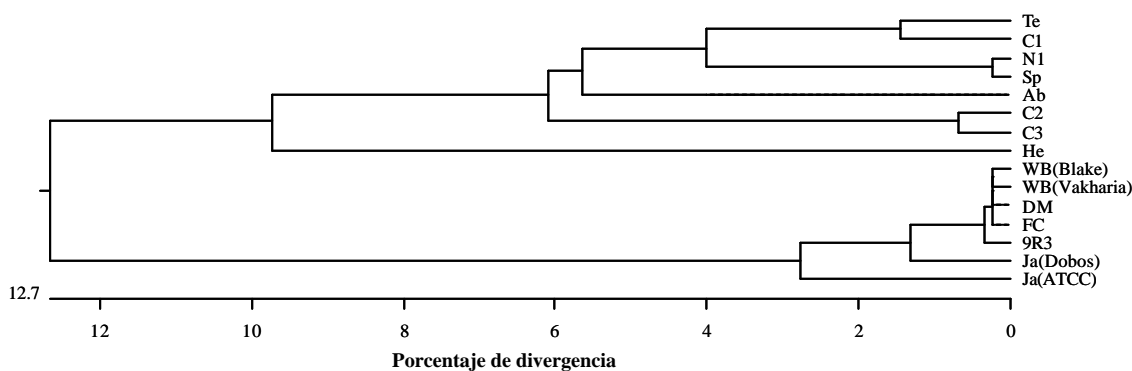


Figura 2.8. Dendrograma de *cluster* obtenido a partir del porcentaje de divergencia entre las secuencias de aminoácidos de la región de 527 pb del fragmento de la proteína NS (VP4) de nuestros aislados (representados por FC y 9R3) y cepas de los principales serotipos del serogrupo A de IPNV.

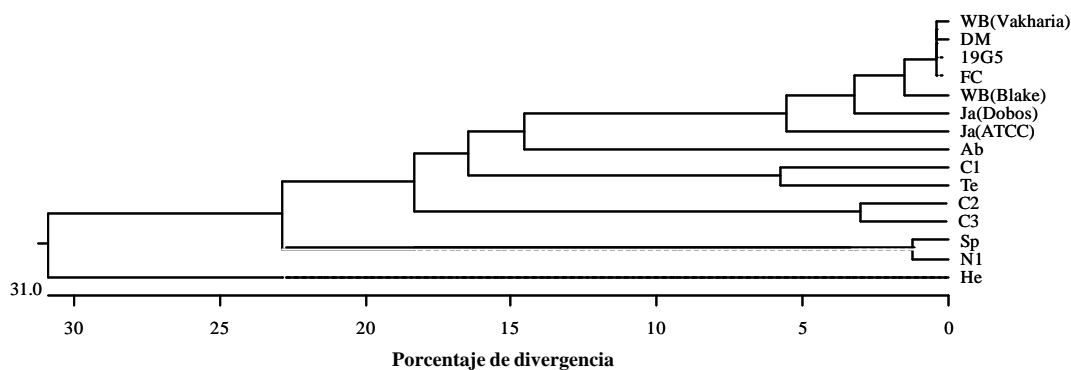


Figura 2.9. Dendrograma de *cluster* obtenido a partir del porcentaje de divergencia entre las secuencias de aminoácidos de la región de 370 pb del fragmento de la proteína VP2 de nuestros aislados (representados por FC y 19G5) y cepas de los principales serotipos del serogrupo A de IPNV.

DISCUSIÓN

IPNV se conoce principalmente como un virus que afecta a salmónidos en cultivo. Sin embargo, el rango de hospedadores de los birnavirus acuáticos es muy amplio, habiendo sido aislados a partir de numerosas especies de peces, cultivados o silvestres, moluscos y crustáceos (Hill, 1982; Ahne, 1985; Wolf, 1988).

Hasta los años 90, sólo se habían aislado virus tipo IPNV de algunas especies marinas: *Atlantic menhaden* (Stephens y col., 1980), lenguado de Florida (Helms, 1981; McAllister y col., 1983) y medregal del Japón (Isshiki y col., 1989; Hosono y col., 1996). A lo largo de la pasada década el número de aislamientos de estos virus a partir de peces marinos se incrementó considerablemente abarcando diferentes especies de platija y bacalao (Bandín y col., 1997; ICES, 1998; Mortensen y col., 1999; Crane y col., 2000), fletán (Bandín y col., 1997; Watanabe y col., 2002), coreano (Bandín y col., 1997), arenque (ICES, 1998), limanda, galludo chato y abadejo rosado (Crane y col., 2000) y jurel japonés y *dark banded rockfish* (Watanabe y col., 2002).

El análisis virológico de peces capturados en el transcurso de la campaña Flemish Cap 99 condujo al aislamiento de 24 birnavirus a partir de un gran número de muestras procedentes de 6 especies diferentes de peces. Con el objeto de llevar a cabo su caracterización en profundidad se sometieron a una batería de pruebas moleculares. En primer lugar se realizó un análisis de la variabilidad genómica de los aislados en función de la movilidad electroforética de los segmentos genómicos, método que aparece descrito en la literatura como una herramienta capaz de diferenciar cepas de IPNV (Hedrick y col., 1983a; Hsu y col., 1989; Dopazo, 1991; Kusuda y col., 1993; Cutrín y col., 2000). Los resultados indicaron que la mayoría de los aislados comparten un patrón estrecho de migración de los segmentos genómicos, próximo al del tipo C2; mientras que sólo 2 de las 24 cepas presentaron un perfil ancho y diferente entre sí, más próximo a los tipos A1, A2 y A3. Aunque según algunos autores, la comparación del ARN puede ser una herramienta útil a la hora de estudiar la epizootiología de las enfermedades víricas (Hedrick y col., 1985; Hsu y col., 1989), en este caso los electroferotipos genómicos no proporcionaron información concluyente, dado que no permitieron determinar a qué serotipo exacto pertenecían estas cepas. La imprecisión de esta técnica para el tipado de IPNV es un aspecto que ya había sido apuntado previamente por miembros de nuestro equipo (Cutrín y col., 2004).

Al igual que los perfiles genómicos, los perfiles electroforéticos de las proteínas también han sido usados por muchos autores para la comparación de las cepas de IPNV (Chang y col., 1978; Dobos y col., 1979; MacDonald y Gower, 1981; Hedrick y col., 1983a,b, 1985). En nuestro estudio el contenido proteico de las 7 cepas analizadas fue idéntico para todas ellas, además de ser el característico del virus IPNV. Las únicas proteínas que no se detectaron fueron la VP4 (para la cual hay discrepancia al respecto de si es estructural) y VP5, difícil de detectar debido a su pequeño tamaño y al escaso

número de copias existentes en el virión (Håvarstein y col., 1990). El análisis proteico llevado a cabo por MacDonald y Gower (1981) reveló que la presencia del producto de maduración de la VP3, la proteína VP3a, era característico y exclusivo de las cepas del serotipo A1. Por ello, la presencia de esta proteína en los aislados del FC analizados sugería que estos podían pertenecer a ese serotipo.

Con el fin de comprobar la naturaleza viral de las proteínas que aparecían en los electroferotipos se llevó a cabo un ensayo de Western blot con antisuero policlonal anti-IPNV. La reacción inmunológica permitió observar la existencia de 2 bandas muy reactivas, correspondientes a pVP2 y VP2, las proteínas antigénicas mayoritarias de la cápside de IPNV (Christie y col., 1988; Estay y col., 1990). La existencia de 2 bandas en esta región podría explicarse si se tiene en cuenta que la maduración de la pVP2 no es un proceso completo (Manning y col., 1990). Por otra parte, las bandas correspondientes a las proteínas VP3 y VP3a se detectaron en menor intensidad, lo que era de esperar dado que su porcentaje relativo (respecto al contenido proteico total) es inferior al de VP2, y la banda correspondiente a la VP1 se mostró muy tenue debido a que sólo representa el 4% del contenido proteico total. Un hecho interesante fue que cuando se llevó a cabo este análisis en la línea celular EPC las proteínas VP3 y VP3a sólo se detectaron en algunas cepas, mientras que la VP1 prácticamente no se detectó. Desconocemos la razón por la que al inocularlos en esta línea celular sólo 2 de estos 7 aislados mostraron un patrón proteico completo, dado que los estudios de movilidad electroforética realizados hasta la fecha se han llevado a cabo únicamente con cepas inoculadas en CHSE-214 (MacDonald y Gower, 1981; Hedrick y col., 1985). Sin embargo, probablemente este hecho esté relacionado con la formación masiva de túbulos, constituidos por pVP2 y VP2, como se tratará en el próximo capítulo.

Para llevar a cabo el estudio de los polimorfismos de restricción se escogió una región próxima al extremo amino terminal del segmento A, fragmento que codifica para la proteína VP2. Esta proteína es la de mayor tamaño y la responsable de la especificidad de serotipo, tanto en IPNV como en IBDV, así como de las diferencias a nivel serológico entre las cepas tipo, dado que incorpora la mayor parte de los determinantes antigénicos responsables tanto de las reacciones inmunológicas como de la interacción con los receptores celulares (Heppell y col., 1992). De este modo, al elegir este fragmento es posible realizar un estudio comparativo entre genotipos y serotipos, tal y como demostraron Cutrín y col. (2004), que encontraron una correspondencia directa entre la clasificación serológica de IPNV y la de los genotipos establecidos mediante RFLPs.

El análisis de los fragmentos de restricción de los birnavirus procedentes del FC reveló que todos los aislados presentaban el mismo patrón de restricción que la cepa WB del serotipo A1, considerada la cepa tipo americana, lo que sugiere que los virus aislados en el banco pesquero FC pueden proceder de ese continente, lo cual es esperable debido a su proximidad. Además la uniformidad de los patrones de RFLPs pone en tela de juicio nuevamente la fiabilidad del análisis de los electroferotipos genómicos como técnica de serotipado.

El análisis de las secuencias genómicas, tanto en el caso de la región NS (VP4) como en el de la VP2, reveló que la mayoría de los aislados del FC eran idénticos, con 2 únicas excepciones, las cepas 9R3 y 19G5, que mostraron un nucleótido diferente en ambas secuencias. Los resultados también mostraban que nuestros aislados eran idénticos a la cepa DM y estaban íntimamente relacionados con la cepa WB, ambas incluidas en el serotipo A1 y aisladas originalmente en Maine (EEUU) a partir de trucha (Lientz y Springer, 1973). Este resultado indicaba un posible origen común de estos

aislados, debido a la proximidad geográfica existente entre el FC y el estado norteamericano de Maine y confirma los resultados obtenidos por RFLPs. Además indica la existencia de una relación clara entre los virus IPNV procedentes de piscifactorías y aquellos de poblaciones marinas salvajes, tal y como ha sido puesto de manifiesto para otros virus de peces (Stone y col., 1997; Dixon, 1999).

CAPÍTULO 3

ESTUDIO DE LAS ESTRUCTURAS TUBULARES ASOCIADAS A LOS BIRNAVIRUS



RESUMEN

Para la realización de este capítulo hemos empleado 6 clones de birnavirus marinos procedentes de peces del banco pesquero Flemish Cap, que producían una elevada cantidad de estructuras tubulares, y un único clon escasamente productor de túbulos.

La técnica de inmunogold nos ha permitido determinar que estas estructuras están compuestas por proteínas de IPNV. Además, su formación no guarda relación ni con la MOI ni con la adaptación al cultivo celular, ocurriendo siempre en paralelo a la de los viriones. Los túbulos purificados mediante gradientes de CsCl están constituidos por las proteínas VP2 y pVP2, y carecen de genoma viral. La expresión *in vitro* de las proteínas virales confirmó el papel crucial que desempeña en la formación de estas estructuras tubulares la proteína pVP2 y señala hacia un error en su maduración a VP2 como causa de su existencia.

Por otra parte, el análisis de las secuencias del segmento A de las cepas formadoras de túbulos reveló la existencia de mutaciones especialmente importantes en 3 genes de este segmento (VP5, VP4 y VP3), mutaciones que podrían estar de alguna manera implicadas en el fallo en la maduración de pVP2 y, por lo tanto, en la formación de los túbulos.

Finalmente se discute el posible papel de los túbulos en el ciclo vital de este virus y en su relación con los huéspedes.

ABSTRACT

In this chapter we have employed 6 clones of birnavirus obtained from fish caught at the Flemish Cap fishery, which showed a high amount of tubular structures, and one unique clone, which hardly showed any tubules.

Immunogold labelling revealed that they are composed by viral proteins. Furthermore, their formation was not related to the MOI, neither to adaptation to cell culture, and took place in parallel to the formation of icosahedral particles. Their purification through CsCl gradients let us know that they are only composed by VP2 and pVP2 proteins, but no viral genome. *In vitro* expression of the viral proteins confirmed that pVP2 plays a very important role in the tubules formation and revealed that a mistake in its maturation process to VP2 could be the cause of their existence.

Sequence analysis of their genomic segment A revealed that the strains which produce tubules showed relevant mutations (at genes VP5, VP4 and VP3), which could be involved in that mistake occurring during the maturation process of pVP2 and, hence, in the tubules formation.

Finally the possible role of the tubules in the life cycle of the virus and its relationship to the hosts is discussed.

INTRODUCCIÓN

Según los principios de construcción viral de Caspar y Klug (1962) existe la posibilidad de que errores en el proceso de ensamblaje den lugar a partículas defectivas, siendo el error más probable la formación de estructuras tubulares. De hecho, estructuras de este tipo, con un diámetro y una conformación superficial similar a partículas virales, han sido observadas en asociación con diferentes virus, como el virus del polioma (Howatson y Almeida, 1960), virus del papiloma (Finch y Klug, 1965), virus de la rabia (Hummeler y col., 1967), virus de la laringotraqueitis infecciosa del cerdo (Watrach, 1962), ortoreovirus (Dales, 1963), rotavirus como los virus de la enteritis infantil (Holmes y col., 1975) y otros enterovirus (Oellerman y col., 1970; Murphy y col., 1971).

En virus de la familia *Birnaviridae* este tipo de túbulos, conocidos como túbulos tipo I (Harkness y col., 1975), poseen un diámetro de aproximadamente 50 nm y están formados por subunidades repetidas regularmente y compuestas principalmente del precursor proteico pVP2. Estas estructuras se han observado en los tres géneros de la familia: en birnavirus de peces (género *Aquabirnavirus*) (Moss y Gravell, 1969; Todd y McNulty, 1979; Schwanz-Pfützner y col., 1984; Özel y Gelderblom, 1985; Comps y col., 1991; Novoa, 1996; Granzow y col., 1997a; Espinoza y col., 2000; Crane y col., 2000), de pollos (género *Avibirnavirus*) (Harkness y col., 1975) y de insectos (género *Entomobirnavirus*) (Teninges y col., 1979). Además, en preparaciones del birnavirus de pollo IBDV purificado y en células infectadas por IBDV se ha detectado también otro tipo de túbulos, conocido como túbulos de tipo II, de menor diámetro y que contiene VP4 (Granzow y col., 1997b).

La primera visualización de túbulos relacionada con el IPNV fue llevada a cabo por Moss y Gravell (1969) en su estudio estructural de un aislado de trucha arcoiris en

células de *bluegill* (BGL). A las 7 y 8 horas post-infección detectaron haces de estructuras tubulares cercanas a partículas maduras de IPNV. Estos autores sugirieron que podría tratarse de formas aberrantes que se originaban por errores en el proceso de ensamblaje. Una década después, en 1979, Todd y McNulty, detectaron mediante microscopía electrónica de preparaciones de virus crudo de IBDV y de la cepa Ab de IPNV, estructuras filamentosas de longitud variable y de 50 a 70 nm de anchura. Debido a que su estructura superficial era similar a la de las partículas virales de 60 nm estos autores sugirieron que probablemente se tratase de agregados de proteína de la cápside viral.

En 1984, Schwanz-Pfützner y col. encontraron partículas filamentosas en el citoplasma de secciones ultrafinas de células RTG-2 infectadas con un birnavirus, el virus de anguila europea (EVE). Estos filamentos, con más de 2 μm de longitud y un diámetro de 56 ± 3 nm se visualizaron a las 72 horas post-inoculación (cuando el ECP era completo), junto a viriones isométricos y ocasionalmente mostraban una rara pero definida subestructura en su superficie y/o periferia, con extremos redondeados y cerrados, y sus cavidades mostraban estrías bien definidas. Estos autores sugirieron que ambos (viriones isométricos y las distintas formas tubulares) eran estructuras aberrantes originadas por un desequilibrio estequiométrico de los componentes estructurales del virión durante el proceso de ensamblaje.

En un estudio de la simetría capsidal de dos birnavirus purificados de peces (cepas VR-299 y EVE) y otro de pollo, Özel y Gelderblom (1985) observaron que el antisuero policlonal reaccionaba también, en ocasiones, con estructuras tubulares. Las micrografías obtenidas por estos autores mostraban túbulos de longitud variable (de 100 a 1000 nm) y formados por subunidades regularmente repetidas (10 nm de centro a centro) y que raramente mostraban extremos cerrados y redondeados. En imágenes de

uno de sus lados las partes cilíndricas de dichos túbulos mostraban un patrón hexagonal de subunidades proteicas.

En 1991 Comps y col. observaron túbulos de 60 nm de diámetro, asociados con viriones, en preparaciones de birnavirus purificados procedentes de rotíferos (*Brachirus plicatilis*). Posteriormente, Novoa (1996) demostró la naturaleza viral de estas estructuras tubulares o filamentosas cuando aplicó la técnica de inmunogold a la cepa WB de IPNV. En este estudio los túbulos tenían un diámetro aproximado de 60 nm y presentaban una elevada afinidad por un antisuero policlonal obtenido contra las 3 cepas de referencia mayoritarias de IPNV (Ab, Sp y WB). Por otra parte, Granzow y col. (1997a) detectaron, en células RTG-2 infectadas con la cepa europea Sp de IPNV, túbulos de diferentes longitudes y con un diámetro semejante al de las partículas virales completas.

En el año 2000, Espinoza y col., trabajando con una cepa de IPNV procedente de Chile e idéntica a la cepa VR-299, realizaron ensayos de inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales contra la proteína VP2 de IPNV y demostraron que esta proteína se localizaba en células infectadas formando agregados de estructuras alargadas durante la fase tardía de la infección. Estos autores creyeron que estos túbulos podrían tratarse de acúmulos de VP2 en su forma procesada o no (es decir, en forma de pVP2). En el mismo año Crane y col. visualizaron mediante microscopía electrónica (tanto en preparaciones de viriones purificados como en secciones ultrafinas de células CHSE-214 infectadas) formas tubulares de 70 nm de diámetro durante un examen de 5 especies de peces (trucha arcoiris, lenguado de Melbourne, bacalao de Australia, galludo chato, y abadejo rosado) capturados en Tasmania (Australia). Estas estructuras aparecían en asociación con birnavirus y reaccionaban con antisuero contra el serotipo Ab de IPNV.

No obstante, hasta el momento no se conoce ni el mecanismo de formación ni el significado biológico de estos túbulos. Por ello, y debido a la presencia en gran cantidad de este tipo de estructuras en las cepas del banco pesquero FC, el objetivo de este capítulo ha sido analizar las causas y mecanismos de su formación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares

La línea celular utilizada fue la CHSE-214, que se cultivó en medio EMEM suplementado con penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y suero fetal bovino (FBS) al 10%, y se incubó a 15°C.

Las células de tejido ovárico del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) se utilizaron para llevar a cabo los experimentos de expresión proteica. Estas células se cultivaron con medio de cultivo de insectos Grace's (Sigma) suplementado con 10% de FBS, y se incubaron a 29°C.

2. Cepas empleadas

2.1. Cepas de referencia

En el presente estudio se utilizaron 23 cepas de referencia del virus IPNV (Tabla 3.1). Del serotipo A1 se emplearon las cepas West Buxton (WB), VR-299, Reno (R), Powder Mill (PM), Buhl (Bh), Dry Mills (DM), Berlín (Br), Menhaden (MV), Striped Bass (SB) y Catthroat trout (CTT), además del aislado gallego 2310. Del serotipo A2 sólo se utilizó la cepa de referencia Sparajup (Sp). Del serotipo A3 se emplearon las

cepas Abild (Ab), EVE (*Eel Virus European*) y la cepa CVHB-1. De los serotipos A4 y A5 se emplearon las cepas de referencia Hecht (He) y Tellina-2 (Te-2), respectivamente. Del A6 se incluyeron 2 cepas de referencia: Canada 1 (C1) y Atlantic salmon (AS). Como representantes de los serotipos A7 a A9 se incluyeron las 3 cepas tipos de estos serotipos: Canada 2 (C2), Canada 3 (C3) y Jasper (Ja). Por último, como representante del serogrupo B se ha incluido la cepa Tellina virus 1 (TV 1).

Tabla 3.1. Cepas de birnavirus acuáticos utilizadas como referencia en este estudio.

Serotipo	Cepa	ATCC*	Origen		Referencia
			Pez	País	
SEROGRUPO A					
A1	West Buxton (WB)	VR-877	Trucha arcoiris	EEUU	Lientz y Springer, 1973
	LWVRT 60-1	VR-299	Trucha arcoiris	EEUU	Wolf y col., 1960
	Reno (R)	VR-869	Trucha arcoiris	EEUU	Heppell y col., 1992
	Powder Mill (PM)	VR-883	Trucha arcoiris	EEUU	Heppell y col., 1992
	Buhl (Bh)	VR-890	Trucha arcoiris	EEUU	Heppell y col., 1992
	Dry Mills (DM)	-	Trucha arcoiris	EEUU	Heppell y col., 1992
	Berlín (Br)	-	Trucha arcoiris	EEUU	Heppell y col., 1992
	Menhaden (MV)	-	Menhaden	EEUU	Stephens y col., 1980
	Striped Bass (SB)	-	Lubina	EEUU	Schutz y col., 1984
	Catthroat trout (CTT)	-	Trucha americana	EEUU	Heppell y col., 1992
	2310	-	Salmón atlántico	España	Cutrín y col., 2004
A2	Sparajup (Sp)	VR-1318	Trucha arcoiris	Dinamarca	Jørgensen y Brengballe, 1969
	Abild (Ab)	VR-1319	Trucha arcoiris	Dinamarca	Jørgensen y Grauballe, 1971
A3	EVE	-	Anguila	Japón	Sano y col., 1981
	CVHB-1	-	Almeja	Taiwán	Lo y col., 1988
A4	Hecht (He)	VR-1320	Lucio	Alemania	Ahne, 1978
A5	Tellina (Te-2)	VR-1321	Tellina	Gran Bretaña	Hill, 1976b
A6	Canada 1 (C1)	VR-1322	Trucha arcoiris	Canadá	MacDonald y col., 1983
	Atlantic salmon (AS)	-	Salmón atlántico	Escocia	Munro y col., 1983
A7	Canada 2 (C2)	VR-1323	Trucha arcoiris	Canadá	MacDonald y col., 1983
A8	Canada (C3)	VR-1324	Trucha salvelino	Canadá	MacDonald y col., 1983
A9	Jasper (Ja)	VR-1325	Trucha arcoiris	Canadá	Yamamoto, 1974
SEROGRUPO B					
B1	Tellina virus (TV1)	-	Tellina	Gran Bretaña	Hill, 1976a

* Nombre de la cepa registrada en la *American Type Culture Collection* (ATCC).

2.2. Cepas del Flemish Cap

Para la realización de este capítulo se utilizaron 7 cepas del Flemish Cap (Tabla 3.2). La mayoría de estas cepas, excepto la cepa 6B1, se seleccionaron en función de la elevada cantidad de partículas tubulares que se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión, acompañando a las típicas partículas icosaédricas. Dos de estas cepas proceden de bacalao (5B1 y 6B1), otras 2 son de fletán negro (17F2 y 19F3) y 3 de gallineta (19G3, 19G7 y 20G1).

Tabla 3.2. Cepas de birnavirus marinos del Flemish Cap empleadas para el estudio de las partículas tubulares.

Cepa	Pez de origen		Profundidad de captura *
	Nombre común	Nombre científico	
5B1	Bacalao	<i>G. morhua</i>	231
6B1			171
17F2	Fletán negro	<i>R. hippoglossoides</i>	628
19F3			303
19G3	Gallineta	<i>S. mentella</i>	303
19G7			303
20G1			414

* En metros.

3. Clonación en placa mediante diluciones seriadas

Con el objeto de separar los túbulos de las partículas icosaédricas, se aplicó la técnica de clonación en placa en la línea celular CHSE-214, como se describió en el capítulo 1. Los clones obtenidos se denominaron con el nombre de la cepa de origen, seguida de una letra mayúscula subíndice de la A a la F.

4. Microscopía electrónica

4.1. Contrate negativo

Para la visualización de la morfología y tamaño de los virus se empleó virus semipurificado según indicado en el capítulo 1. En el caso de expresión proteica, se emplearon las suspensiones de proteína purificada obtenida *in vitro* como se indicará en el apartado 8.5. En ambos casos, la suspensión a visualizar se adsorbió a rejillas de cobre con una película de formvar, que posteriormente se sometieron a tinción negativa con ácido fosfotúngstico, tal como se indicó en el capítulo 1. Para la visualización de las preparaciones se empleó un microscopio electrónico de transmisión (MET) Philips CM 12.

4.2. Inmunomicroscopía electrónica

Preparaciones de virus adsorbidos a rejillas (tal como se describió en el apartado anterior) se lavaron durante 30 segundos con PBS (pH 7,4) suplementado con seroalbúmina bovina (BSA) al 1%. Las uniones no específicas se bloquearon con una solución de bloqueo (Tris 0,1 M, pH 7,6; BSA 1%; FBS 2%; Tween 20 al 0,1%; en PBS) durante 30 minutos. Posteriormente las rejillas se secaron con papel de filtro y se incubaron con antisuero policlonal anti-IPNV obtenido en conejo (diluido 1:100) en una solución de leche en polvo en PBS durante 30 minutos. Las rejillas se lavaron, se secaron y, a continuación, se incubaron con el conjugado (anti-Ig G de conejo unida a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro) diluido 1:25 en una solución compuesta por NaCl 0,5 M, BSA al 0,1%, Tween 20 al 0,05% y FBS al 5% durante 30 minutos. Finalmente, se lavaron con agua destilada y se tiñeron con ácido fosfotúngstico para su examen con MET.

5. Estudio de la dinámica de crecimiento *in vitro*

5.1. Curvas de crecimiento

Para determinar la cinética de replicación *in vitro*, el virus se inoculó en tapices confluentes de células CHSE-214 en placas de 6 pocillos a una multiplicidad de infección alta (MOI = 1). Al mismo tiempo el virus se inoculó en frascos de 75 cm² para su visualización mediante MET con la intención de determinar si la presencia de partículas tubulares variaba simultáneamente. Los sobrenadantes se recogieron a diferentes tiempos p.i. (6, 12, 18, 24, 30 y 36 horas) y se titularon por el método de placas de lisis, como se indica a continuación, o se visualizaron por MET.

Por otro lado, y con el objeto de estudiar la posible relación existente entre la MOI y la formación de partículas tubulares, la cepa 19F3_B se inoculó a diferentes MOIs (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5) en frascos de 75 cm² con tapices confluentes de CHSE-214. Asimismo, se realizaron 5 pases consecutivos de esta cepa en esta misma línea celular con el fin de conocer la posible consecuencia de la adaptación al cultivo celular en la formación de estas partículas. En ambos casos, una vez desarrollado el ECP se llevó a cabo una purificación parcial y las muestras se examinaron mediante MET.

5.2. Titulación viral

La titulación se realizó mediante el procedimiento de placas de lisis. Para ello, diluciones seriadas del virus (de 10⁻⁴ a 10⁻⁸) se adsorbieron durante una hora a 15°C en placas de 6 pocillos con monocapas de células CHSE-214. A continuación, las células se lavaron con PBS y se cubrieron con 3 ml de agarosa al 1,2% (*Sea-plaque agarose*, BioWhittaker Molecular Applications) en EMEM con 5% de FBS y 1% de L-glutamina. Tras 3 días de incubación a 15°C, se retiró la capa de agarosa y las células se fijaron y

tiñeron con una solución compuesta por formalina al 25%, etanol al 10%, ácido acético al 5% y cristal violeta al 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las células con abundante agua destilada, las placas se contaron y el título viral se expresó como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml).

5.3. Replicación viral *in vitro*

Para este ensayo, el virus se inoculó en monocapas confluentes de células CHSE-214 en frascos de cultivo de 75 cm², a una MOI de 1. A los 6 días p.i., coincidiendo con ECP incipiente, se retiró el medio de cultivo y el tapiz celular se fijó durante 2 horas a 4°C con 1,5 ml de glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato sódico 0,2 M (pH 7,2). Transcurrido este tiempo, se raspó el tapiz y se vertió en 2 tubos de ensayo de vidrio; la suspensión se centrifugó a 4000 x g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante, mientras que los precipitados se juntaron en un único tubo y se incubaron con tampón cacodilato a 4°C durante toda la noche. El sobrenadante se retiró y se procedió a realizar una segunda fijación con tetróxido de ósmio (OsO₄) al 2% en tampón cacodilato durante 90 minutos a 4°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 4000 x g durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió agar al 1,5%. Una vez gelificado el agar se cortó el tapiz celular en pequeños fragmentos, retirando el agar sobrante. A continuación se llevó a cabo la deshidratación del tejido en una serie de soluciones de alcohol etílico de grado creciente (50°, 75°, 90°, 95°, 100°) durante 30 minutos cada una, finalizando con óxido de propileno (C₃H₈O) durante 30 minutos. Por último, las células se embebieron en 3 mezclas de óxido de propileno:epón, con cantidad creciente de epón (3:1, 1:1, 1:3) durante 1 hora cada una, finalizando con la impregnación en epón durante 15-30 minutos a 60°C. Transcurrido

este tiempo las células se distribuyeron en los moldes correspondientes utilizando nuevo epón y dejándolas polimerizar a 60°C durante 2 días.

Los bloques polimerizados se seccionaron en cortes semifinos de 1 μm de espesor en un ultramicrotomo (*Ultratome NOVA-LKB BROMA*) con cuchilla de vidrio y se tiñeron con azul de metileno al 1% para microscopía óptica, con el fin de seleccionar aquellas zonas que mostrasen una mayor cantidad de células incluidas. Posteriormente se realizaron secciones ultrafinas de 500-700 Å de las áreas seleccionadas con una cuchilla de diamante y se montaron sobre rejillas con formvar. Estas rejillas se tiñeron con acetato de uranilo al 3% durante 20 minutos, se lavaron con agua destilada, se secaron con papel de filtro y se contrastaron con citrato de plomo (en presencia de varias lentejas de NaOH para evitar la formación de precipitados de carbonato de plomo) durante 20 minutos. Finalmente se lavaron, se secaron y se archivaron hasta su examen con MET.

6. Contenido genómico y proteico de las estructuras tubulares

6.1. Separación en gradientes de cloruro de cesio

Cada uno de los clones virales que se utilizaron en este ensayo se inocularon en 15 frascos de 150 cm^2 con tapices confluentes de células CHSE-214. Tras la visualización de ECP generalizado, la suspensión de células se centrifugó a 3.000 x g durante 30 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se sometió a ultracentrifugación durante 90 minutos a 90.000 x g para concentrar los virus y el precipitado resultante se resuspendió en 500 μl de solución salina equilibrada de Hanks y se sometió a 3 pulsos de sonicación (durante 30 segundos a 20 kHz). Posteriormente, las muestras se colocaron sobre un gradiente discontinuo de CsCl (40, 30 y 20 % en

SSC IX) y se centrifugaron a 115.000 x g durante 22 horas a 4°C. Las diferentes fracciones se localizaron iluminando los tubos por la base y se recogieron por separado en viales *Eppendorf*. Los índices de refracción se midieron con un refractómetro (Bausch & Lomb) y los valores obtenidos se utilizaron como base para determinar las densidades ópticas. El contenido de las fracciones se purificó mediante columnas desalinizadoras (*Micro Bio-Spin® P-30 Tris Chromatography Columns*, Bio-Rad), centrifugando 4 minutos a 1.000 x g. Posteriormente se guardaron a -20°C hasta el análisis de su contenido genómico y proteico.

6.2. Análisis del contenido proteico

El análisis del contenido proteico de las diferentes bandas obtenidas en la centrifugación con CsCl se llevó a cabo en geles verticales de poliacrilamida-SDS al 12% y mediante Western blot, tal y como fue descrito en el capítulo 2.

6.3. Análisis del contenido genómico

El análisis del contenido genómico de las diferentes bandas obtenidas en la centrifugación con CsCl se llevó a cabo en un gel vertical de poliacrilamida-SDS al 7,5%, tal y como fue descrito en el capítulo 2. Asimismo, para el análisis del contenido genómico de las bandas obtenidas mediante centrifugación en CsCl se aplicó RT-PCR (según indicado en el capítulo 2), con la pareja de cebadores Jav1/Jav2 (Tabla 3.3), que amplifican un fragmento de 607 pb del segmento A (Oliveira y col., 1997, 1998).

Tabla 3.3. Descripción de los cebadores empleados en RT-PCR.

Cebadores	Secuencia	Posición *	Longitud esperada del producto de PCR	Región codificante
Jav	Jav 1 5'-GCAGTCATCTTTCC GTGTG-3'	1737-1756	607 pb	NS (VP4)
	Jav 2 5'-TGGAGTTCTGGGTCCATCCC-3'	2344-2325		

* Las posiciones de los cebadores se indican según la secuencia de la cepa Jasper (Duncan y Dobos, 1986) (número de acceso de la GenBank M18049).

7. Secuenciación de ácido nucleico

7.1. Extracción de ARN viral

Cada uno de los 7 clones analizados se inoculó en un frasco de cultivo de 75 cm² con tapices confluentes de células CHSE-214. Tras la visualización de ECP, el virus crudo se centrifugó a 16.000 x g durante 30 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 2 horas a 4°C y el precipitado resultante se resuspendió en 100 µl de agua tratada con dietil pirocarbonato (H₂O-DEPC). La suspensión viral se trató con proteinasa K (1 mg/ml) durante 4 horas a 37°C en tampón de proteinasa 2X (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; EDTA 12 mM; NaCl 150 mM; SDS al 1%). El ARN viral se extrajo con fenol/cloroformo y acetato sódico 0,3 M y se precipitó toda la noche con etanol absoluto a -20°C. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se centrifugó y se secó en un secador a vacío. Finalmente se resuspendió en 15 µl de H₂O-DEPC. El resultado de la extracción se comprobó mediante electroforesis del ARN en un gel de agarosa al 1%, y se guardó a -80°C hasta su uso.

7.2. Amplificación mediante RT-PCR

Para la secuenciación del segmento A se llevó a cabo amplificación, mediante RT-PCR, de 3 fragmentos de secuencia solapante. Para ello se emplearon 3 parejas de

cebadores: FA5'NC/WAApaR, FASpeF/FASalR y WA1850F/A3'NC (*sense* y *antisense*, respectivamente) (Tabla 3.4; Figura 3.1)

Para la RT-PCR se utilizaron 4,5 µl del ARN viral que se mezclaron con 1 µl de DMSO y 1 µl del cebador *antisense* (1 µg/30 µl), y se calentaron a 97°C durante 7 minutos. Al ARN desnaturalizado se le añadieron 23,5 µl de una mezcla de reacción para transcripción inversa (Applied Biosystems) conteniendo 3 µl de tampón de PCR 10X, 6 µl de solución de MgCl₂ 25 mM, 8 µl dNTPs (2,5 mM/cada uno), 1 µl de inhibidor de RNasas (20 U/µl), 1 µl de transcriptasa inversa MuLV (50 U/µl) y 4,5 µl de H₂O-DEPC. Esta mezcla se incubó a 42°C durante 2 horas, seguido de 5 minutos a 95°C para inactivar la transcriptasa inversa. A continuación, se añadieron 70 µl de la mezcla de reacción de PCR (Applied Biosystems) conteniendo 7 µl de tampón de PCR 10X, 2 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de cebador *sense* (1 µg/30 µl), 0,5 µl de ADN polimerasa Ampli Taq® (5 U/µl) y 59,5 µl de H₂O-DEPC; la mezcla se sometió a 35 ciclos de amplificación mediante PCR (desnaturalización durante 30 segundos a 95°C, rehibridación durante 30 segundos a 37°C (*ramping* a 72°C a 0,4°C/segundo) y extensión a 72°C durante 90 segundos en un termociclador PTC-200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc.), finalizando con una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Tabla 3.4. Cebadores empleados para la secuenciación del segmento genómico A completo, incluidas las regiones no codificantes (RNC).

Cebadores	Secuencia	Posición *	Longitud esperada del producto de PCR	Región codificante
FA5'NC	5'-GGAAAGAGAGTTTCAACG-3'	1-18	730 pb	Segmento A
WAApaR	5'-GTACCTCCTTGGTGCGATTG-3'	731-711		
FASpeF	5'-GGTCCACAACCAACTAGTGA-3'	571-591	1669 pb	
FASalR	5'-CTGAATCAGGTGTGATGC-3'	2240-2222		
WA1850F	5'-GTCCTATCCTACTTCAAGAAC-3'	1850-1870	1247 pb	
FA3'NC	5'-GAAGATCTCCCGGGGGGCC-3'	3097-3078		

* Las posiciones de los cebadores se indican en base a la secuencia de la cepa West Buxton (Yao y Vakharia, 1998) (número de acceso de la GenBank AF078669).

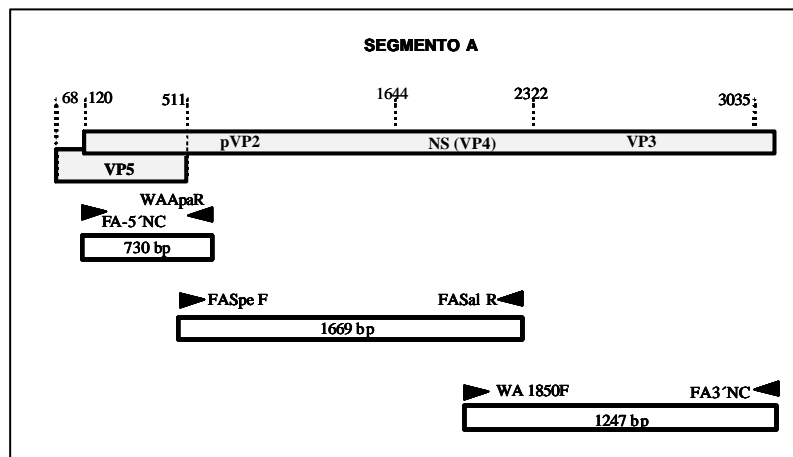


Figura 3.1. Mapa genómico del segmento A con las posiciones relativas de los cebadores empleados para su secuenciación, según la secuencia de la cepa West Buxton (Yao y Vakharia, 1998) (número de acceso de la GenBank AF078669).

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa (*DNA Grade Gels Agarose*, Fisher Scientific) al 1% en tampón TBE 1X (Tris 0,89 M; ácido bórico 0,89 M; EDTA 0,02 M) durante 1 hora a 100 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/ml) y se fotografiaron con luz ultravioleta.

7.3. Purificación del ADNc

La purificación del ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo usando el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente: el fragmento de ADN se escindió del gel de agarosa y se incubó con tampón *QG* (300 µl/100 mg) a 42°C durante 10 minutos. La muestra se cargó en una columna *QIA Quick Spin* con un tubo colector y se centrifugó durante 60 segundos a 15.800 x g. A continuación, se lavó con 750 µl de tampón *PE* centrifugando dos veces durante 60 segundos a 15.800 ? g para drenar el tampón y finalmente el ADN se resuspendió en 30 µl de H₂O-DEPC. La muestra se guardó a -20°C hasta el análisis de su secuencia.

7.4. Secuenciación del ADNc

Para la secuenciación se empleó el kit *ABI PrismTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* con la ADN polimerasa *AmpliTaq® FS*, ambos de Perkin Elmer. La secuencia se determinó en un secuenciador *Applied Biosystems DNA Sequencer*.

7.5. Análisis de secuencias

El análisis de las secuencias se llevó a cabo como se describió previamente en el capítulo 2. Con fines comparativos se emplearon las secuencias del segmento A de otros aquabirnavirus depositadas en la base de datos GenBank con los siguientes números de acceso: AF078668 (WB-Vakharia), AF342727 (WB-Blake), AF343571 (DM), M18049 (Ja-Dobos), AF342735 (Ja-ATCC), AF342729 (Ab), AJ489232 (2290), AF342731 (Te-2), AF342732 (C1), D00701 (N1), AF342728 (Sp), AF342733 (C2), AF342734 (C3) y AF342730 (He). Debido a que las secuencias de las cepas WB remitidas por Blake y col. (2001) y aquella remitida por Yao y Vakharia (1998) son sutilmente diferentes, se decidió incluir ambas. El mismo criterio se usó para incluir 2 secuencias de la cepa Ja, la de la ATCC (Blake y col., 2001) y la remitida por Dobos (Duncan y Dobos, 1986). Además, para el análisis de las secuencias génicas implicadas en la formación de túbulos, se incluyeron las cepas: AY026345 (R), AF343573 (Bh), D26526 (DRT), AF343572 (VR-299), AY026486 (EVE), AY026490 (AS), AY026482 (B) y AY026483 (d'H).

8. Clonaje y expresión proteica

Con el objeto de determinar qué papel juegan las proteínas pVP2 y VP2, codificadas por el segmento A, en la formación de estructuras tubulares se llevó a cabo su expresión mediante un sistema de baculovirus recombinantes. Para ello se generaron virus recombinantes derivados del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV), que expresaron la poliproteína PP (NH₂-pVP2-VP4-VP3-COOH) y las proteínas pVP2 y VP2.

8.1. Amplificación de las secuencias génicas PP, pVP2 y VP2

El clon de ADNc correspondiente al segmento A completo de la cepa WB de IPNV, obtenido según Yao y Vakharia (1998), fue donado por el Profesor Vikram N. Vakharia de la Universidad de Maryland (EEUU).

Para amplificar las secuencias génicas que codifican las proteínas PP, pVP2 y VP2, se aplicó PCR al clon de ADNc completo, empleando los cebadores descritos en la tabla 3.5. Las secuencias de los cebadores *antisense* para pVP2 y VP2 se diseñaron teniendo en cuenta los lugares de corte de estos polipéptidos descritos por Galloux y col. (2004).

Para ello se utilizaron 0,5 µl del clon completo de ADNc que se añadieron a una mezcla de PCR (Applied Biosystem) constituida por 5 µl de tampón de PCR 10X, 4 µl de una solución de MgCl₂ 25 mM, 4 µl de dNTPs (2,5 mM/cada uno), 1 µl de cada uno de los cebadores *sense* y *antisense* (1 µg/ 30µl), 0,5 µl de ADN polimerasa Ampli Taq® (5 U/µl) y 34 µl de H₂O-DEPC. A continuación se aplicaron 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, rehibridación a 55°C durante 45 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto) acabando con una fase de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Tabla 3.5. Cebadores empleados para la amplificación de los genes PP, pVP2 y VP2.

Cebadores	Secuencia	Posiciones *	Longitud esperada del producto de PCR	Región codificante
WBAIPNBgIIIF	5'- <u>AGATCT</u> ATGAACACAACAAAGGCAACCGCA-3'	119-142	2977 pb	Segmento A
FA3'NC HindR	5'-ATA <u>AAGCTT</u> GGGGGCCCCCTGGGGGGCC-3'	3096-3080		
WBAIPNBgIIIF	5'- <u>AGATCT</u> ATGAACACAACAAAGGCAACCGCA-3'	119-142	1523 pb	pVP2
WBApvp2R	5'- <u>AAGCTT</u> AAGCCCATGTGTCCATGAC-3'	1642-1625		
WBAIPNBgIIIF	5'- <u>AGATCT</u> ATGAACACAACAAAGGCAACCGCA-3'	119-142	1325 pb	VP2
WBAvp2R	5'- <u>AAGCTT</u> ATGCTTTTGATGTGGCAGG-3'	1444-1426		

* Las posiciones de los cebadores se indican en concordancia con las secuencias obtenidas de la cepa 19F3_B (número de acceso de la GenBank AY780921). Las secuencias subrayadas representan los lugares de restricción para las endonucleasas *Bgl* II (cebadores *sense*) y *Hind* III (cebadores *antisense*).

8.2. Clonaje

Los fragmentos obtenidos por PCR se purificaron empleando el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), según las instrucciones proporcionadas por el fabricante (ver apartado 7.3), y se clonaron entre los lugares de corte de la enzima *Eco* RI en el vector pCR® 2.1-TOPO linearizado con colas T, utilizando el kit de clonaje *TOPO* (Invitrogen Corp). Para ello se emplearon 3 µl del producto de PCR, 1 µl del tampón de la ligasa 10X, 2 µl del vector *pCR*® 2.1 (25 ng/µl), 1 µl de ADN T4 ligasa y 3 µl de agua destilada, incubando a 14°C toda la noche. Para la transformación en células de *Escherichia coli One Shot*®, éstas se mezclaron con 6 µl de la misma mezcla de ligamiento y se incubaron en hielo durante 20 minutos. A continuación se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 30 segundos y se volvieron a transferir a hielo durante 2 minutos. Posteriormente se añadieron 200 µl de medio S.O.C. (triptona al 2%; extracto de levadura al 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM; glucosa 20 mM) a las células y se incubaron a 37°C durante 1 hora en agitación. Transcurrido este tiempo se sembró este cultivo en placas de agar luria suplementado con X-Gal (100 µg/ml) y ampicilina (100 µg/ml). Las placas se incubaron durante toda

la noche a 37°C y, transcurrido este tiempo, las colonias de color blanco (que no expresan la galactosidasa porque contienen el inserto) se recogieron y se incubaron en tubos con 2 ml de caldo luria suplementado con ampicilina (100 µg/ml) durante 24 horas a 37°C con agitación constante de 250 rpm. El ADN recombinante se purificó empleando el kit *Wizard® Plus Minipreps* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente 1 µl del ADN recombinante se sometió a digestión enzimática con la endonucleasa *Eco* RI con el fin de seleccionar aquellos plásmidos que portasen los insertos. Los plásmidos seleccionados se sometieron a doble digestión enzimática con las endonucleasas *Bgl* II y *Hind* III, al tiempo que el vector *pFastBacDUAL* (Invitrogen Corp.) se linealizó mediante digestión con *Bam* HI y *Hind* III. Los fragmentos de ADN resultantes de estas digestiones se corrieron en un gel de agarosa y se purificaron con el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). A continuación los fragmentos de ADN correspondientes a las proteínas PP, pVP2 y VP2 se insertaron, tal y como se indicó anteriormente, en este segundo vector linearizado, específico para expresión en baculovirus, entre los lugares de corte de las enzimas *Bam* HI y *Hind* III, próximos al promotor del polihedron (P_{PH}). Los plásmidos resultantes se transformaron y propagaron en las células *JM109* de *E. coli* (siguiendo el protocolo utilizado para las células *One Shot®*) y se purificaron con el kit *Wizard® Plus Minipreps* (Promega).

8.3. Transposición del plásmido donante

Los plásmidos recombinantes que se generaron se sometieron a transposición en el genoma de las células *E. coli DH10Bac* (Gibco BRL), que poseen un cromosoma bacteriano artificial (BAC) que contiene el genoma entero de AcMNPV (bácmido). Para la obtención de bácmidos de ADN recombinantes (Figura 3.2), se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para ello una alícuota de 5 µl del

plásmido donante recombinante (aproximadamente 100 ng) se mezcló suavemente con 100 µl de las células *DH10Bac* y se incubó en hielo durante 30 minutos. A continuación se sometió a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se volvió a colocar en hielo durante 2 minutos. Posteriormente se añadieron 900 µl de medio S.O.C. y se incubó a 37°C durante 4 horas en agitación. Transcurrido este tiempo se realizaron diluciones seriadas de este cultivo que se sembraron en placas de agar luria con kanamicina (50 µg/ml), gentamicina (7 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml), Blue-Gal (100 µg/ml) e isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG, 40 µg/ml). Las placas se incubaron durante aproximadamente 40 horas a 37°C. Las colonias de color blanco (correspondientes a las bacterias portadoras de los plásmidos recombinantes) se recogieron y se incubaron en tubos con 2 ml de caldo luria, suplementado con kanamicina (50 µg/ml), gentamicina (7 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml) y Blue-Gal (100 µg/ml), durante 24 horas a 37°C en agitación constante. El báculo de ADN recombinante se purificó a partir de este cultivo tras proceder a la lisis bacteriana. Para ello se precipitaron los restos bacterianos con acetato potásico 3 M, el precipitado se lavó con isopropanol (14.000 x g, 10 min), se resuspendió en etanol 70% y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 x g. Posteriormente se secó el precipitado y se resuspendió en 40 µl de tampón TE.

8.4. Transfección de células de insecto Sf9 con el báculo recombinante

Para obtener los baculovirus recombinantes se realizó la transfección de células Sf9, en frascos de 25 cm², con los báculos recombinantes previamente obtenidos. Para ello una solución con aproximadamente 5 µl del báculo recombinante y 6 µl del reactivo lipídico *CellFectin* (Gibco BRL) se mezclaron suavemente con 200 µl de medio de cultivo *Grace's* (Sigma) sin suero y sin antibióticos y se incubó durante 30

minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, el complejo lipídico-ADN se mezcló suavemente con 0,8 ml de medio de cultivo sin suero, lo que se utilizó para cubrir el tapiz celular, previamente lavado con medio sin suero, incubando en agitación durante 5 horas a temperatura ambiente. A continuación esta solución se reemplazó por 2 ml de medio *Grace's* con 10% de FBS incubando las células a 29°C. Al cabo de 72 horas se realizó un primer pase utilizando 1 ml del medio de cultivo infectado, que se incubó nuevamente 72 horas, transcurridas las cuales el tapiz se despegó del fondo del frasco de cultivo y el virus crudo se centrifugó a 5.000 \times g durante 30 minutos a 4°C para precipitar los restos celulares. El sobrenadante se guardó a 4°C para su utilización en posteriores infecciones y el precipitado se lavó con 5 ml de PBS y se centrifugó de nuevo a 5.000 \times g durante 10 minutos a 4°C. Este segundo precipitado resultante se resuspendió en 100 μ l de PBS de los que una alícuota de 15 μ l se sometió a Western blot como se ha indicado previamente (capítulo 2), aunque con ligeras diferencias: la membrana que se empleó para este ensayo fue de fluorido polivinilideno (PVDF) de 0,45 μ m (Millipore); además, se utilizó un antisuero policlonal anti-WB y un conjugado con peroxidasa (IgG ligada a peroxidasa, obtenida en cabra contra IgG de conejo, Sigma). Una vez comprobada la producción de las proteínas de interés mediante Western blot, se realizó un segundo pase que se recogió a las 24, 48 y 72 horas p.i. y los extractos proteicos correspondientes se analizaron nuevamente mediante Western blot para determinar el tiempo p.i. en el que se alcanzaba un mayor grado de expresión proteica.

8.5. Producción y purificación de las proteínas heterólogas

Para la producción de las proteínas virales en grandes cantidades se utilizaron 5 frascos de 150 cm² con células Sf-9 que se infectaron con baculovirus recombinantes a

una MOI de 10. Cuando el ECP afectó a casi el 100% de las células (aproximadamente a los 4 días p.i.), la suspensión celular se centrifugó a 5.000 x g durante 20 minutos. Los precipitados resultantes se resuspendieron en 3 ml de PBS y se sometieron a 3 pulsos de sonicación (30 s/20 kHz) para romper las células. La suspensión se mezcló con freón (1:1), la mezcla se volvió a sonicar y se centrifugó a 12.000 x g durante 30 minutos. La fase acuosa resultante se cargó en un lecho de sacarosa al 30% (en SSC 1X), centrifugando durante 90 minutos a 100.000 x g. Las proteínas así purificadas se resuspendieron en 100 µl de tampón SSC 1X y se guardaron a -20°C hasta su posterior análisis mediante Western blot y microscopía electrónica.

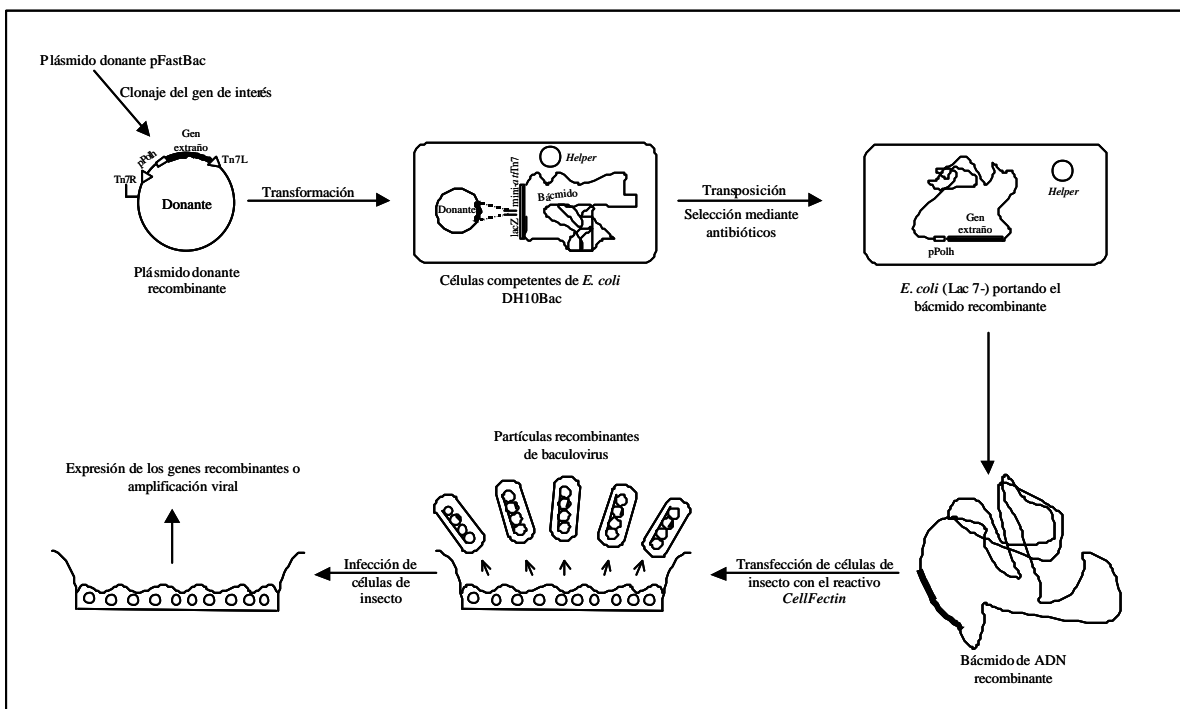


Figura 3.2. Representación esquemática de la generación de baculovirus recombinantes y expresión génica en un sistema de expresión BACTO-BAC.

RESULTADOS

1. Identificación de las estructuras tubulares

De todos los aislados virales a partir de los cuales se visualizaron estructuras tubulares asociadas a birnavirus (ver capítulo 1) se hizo una selección de 7, procedentes de bacalao (5B1 y 6B1), fletán (19F3 y 17F2) y gallineta (19G3, 19G7 y 20G1). Dichas estructuras de un diámetro de alrededor de 50 nm (Figura 3.3 A) se confirmó que estaban construidas con proteínas de virus IPNV por su reactividad positiva en el ensayo de inmunogold (Figura 3.3 B y C).

La selección de estas cepas se hizo en función de su capacidad formadora de túbulos; así, se trabajó con 2 grupos de cepas, unas (5B1, 17F2, 19F3, 19G3, 19G7 y 20G1) formadoras de túbulos en proporción relativamente alta (20% en 17F2 y 40% en las restantes), y otra no formadora o con formación muy minoritaria de túbulos (6B1).

Por otro lado, la observación mediante MET reveló que todas y cada una de las 25 cepas de referencia analizadas, independientemente de su clasificación serológica, contenían túbulos a la par que partículas icosaédricas típicas de birnavirus (Figura 3.3 D y E), si bien la relación de túbulos-partículas icosaédricas variaba entre cepas. En la mayoría de los casos se observó una relación 1:100, dominando notablemente la cantidad de viriones maduros. Sin embargo, cabe destacar que, excepcionalmente, en algunos casos la relación fue de 1:50, manteniéndose la predominancia de partículas icosaédricas, como sucedió con las cepas R y CTT (A1), Ab (A3), Te-2 (A5) y C3 (A8). Finalmente, en las cepas DM y VR-299 (A1) y He (A4) la proporción de partículas icosaédricas y túbulos observada fue 1:1.

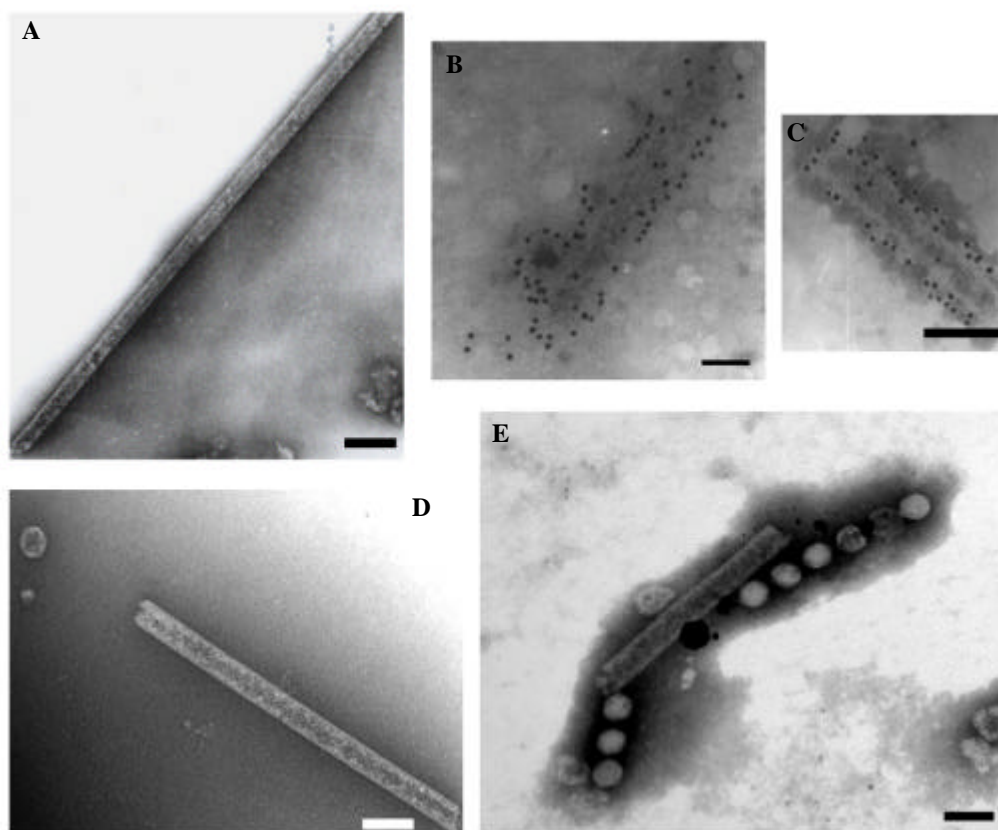


Figura 3.3. Identificación de las estructuras tubulares mediante inmunogold (IG). **A.** Morfología de las estructuras tubulares, visualizadas mediante MET. **B y C.** Estructuras tubulares (en las cepas 5B1 y 17F2, respectivamente) marcadas mediante IG con antisueros anti-IPNV. **D y E.** Estructuras tubulares en las cepas Ab y MV, respectivamente. Barras, 100 nm.

2. Clonación en placa mediante diluciones seriadas

Aunque la primera intención de la clonación en placa fue la obtención de las estructuras tubulares en cultivo puro, en ningún caso se logró la total separación de estructuras tubulares y partículas icosaédricas. No obstante, sí se obtuvieron clones con altos porcentajes de fracción tubular (en torno al 65%): 5B1_D, 19F3_B, 19G3_E, 19G7_E y 20G1_D. Los 5 clones restantes de cada una de estas cepas mostraron mayoritariamente partículas icosaédricas, por lo que se consideraron no aptos para el estudio de los túbulos. Además, en el caso de la cepa 17F2 no fue necesaria la clonación debido a su alto contenido en túbulos. Por otro lado, el clon 6B1_A se eligió por su mínima o nula cantidad de túbulos.

3. Estudio de la dinámica de crecimiento *in vitro*

La cinética de replicación de las 7 cepas fue muy similar (Figura 3.4) no habiendo prácticamente diferencia entre las cepas mayoritariamente productoras de túbulos y la cepa 6B1_A (que apenas produce túbulos). De las 6 a las 18 horas p.i. se produjo un aumento progresivo del título viral, que alcanzó sus niveles máximos a las 24 horas p.i. en todas las cepas, excepto en las cepas 5B1_D y 17F2, en las que el título máximo se obtuvo a las 30 horas.

Es interesante destacar que el método de titulación empleado, basado en la formación de placas de lisis, permitió la observación de diferentes fenotipos en cuanto a morfología y tamaño de las placas (Figura 3.5). Así, el tamaño de las placas originadas por la cepas 20G1_D y 6B1_A se distinguió a simple vista de las producidas por el resto de las cepas, ya fuese por su gran (20G1_D) o pequeño tamaño (6B1_A), en relación inversa al número de placas.

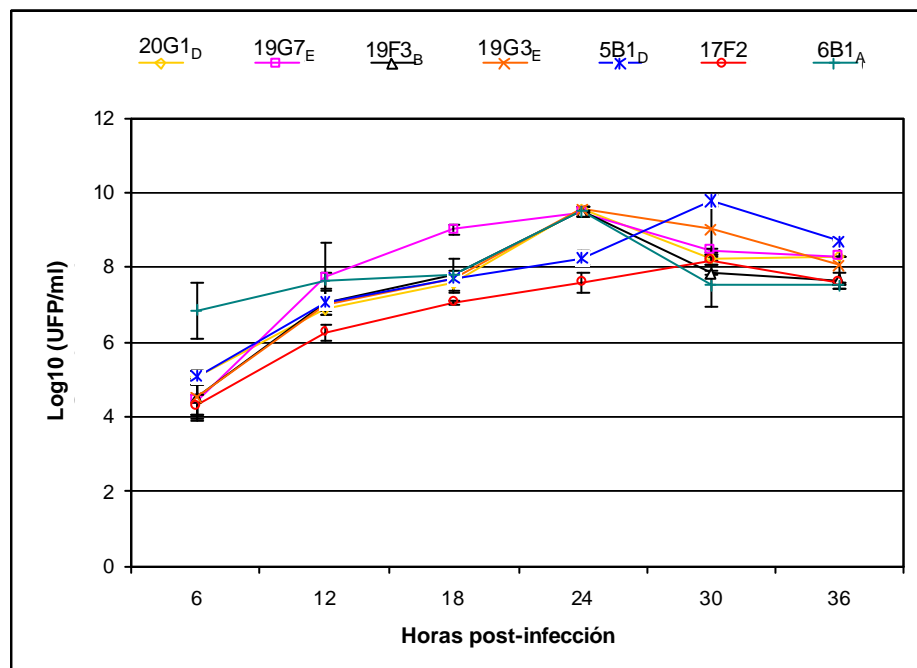


Figura 3.4. Curvas de crecimiento (en células CHSE-214) de las cepas de birnavirus bajo estudio. Se muestran los títulos medios obtenidos en 3 réplicas, así como la desviación típica (barras).

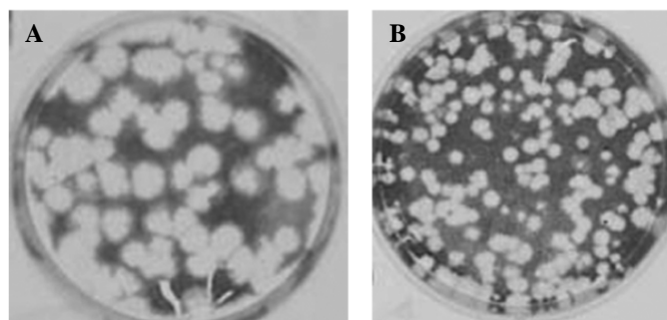


Figura 3.5. Morfología de las placas de titulación de los clones 20G1_D (A) y 6B1_A (B).

Con la finalidad de saber si la formación de las estructuras tubulares mantenía alguna relación con la dinámica de crecimiento de los birnavirus, a los diferentes tiempos p.i. se visualizó el virus mediante MET. Los túbulos se observaron siempre en compañía de viriones icosaédricos completos, no estando la formación de viriones completos eclipsada por la formación de túbulos o viceversa a ninguno de los tiempos p.i. estudiados. La única cepa en la que sólo se observaron viriones icosaédricos fue la cepa 6B1_A, en la que no se detectaron estructuras tubulares a ninguno de los tiempos p.i. analizados.

No se observó una relación clara (directa o inversa) entre la MOI de inoculación y la relación entre el número de túbulos y de viriones formados. Así, a las MOIs de 0,001, 1,5 y 2,5 se observaron el doble de viriones completos que de túbulos, y a la MOI de 0,1 se observaron cinco veces más viriones que túbulos. Sin embargo, a las MOIs de 0,5 y 2 la cantidad de túbulos fue considerablemente mayor que la de viriones. En los casos restantes (0,05 y 1) la relación túbulos: viriones se aproximó a 1.

Con el objeto de conocer si la proporción túbulos-partículas icosaédricas variaba en pases consecutivos, realizamos 5 pases de la cepa 19F3_B en células CHSE-214. La

observación al MET de los 3 primeros pases permitió visualizar mayoritariamente viriones completos (80%), lo cual es interesante si se tiene en cuenta que esta cepa fue seleccionada por poseer una gran cantidad de túbulos. Sin embargo, en el cuarto pase la cantidad de túbulos (95%) superó totalmente a la de viriones, y aunque en el quinto pase la cantidad de túbulos se redujo un poco, se observó el doble de estas partículas que de viriones.

4. Estudio de la replicación viral *in vitro*

El análisis mediante microscopía electrónica de los tapices celulares de CHSE-214 inoculados con la cepa WB reveló la existencia de una gran número de vesículas citoplasmáticas, próximas al núcleo y agrupadas en lo que podrían ser viroplamas (V), tal y como puede observarse en la figura 3.6 A. Además, en algunas de estas células se visualizaron agrupaciones de partículas virales completamente formadas en el citoplasma (Figura 3.6 B). Se observaron también otro tipo de agrupaciones virales en las que se apreciaron haces de aspecto filamentosos o tubular, en ocasiones asociados a partículas isométricas o inmaduras, de diámetro semejante (Figura 3.6 C). Por último, cabe destacar la visualización de partículas virales individuales en el exterior de la membrana celular (Figura 3.6 D).

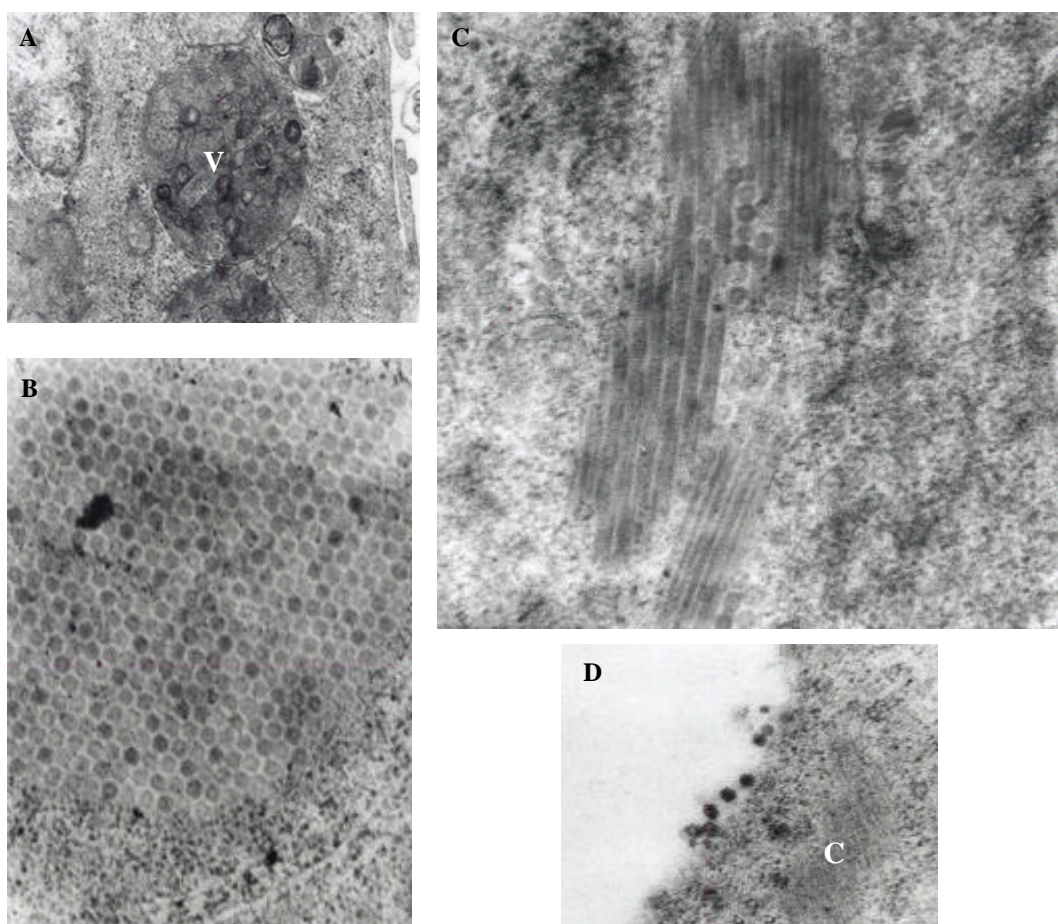


Figura 3.6. Estudio de la morfogénesis de la cepa WB en la línea celular CHSE-214. **A.** Viroplasma en el citoplasma. **B.** Agrupación de partículas virales icosaédricas detectada en el citoplasma. **C.** Agrupación de haces filamentosos o tubulares. **D.** Partículas virales en el exterior de la célula. V, viroplasma; C, citoesqueleto.

5. Composición de las estructuras tubulares

5.1. Separación de las estructuras tubulares

Tras la purificación de los clones del FC productores de túbulos en gradientes de cloruro de cesio se obtuvieron 3 bandas con diferentes densidades ópticas (Figura 3.7 A). La banda superior, con una densidad de $1,30 \text{ g/cm}^3$, fue la de mayor intensidad (mayor carga), mientras que las inferiores, de $1,32$ y $1,33 \text{ g/cm}^3$ de densidad, respectivamente, fueron mucho más débiles. La visualización del contenido de estas 3 bandas mediante MET (Figura 3.7 B) reveló que la banda de menor densidad (banda 1) contenía túbulos, mientras que la banda de densidad intermedia (banda 2) mostraba

mayoritariamente partículas icosaédricas vacías, así como algunas completas; por último, la banda de mayor densidad (banda 3) contenía viriones completos.

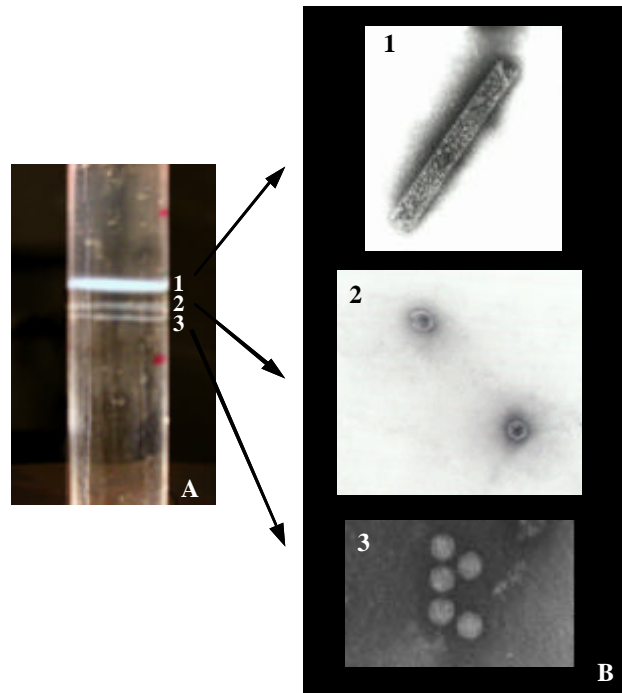


Figura 3.7. Separación de viriones y estructuras tubulares en gradiente de CsCl. Se muestran las 3 bandas obtenidas (A), con densidades ópticas de 1,30, 1,32 y 1,33 g/cm³ (bandas 1 a 3, respectivamente), así como el tipo de partículas de su contenido (B), visualizadas mediante MET.

5.2. Análisis del contenido proteico

El análisis del contenido proteico de la banda correspondiente a los túbulos (densidad 1,30 g/cm³) reveló que éstos parecían estar constituidos por los polipéptidos pVP2 y VP2 (Figura 3.8 A, calle b), ya que no fue posible detectar las bandas correspondientes a las proteínas VP3 y VP3a, detectados en los viriones completos (Figura 3.8 A, calle a), resultados que se confirmaron mediante Western blot (Figura 3.8 B).

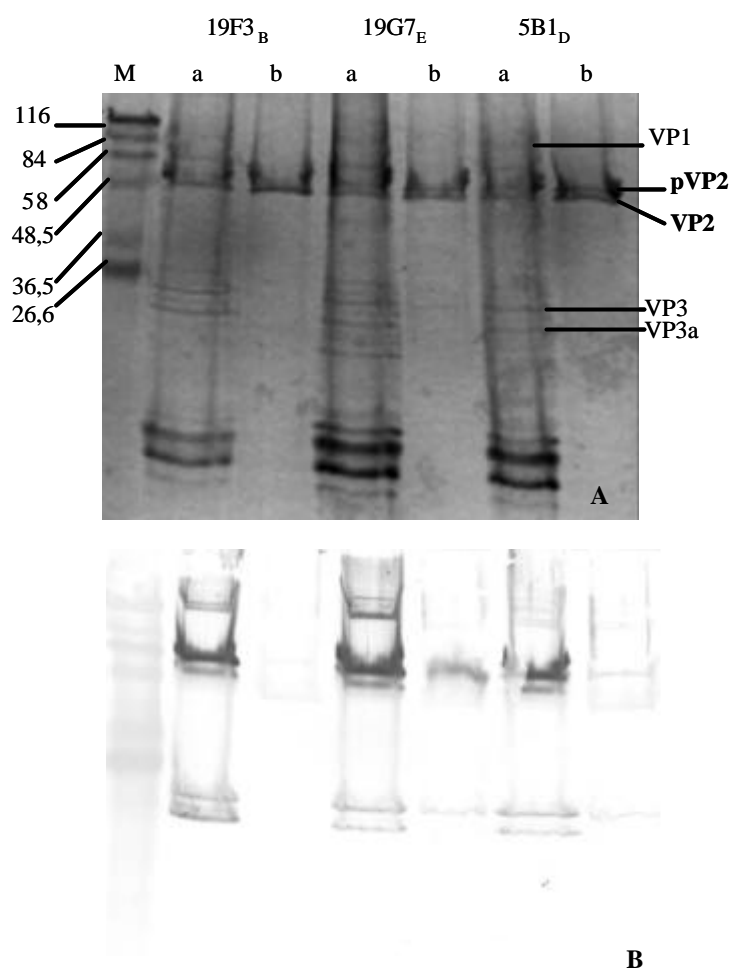


Figura 3.8. Análisis del contenido proteico en geles de poliacrilamida-SDS al 12% (A) y mediante Western blot (B) de las bandas obtenidas en la purificación con gradientes de CsCl de 3 birnavirus del Flemish Cap. **a**, banda de 1,33 g/cm³ correspondiente a viriones completos; **b**, banda de 1,30 g/cm³ correspondiente a los túbulos.

5.3. Análisis del contenido genómico

En geles de poliacrilamida-SDS (Figura 3.9 A) se comprobó que las fracciones 1 y 2 de CsCl no contenían ácido nucleico, mientras que la tercera fracción mostró el típico perfil bisegmentado de virus tipo-IPNV. La amplificación mediante RT-PCR (Figura 3.9 B) confirmó la ausencia de genoma viral en la banda correspondiente a los

túbulos (1) y su presencia en la banda 3; en el caso de la segunda banda, la RT-PCR demostró la presencia de las secuencias específicas para los cebadores empleados.

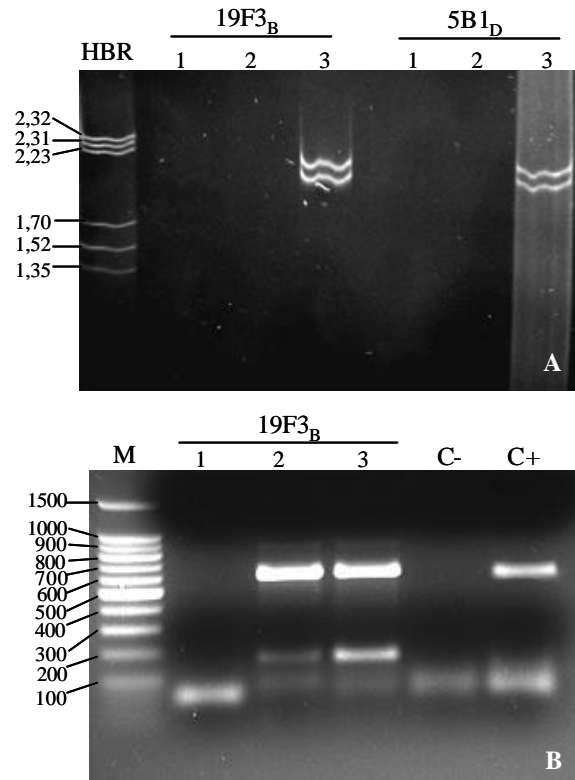


Figura 3.9. Análisis del contenido genómico de las 3 bandas (canales 1 a 3) obtenidas en la purificación mediante gradientes de CsCl. **A.** En gels de poliacrilamida-SDS al 7,5%; patrón de tamaño (en MDa) constituido por los segmentos genómicos del aquareovirus de salmón atlántico HBR. **B.** En gels de agarosa al 1%, después de su amplificación mediante RT-PCR con la pareja de cebadores Jav1/Jav2; C-, H₂O destilada en vez de ARN como control negativo; C+, ARN de 19F3_B como control positivo; M, marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Promega: 11 fragmentos en un rango de 100 a 1000 pb con incremento de 100 pb y una banda adicional de 1500 pb).

6. Análisis de las secuencias

Las secuencias nucleotídicas del segmento A obtenidas para los clones analizados se han incluido en la GenBank con los siguientes números de acceso: AY780918 (5B1_D), AY780919 (6B1_A), AY780920 (17F2), AY780921 (19F3_B), AY780922 (19G3_E), AY780923 (19G7_E) y AY780924 (20G1_D).

Todos los clones formadores de túbulos (5B1_D, 17F2, 19F3_B, 19G3_E, 19G7_E y 20G1_D) del FC mostraron una longitud de la secuencia del segmento A de 3098 nucleótidos (Apéndice, A.1), con una ORF PP de 2943 nucleótidos (posiciones 119 a 3061) que codifica una poliproteína PP (pVP2-VP4-VP3) de 981 aminoácidos, dos ORFs VP5 putativas, la primera de 48 nucleótidos que codificaría una proteína VP5 de 16 aminoácidos (descartada por su corta longitud), y una segunda de 402 nucleótidos (nucleótidos 112 a 513), correspondiente a una proteína VP5 de 134 aminoácidos. Por otra parte, el clon 6B1_A (no formador de túbulos) mostró una longitud del segmento A de 3095 nucleótidos, con una ORF PP de 2919 nucleótidos (nucleótidos 117 a 3035) que codifica una poliproteína de 973 aminoácidos y una ORF VP5 de 444 nucleótidos (nucleótidos 68 a 511) que codifica una proteína VP5 de 148 aminoácidos.

Utilizando como referencia la secuencia del segmento A de la cepa Ja-Dobos (que consideraremos como tipo 1) (Figura 3.10), comprobamos que la cepa 5B1_D (y todos los demás clones formadores de túbulos) mostraban una delección puntual en la posición 106 dentro de la ORF VP5 y poco antes del codón de iniciación de la ORF PP (tipo 2). Como se muestra en la Figura 3.10 la implicación directa de dicha delección es la aparición de un codón de terminación en el codón número 16 (nucleótidos 113 a 115) de la ORF VP5 original, y aparición de una nueva ORF VP5 putativa del nucleótido 112 al 513, cuya secuencia aminoacídica está truncada respecto la de la VP5 de Ja-Dobos (Figura 3.11). La cepa 6B1_A (tipo 3), por otro lado, mostró 3 delecciones en las

posiciones 106 a 108 (Figura 3.10) que le hacen perder 1 aminoácido en la posición 10 (Figura 3.11) respecto a la secuencia aminoacídica de Ja. En la tabla 3.6 se muestra la representación de los 3 tipos de cepas de referencia de secuencia VP5 conocida. Como se muestra en el apéndice (A.1 y A.2), las proteínas VP5 (deducidas de las secuencias nucleotídicas) del tipo de la de Ja (Dobos) se encuentran también en las cepas de referencia VR-299 y DRT; la VP5 de WB fue idéntica a la del clon 5B1_D, y el tipo 6B1_A se encontró en la cepa de referencia Ab.

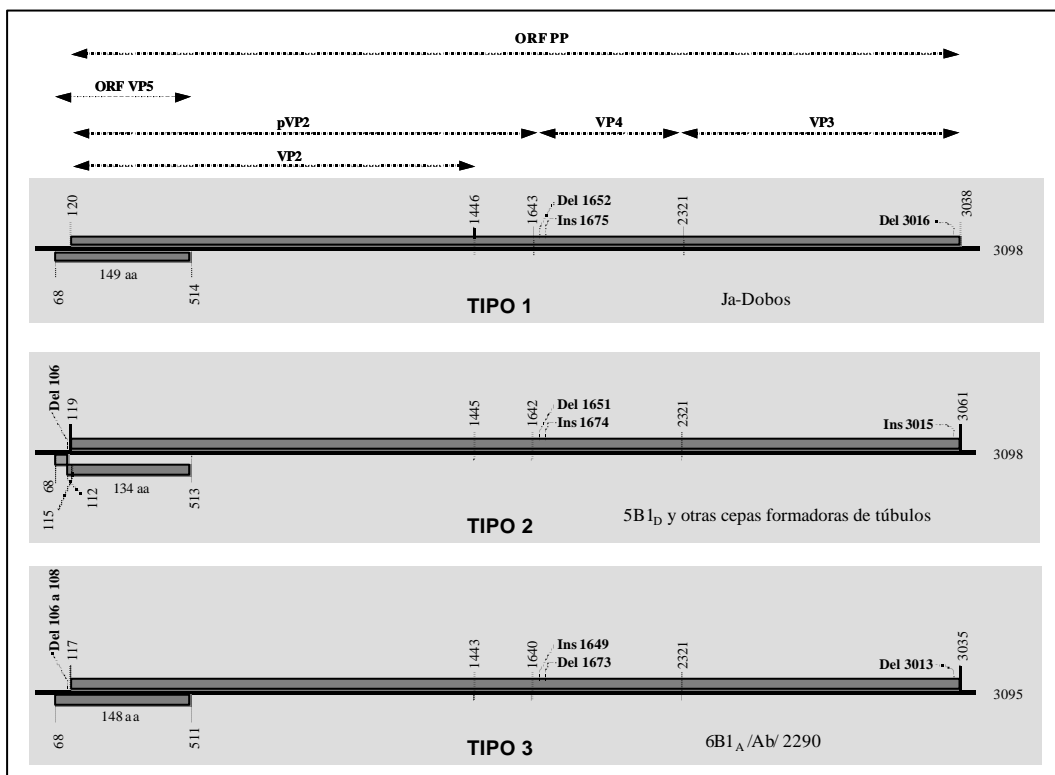


Figura 3.10. Representación esquemática de los 3 tipos virales observados en función de la naturaleza de sus secuencias del segmento A. Del, delección; Ins, inserción.

```

1 MAKALSNQ-TXLIXMNEHEQNRLLEIHYASREWISKHSGFNRETHIKIRDLVIQLRGLRLKWASCLLFWSSRIQRCFLQVESEPDGIRIRPVAGLVTGPEESI Consenso
1 .....P.I..Y.....I.....A.....AY.....I.I.....R.W.....R.....K.G. Ja-Dobos
1 .....NK.....I.....G.....S.....G.....V..... 5B1D
1 .....Q..S..QD.K.S.....V.....D..FQ.....G..L...F.L....G....C...F...T..K.G.S..M.C.....V.....F 6B1A

111 QLREXDLTEIRHPELXPSFWLCTQWDPERXHLRRKSV. Consenso
111 .....T.....N...SV.....C..... Ja-Dobos (1)
96 .....V.....D...P...R...CSY...F. 5B1D (2)
110 .....A.IQ...RSK.HAAG.A..PE.....R...Q... 6B1A (3)
    
```

Figura 3.11. Tipos de mutantes en el gen VP5. El tipo de mutación se indica entre paréntesis.

Tabla 3.6. Tipos de mutaciones detectadas en los genes VP5 y VP4 en las cepas de referencia y aislados del FC.

Serotipo	Genogrupo	Cepa	Tipo		Formación de túbulos
			Mutación observada en el gen		
			VP5	VP4	
A1	I	WB	2	1-2	98%
		VR-299	1	1-2	50%
		DM	-	1-2	50%
		DRT	1	1-2	ND
		Bh	-	1-2	1%
		R	-	1-2	2%
		Ja-Dobos	1	1-2	1%
		5B1 _D	2	1-2	? 75%
A2	IV	Sp	3	3	1%
		d'H	2 ^a	3	ND
		B	-	3	ND
A3	II	Ab	3	3	2%
		2290	-	3	ND
		EVE	-	-	98%
		6B1 _A	3	3	? 2%
A4	VI	He	-	1-2	0% / 98% ^b
A5	III	Te-2	-	3	2%
A6	III	C1	-	3	1%
		AS	-	3	2%
A7	V	C2	2	3	1%
A8	V	C3	-	3	2%
A9	I	Ja-ATCC	-	1-2	ND

^a Según Heppell y col., 1995. ^b Datos correspondientes a dos viales distintos. ND, no determinado.

Por otro lado, al comienzo de la secuencia VP4, muy próxima a los puntos de corte VP2-pVP2 y pVP2-VP4, se encontraron dos mutaciones puntuales interesantes. Así, Ja y 5B1_D (tipo 1-2) mostraron, respecto a 6B1_A (tipo 3) una delección que altera la pauta de lectura a partir del nucleótido 1652 (1651 en 5B1_D) y una inserción en 1675 (1674 en 5B1_D) que recupera la pauta de lectura (Figura 3.10). El número de aminoácidos afectados es de 9 y, como se muestra en la figura 3.12 esa secuencia aminoacídica se ve completamente alterada respecto a 6B1_A. En la tabla 3.6 se muestra la distribución de los 2 tipos de cepas (1-2 y 3) entre las cepas de referencia de secuencia PP conocida. Así, el tipo 1-2 está representado mayoritariamente entre los

serotipos americanos A1 y A9, aunque también se halla en la cepa He. Los restantes serotipos (incluyendo, entre otras, las cepas de referencia Sp, Ab, Te-2 y C1 a C3) mostraron la mutación de tipo 3 (tipo 6B1_A). En el apéndice (A.3.1 y 3.2) se muestran las agrupaciones de los distintos tipos de secuencia nucleotídica afectados por estas 2 mutaciones puntuales, resultados que se resumen en la tabla 3.7. Así, los serotipos europeos A2, A3 y A5, y el canadiense A6 mostraron la secuencia aminoacídica del tipo del 6B1_A (*cluster* IV), mientras que con el clon 5B1_D se agruparon las cepas de los tipos A1 y A9 (*cluster* I). Es de destacar que la cepa He se alejó del tipo Ja, a pesar de mostrar su mismo tipo de mutación (tipo1-2) (ver tabla 3.6); lo mismo ocurrió con las cepas C2 y C3 (serotipos A7 y A8), que se separaron de las demás cepas con la mutación de tipo 3.

El análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas de estos clones nos ha permitido detectar numerosas diferencias entre los clones formadores de túbulos y el clon no formador a lo largo de toda la longitud del segmento A. Las diferencias que no fueron silenciosas, es decir, aquellas que dieron lugar a un cambio en la secuencia aminoacídica se concentraron en la región hipervariable de la VP2 (aa 183-335), en la región de corte entre las proteínas pVP2 y VP4 (NS) (aa 470-585) y en la región final de la VP3 (aa 901-final). Cabe destacar, sin embargo, que estas diferencias a nivel aminoacídico también se detectaron en las demás cepas incluidas en esta comparación, que son las principales cepas de referencia del IPNV.

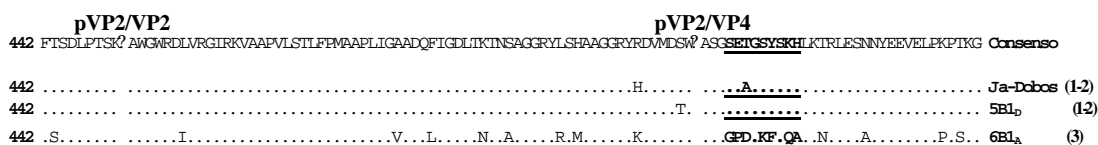


Figura 3.12. Tipo de mutantes en el gen VP4. El tipo de mutación se indica entre paréntesis.

Tabla 3.7. Tipos de secuencias aminoacídicas correspondientes a la región afectada por las 2 mutaciones puntuales (delección/inserción) al comienzo de la región VP4.

Cepa	Secuencia	Serotipo	Tipo ^a	Cluster ^b
Ja-ATCC	TETGYSYNSH	A9		
R	SEAGRYSKH	A1		
Ja-Dobos		A1		
Bh	SEAGSYSKH	A1	1-2	I
DRT		A1		
5B1 _D		A1		
DM		A1		
VR-299	SETGYSYKH	A1		
WB-Vakharia		A1		
He	SNTGRFSMS	A4	1-2	II
C3		A8		
	KQDGRFSQS		3	III
C2		A7		
Ab		A3		
EVE	GPDGKFSQA	A3		
Te-2		A3		
6B1 _A		A3	3	IV
AS		A5		
	GPDGKFSLA			
C1		A6		
B		A2		
dH	GPDGKFSRA	A2	3	IV
N1		A2		
Sp		A2		

^a Correspondencia con el tipo de mutación mostrada en la tabla 3.6. ^b Clusters según árbol filogenético mostrado en el apéndice A.3.2.

La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de la ORF PP del segmento A (Tabla 3.8) de las cepas del FC reveló que los 6 clones productores de túbulos (5B1_D, 17F2, 19F3_B, 19G3_E, 19G7_E y 20G1_D) mostraban un alto nivel de homología (99,0-100,0%), mientras que el clon 6B1_A mostró una menor semejanza con el resto de las cepas del FC (83,4-84,1%). En la tabla 3.8 también se muestra el resultado de la comparación de las cepas del FC con las secuencias de los principales

serotipos de IPNV disponibles en la base de datos GenBank. Los resultados indicaron que los clones productores de túbulos presentaban un alto nivel de homología a nivel aminoacídico con las cepas WB (Blake) (98,0-98,8%), WB (Vakharia) (98,3-98,9%) y DM (98,4-99,1%). Además, estos clones también mostraron elevados porcentajes de semejanza aminoacídica con las 2 cepas Ja (94,8-96,7%), especialmente con Ja (Dobos), mientras que la homología con el resto de las cepas de IPNV incluidas fue siempre menor del 84,6%. Sin embargo, el clon 6B1_A mostró un mayor grado de parentesco con la cepa Ab, exhibiendo una homología del 98,2% con esta cepa europea.

Finalmente, se detectó otra mutación específica hacia el extremo C-terminal de la secuencia de la VP3 (Figura 3.10). Así, en las cepas formadoras de túbulos (tipo 2) se observó una inserción en la posición 3015 de la secuencia nucleotídica, que provoca una alteración de la pauta de lectura, alargando la ORF en 24 nucleótidos (8 aminoácidos) con respecto al clon 6B1_A (tipo 3) y a las cepas de referencia (tipo 1) (Apéndice, A.4).

Tabla 3.8. Porcentajes de homología entre las secuencias de aminoácidos (encima de las celdas negras) y de nucleótidos (debajo de las celdas negras) de la ORF PP de las cepas del FC y los principales serotipos de IPNV.

		Porcentajes de homología de las secuencias de aminoácidos																				Cepas
		5B1 _b	17F2	19F3 _b	19G3 _e	19G7 _e	20G1 _b	DM	WB (V)	WB (B)	Ja (D)	Ja (A)	6B1 _A	Ab	Te-2	C1	N1	Sp	C2	C3	He	
Porcentajes de homología de las secuencias de nucleótidos		99,7	99,1	99,8	99,7	99,8	98,9	98,7	98,6	96,5	95,3	83,9	84,2	83,5	83,1	84,0	84,4	83,6	83,0	80,4	5B1 _b	
	99,8		99,0	99,7	99,6	99,7	98,8	98,6	98,5	96,4	95,2	83,8	84,1	83,4	83,0	83,9	84,3	83,5	82,9	80,3	17F2	
	99,6	99,5		99,3	99,2	99,3	98,4	98,3	98,0	96,1	94,8	83,4	83,7	82,9	82,6	83,5	83,9	83,0	82,5	80,0	19F3 _b	
	99,9	99,8	99,6		99,9	100,0	99,1	98,9	98,8	96,7	95,5	84,1	84,4	83,7	83,4	84,2	84,6	83,8	83,2	80,6	19G3 _e	
	99,8	99,8	99,6	99,9		99,9	99,0	98,8	98,7	96,6	95,4	84,0	84,3	83,6	83,2	84,2	84,6	83,7	83,1	80,6	19G7 _e	
	99,8	99,8	99,6	99,9	100,0		99,1	98,9	98,8	96,7	95,5	84,1	84,4	83,7	83,4	84,2	84,6	83,8	83,2	80,6	20G1 _b	
	93,6	93,5	93,4	93,7	93,6	93,6		99,6	99,5	97,4	96,2	84,5	84,8	84,1	83,9	84,8	85,2	84,2	83,7	81,0	DM	
	99,6	99,5	99,5	99,6	99,6	99,6	99,7		98,3	97,2	95,5	84,3	84,3	83,6	83,4	84,7	84,7	83,6	83,0	80,5	WB (V)	
	93,3	93,2	93,0	93,3	93,3	93,3	99,6	93,2		97,1	96,0	84,3	84,8	83,9	83,7	84,6	85,0	84,0	83,5	80,8	WB (B)	
	91,7	91,7	91,6	91,8	91,7	91,7	91,4	91,6	91,4		95,0	84,1	84,1	83,1	83,6	84,0	84,1	83,2	82,9	80,2	Ja (D)	
	85,3	85,2	85,1	85,3	85,3	85,3	91,0	85,3	91,1	85,8		83,5	83,7	83,4	83,3	83,8	84,2	83,7	83,2	80,2	Ja (A)	
	79,0	79,0	78,8	79,1	79,1	79,1	78,3	78,9	78,3	79,8	78,4		98,2	91,8	92,1	90,5	90,3	96,2	86,7	82,1	6B1 _A	
	74,8	74,7	74,6	74,9	74,8	74,8	79,9	74,7	79,9	74,6	79,2	97,8		91,5	91,8	90,1	90,5	86,5	87,0	82,1	Ab	
	73,5	73,5	73,2	73,6	73,5	73,5	78,4	73,4	78,4	73,6	78,3	87,9	87,2		96,3	90,2	90,3	86,5	86,8	82,9	Te-2	
	73,9	73,9	73,7	74,0	74,0	74,0	78,9	73,8	78,9	73,8	78,7	88,2	87,6	91,3		90,6	90,9	87,0	87,3	82,1	C1	
	79,4	79,4	79,2	79,5	79,5	79,5	79,1	79,4	79,1	79,4	78,9	87,5	86,7	81,9	81,4		98,3	88,3	88,1	84,1	N1	
	74,2	74,2	74,0	74,3	74,2	74,2	79,2	74,2	79,2	74,2	79,0	87,5	86,8	87,2	86,7	92,0		88,5	88,2	84,6	Sp	
	73,3	73,2	73,0	73,4	73,3	73,3	78,2	73,2	78,2	73,3	78,4	83,5	82,9	82,9	83,6	79,4	84,8		97,4	82,6	C2	
	73,1	73,1	72,9	73,2	73,1	73,1	78,1	73,1	77,9	73,1	78,4	83,6	83,0	83,2	84,1	79,5	84,6	97,0		82,3	C3	
	69,3	69,3	69,1	69,4	69,4	69,4	74,0	69,4	73,9	69,7	74,0	75,7	75,7	76,2	75,7	77,3	77,2	75,9	75,4		He	
	5B1 _b	17F2	19F3 _b	19G3 _e	19G7 _e	20G1 _b	DM	WB (V)	WB (B)	Ja (D)	Ja (A)	6B1 _A	Ab	Te-2	C1	N1	Sp	C2	C3	He	Cepas	
	I											II		III		IV		V		VI		
	GENOGRUPOS*																					

* Según Cutrín y col. (2004).

7. Expresión proteica y morfogénesis *in vitro*

Los extractos proteicos obtenidos tras la infección de células de insecto con los diferentes baculovirus recombinantes fueron analizados mediante Western blot para comprobar que contenían las proteínas específicas (Figura 3.13). Los resultados obtenidos mostraron expresiones correctas de todas las proteínas específicas clonadas: la poliproteína (NH₂-pVP2-VP4-VP3-COOH), pVP2 y VP2. Los tamaños de las proteínas fueron los esperados; pVP2 mostró un tamaño de aproximadamente 60 kDa, VP2 de 55 kDa y la poliproteína mostró 2 bandas de reacción con el antisuero que se corresponden con las proteínas pVP2 y VP3. Además, esta técnica permitió comprobar que se había realizado exitosamente la coinfección con los baculovirus recombinantes pVP2 y VP2.

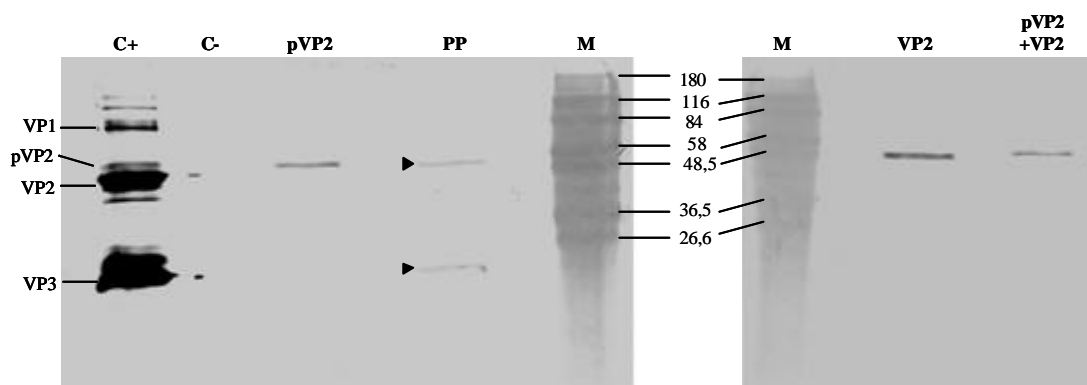


Figura 3.13. Análisis mediante Western blot (utilizando un antisuero policlonal anti-WB) de cultivos de células Sf-9 infectadas con baculovirus recombinantes (BR) clonados con genes pVP2, PP y VP2; el último canal corresponde al resultado de la coinfección con los BR pVP2 y VP2. M, estándar de peso molecular SDS-7B (Sigma) con los pesos moleculares expresados en kDa; C+, control positivo: cepa 5B1_D purificada; C-, control negativo: células Sf-9 no infectadas.

La observación mediante microscopía electrónica de los diferentes productos obtenidos tras la expresión de baculovirus recombinantes reveló que la PP generó una gran cantidad de estructuras tubulares de 40-50 nm de diámetro y 125-830 nm de

longitud (Figura 3.14. A) y algunas partículas similares a virus (VLPs) de 48-55 nm (Figura 3.14 C). La utilización de la técnica de inmunogold permitió confirmar que estas estructuras tubulares estaban construidas con proteína viral (Figura 3.14 B).

La expresión de pVP2 también dio lugar a la producción de túbulos mayoritariamente de 35-50 nm de diámetro (Figura 3.15 A) y la expresión de VP2 rindió partículas de morfología redondeada de diámetro variable (55-75 nm) (Figura 3.15 B).

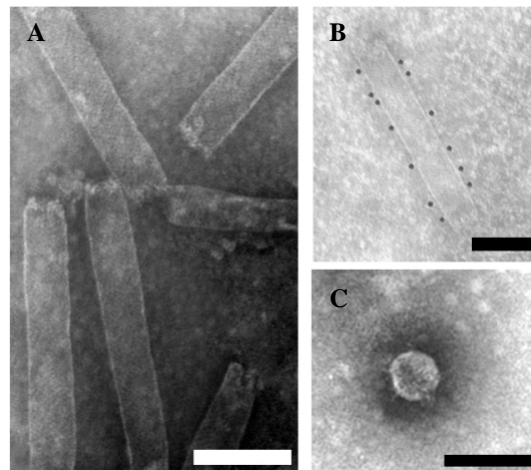


Figura 3.14. Micrografías electrónicas de las estructuras formadas por la poliproteína (PP) expresada mediante baculovirus recombinantes. **A.** Estructuras tubulares. **B.** Estructuras tubulares marcadas con inmunogold. **C.** Partículas de morfología viral (VLPs) de 50 nm. Barras, 100 nm.

Por otra parte, la infección conjunta con baculovirus clonados con VP2 y con su precursor pVP2 generó muchos túbulos de diámetro comprendido entre 35 y 55 nm y longitud de 160-385 nm con una disposición hexagonal en superficie (Figura 3.15 C), además de visualizarse también algunas partículas redondeadas de 50-70 nm (Figura 3.15 D).

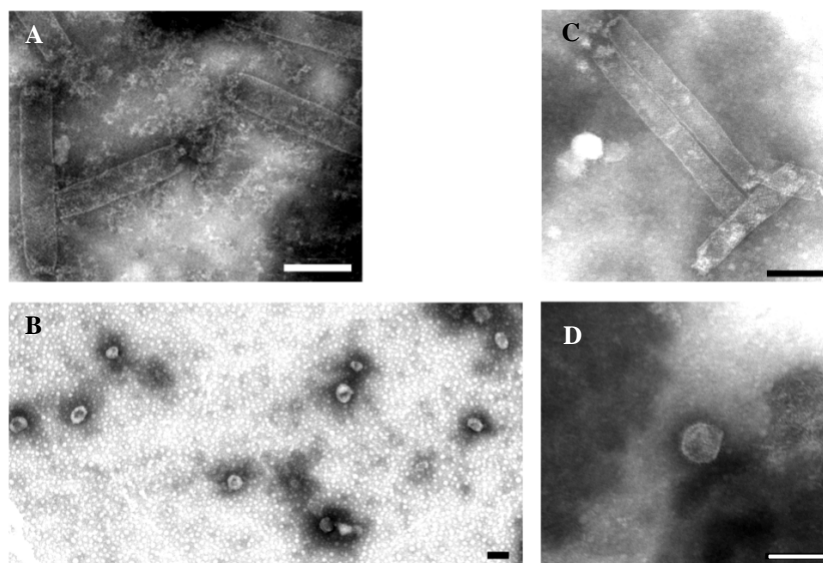


Figura 3.15. Micrografías electrónicas de las estructuras formadas por las proteínas pVP2 y VP2 expresadas mediante baculovirus recombinantes. **A.** Estructuras tubulares formadas por pVP2. **B.** Partículas redondeadas de 55-75 nm formadas por VP2. **C y D.** Estructuras tubulares de 48 nm y partícula de 60 nm, respectivamente, formadas por combinación de las proteínas pVP2 y VP2. Barras, 100 nm.

DISCUSIÓN

La aparición de gran cantidad de estructuras tubulares en las preparaciones de microscopía electrónica realizadas con las cepas del FC nos llevó a plantearnos, como primera hipótesis, que podría tratarse de algún tipo viral distinto a todos los detectados y descritos previamente (ver capítulo 1); sin embargo, esta posibilidad fue inmediatamente descartada, primero, por el hecho de que la clonación en placa no permitiera el aislamiento de las estructuras tubulares en cultivo puro y al demostrar, mediante inmunogold, que estas estructuras tubulares estaban construidas con proteínas

de IPNV. Esto nos hizo plantearnos el descubrir el motivo de su existencia y formación, así como su posible función.

La aparición de estructuras tubulares en asociación con diferentes virus de morfología icosaédrica (Howatson y Almeida, 1960; Watrach, 1962; Dales, 1963; Finch y Klug, 1965; Hummeler y col., 1967; Holmes y col., 1975), y más en concreto con miembros de la familia *Birnaviridae* (Moss y Gravell, 1969; Teninges y col., 1979; Todd y McNulty, 1979; Schwanz-Pfitzner y col., 1984; Özel y Gelderblom, 1985; Comps y col., 1991; Novoa, 1996; Granzow y col., 1997a; Crane y col., 2000; Espinoza y col., 2000) ha sido objeto de estudio con anterioridad. Sin embargo, hasta la fecha no se ha analizado ni el origen ni el porqué de la formación de las estructuras de morfología tubular asociadas a los birnavirus acuáticos, ni se conoce el mecanismo exacto de su formación en otros birnavirus.

Por ello nos planteamos 3 hipótesis de partida:

- ? Hipótesis 1. *Las estructuras tubulares podrían corresponder a un virus satélite.*
- ? Hipótesis 2. *Las estructuras tubulares podrían ser partículas defectivas interferentes (DIs).*
- ? Hipótesis 3. *La aparición de los túbulos podría deberse a aberraciones en la morfogénesis, producidas por algún tipo de mutación en la secuencia genómica.*

En cuanto a las dos primeras hipótesis, la necesidad de un virus *helper* explicaría la imposibilidad de aislar completamente los túbulos. El concepto de virus satélite se asocia a virus que precisan, para su replicación, de la coinfección con un virus *helper* de un grupo viral distinto e incluso sin homologías genómicas. Este hecho descartaría la primera hipótesis (por la reactividad de los túbulos con antisueros anti-IPNV en

inmunogold); sin embargo, entre los tipos de virus satélite descritos por Ball (2001) se citan aquellos en los que el ARN satélite es encapsidado por proteínas del *helper*. Por otro lado, aunque las dinámicas de replicación observadas en los estudios *in vitro* no pueden descartar ninguna de las dos hipótesis iniciales, las fluctuaciones en la relación túbulo:icosaedros en pases consecutivos son más propias de partículas DI (MacDonald y Yamamoto, 1978; Vogt y Jackson, 1999). Se piensa que el significado biológico de este tipo de partículas está en posibilitar los estados de persistencia viral en células y huéspedes infectados (Drolet y col., 1995). Se trata, por lo tanto, de un mecanismo que permite el mantenimiento del virus en poblaciones de peces aparentemente sanas, que portan el virus sin mostrar enfermedad, al carecer estas partículas defectivas de capacidad infectiva. Es el caso, precisamente, de los peces del FC, que gozaban de un aparente buen estado de salud y eran portadores del virus, pudiendo este estado portador estar modulado por la existencia de partículas tubulares defectivas. Desafortunadamente, Ball (2001) apunta a que las partículas DI mantienen el mismo aspecto morfológico que su virus parental, lo cual no coincide con nuestros resultados. En la misma línea, MacDonald y Yamamoto (1978) afirmaron que las propiedades físicas de estas partículas defectivas no difieren mucho de las de los virus estándar, añadiendo además que los pases repetitivos de virus IPNV a una alta MOI reducen la actividad del virus mediante la producción de partículas defectivas, caracterizándose el proceso por una alternancia de supervivencia celular y desarrollo de ECP. En este sentido, el análisis de la cantidad de túbulos formados a diferentes MOIs nos ha permitido comprobar que la formación de túbulos es totalmente independiente de la MOI a la cual se inoculan las cepas, lo cual nuevamente parece descartar la segunda hipótesis.

Por otra parte, la purificación en gradientes de CsCl de estos clones nos permitió separar los túbulos del resto de estructuras virales presentes, visualizando túbulos en la fracción de 1,30 g/cm³, cápsides vacías en la banda intermedia de 1,32 g/cm³ y partículas icosaédricas completas en la fracción de 1,33 g/cm³. El análisis del contenido genómico de las diferentes bandas reveló que no era posible detectar segmentos genómicos en la fracción compuesta mayoritariamente por partículas icosaédricas vacías, pero sí se detectaba ácido nucleico específico mediante RT-PCR. Esa discrepancia podría deberse a la mayor sensibilidad de esta técnica, que podría haber permitido amplificar el fragmento específico de 607 pb a partir de algunas partículas virales completas contaminantes (procedentes de la banda adyacente en el gradiente de CsCl). Sin embargo, no se puede descartar que esta banda corresponda a partículas defectivas, e incluso a auténticas partículas DI. Como era esperable las cápsides completas contenían el genoma viral que fue fácilmente observable en geles y detectado por RT-PCR. En el caso de la fracción tubular, se puso de manifiesto la ausencia de ácido nucleico en estas estructuras, lo que definitivamente descarta que se trate de partículas defectivas interferentes.

Con respecto al contenido proteico de los túbulos, el análisis de los geles de acrilamida reveló que estaban compuestos por VP2, el polipéptido mayoritario de la cápside de birnavirus, y por su precursor pVP2. Estos resultados parecían apoyar la tercera hipótesis. De hecho, diversos autores han sugerido que la formación de estructuras de este tipo podría deberse a errores en la morfogénesis del virus (Caspar y Klug, 1962).

El análisis ultraestructural de la cepa WB en la línea celular CHSE-214 reveló la formación de haces de proteínas de aspecto tubular en el citoplasma, en las proximidades de partículas virales maduras. Estas estructuras parecían ser de la misma

naturaleza que las encontradas previamente por otros autores para distintas cepas de IPNV, y en diversas células como RTG-2, BGL o CHSE-214 (Moss y Gravell, 1969; Schwanz-Pfützner y col., 1984; Granzow y col., 1997a; Crane y col., 2000). El hecho de que estos estudios hayan sido realizados en diferentes tipos de líneas celulares pone de manifiesto que se trata de estructuras cuya formación no depende de la línea celular empleada, lo que concuerda con los resultados de este estudio, ya que como se mostró en el capítulo 1, las estructuras tubulares se visualizaron en cepas obtenidas en CHSE-214, EPC y TV-1. Además, si bien las micrografías electrónicas obtenidas por Moss y Gravell (1969) y por Crane y col. (2000) reflejaban la cercana proximidad de estas estructuras de apariencia tubular a partículas virales maduras, en el presente estudio se observó que esas estructuras aparecen dispuestas de tal manera que parecen ser las precursoras de las partículas virales maduras, lo cual indica que se trataría de estructuras intermedias en el proceso de morfogénesis de los birnavirus. No obstante, el aspecto ultraestructural de los haces tubulares intracitoplasmáticos es completamente distinto a la distribución en simetría hexagonal visualizada en las partículas tubulares extracelulares, por lo que debemos descartar que la existencia extracelular de estas partículas se deba a un proceso normal de morfogénesis y liberación.

Con el objeto de conocer los principios arquitectónicos de la formación de los túbulos, y las proteínas implicadas en su construcción, llevamos a cabo la expresión de la poliproteína PP, así como de las principales especies moleculares constitutivas de los túbulos (pVP2 y VP2), mediante un sistema de baculovirus recombinantes. Este estudio nos ha permitido conocer en detalle las capacidades de ensamblaje y procesamiento de cada proteína en particular y de probar, además, si la combinación de estas 2 proteínas era capaz de generar los túbulos.

La expresión de la PP nos permitió comprobar que ésta se autoprocésaba en pVP2 y VP3, dando lugar mayoritariamente a estructuras tubulares, mientras que apenas fue capaz de inducir el autoensamblaje en viriones inmaduros (VLPs). En cuanto a la expresión individual, mientras que la pVP2 generó estructuras tubulares semejantes a las visualizadas en las cepas FC, la proteína VP2 dio lugar únicamente a estructuras redondeadas, con un diámetro aproximado de 55-75 nm. Por otro lado, la expresión conjunta de ambas especies moleculares permitió la obtención de numerosos túbulos y algunas (escasas) partículas esféricas, lo cual parecía coincidir con los resultados del análisis del contenido proteico de los túbulos purificados; esto indicaba que los túbulos estaban constituidos por pVP2 y VP2. Sin embargo, el hecho de que la expresión por separado de pVP2 generase túbulos, sugiere que es esta proteína la que forma principalmente el esqueleto de estos túbulos. Aunque esta es la primera vez que un estudio de esta índole se lleva a cabo con birnavirus acuáticos, los mecanismos de morfogénesis y ensamblaje de un virus semejante, el IBDV, se han estudiado en profundidad a través de la expresión proteica en baculovirus. A diferencia de nuestros resultados, en este virus la expresión de la poliproteína daba lugar además de a túbulos tipo I, a gran cantidad de VLPs y a túbulos finos de tipo II (Martínez-Torrecuadrada y col., 2000, 2003; Chevalier y col., 2002). Además los túbulos generados por pVP2 eran flexibles y de menor diámetro (de 16 a 30 nm) (Castón y col., 2001; Chevalier y col., 2002; Martínez-Torrecuadrada y col., 2003), al igual que las estructuras redondeadas generadas por VP2 que, según estos autores, eran de 23 nm (Castón y col., 2001; Martínez-Torrecuadrada y col., 2003).

Estos resultados sugieren, además, que el segmento A es el único implicado en la formación de túbulos y que, sin embargo, en la correcta formación de VLPs podría estar implicada la VP1 codificada por el segmento B, dado que la expresión de la PP

apenas generó partículas virales maduras y la expresión de la proteína VP2, principal componente de la cápside de los birnavirus, generó estructuras semejantes a virus que probablemente necesitasen de otro factor para generar partículas virales maduras. Sin embargo, según Martínez-Torrecedrada y col. (2000) ambas estructuras, cápsides y túbulos, se ensamblan siguiendo los mismos principios básicos y con los mismos componentes. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la aparición de túbulos en la progenie viral puede deberse a un fallo en la maduración de pVP2 a VP2; la acumulación de pVP2 implicaría su ensamblaje en estructuras tubulares. No obstante, autores como Martínez-Torrecedrada y col. (2000) observaron además que la proteína VP3 era imprescindible para la correcta morfogénesis de la cápside, de tal modo que se produce una primera interacción entre pVP2 y VP3, seguida del procesamiento de pVP2 a VP2, formándose así partículas icosaédricas. Por otra parte, Chevalier y col. (2002) propusieron que la pVP2 se pre-ensambla en presencia de la VP3 dando lugar a viriones inmaduros tubulares, de tal manera que cuando se produce la proteólisis de la pVP2, dirigida por la VP4 se generan partículas icosaédricas. Esta proteólisis depende, a su vez, de la activación de la VP3. Según estudios recientes (Chevalier y col., 2004; Oña y col., 2004) la actividad de esta proteína depende de su extremo C-terminal, de modo que sólo cuando la VP3 pierde este extremo se inactiva.

Por otra parte, el hecho de que el segmento A del único clon que apenas mostraba túbulos (6B1_A) se clasificase como tipo Ab (serotipo A3), mientras que los otros clones fuesen de tipo WB, nos hizo pensar que la formación de túbulos podría estar relacionada con el serotipo o con la información contenida en el segmento A.

En este sentido, y dado que hasta la actualidad sólo se había descrito la presencia de estas estructuras en preparaciones de birnavirus acuáticos de los serotipos A1 (Özel y Gelderblom, 1985; Novoa, 1996; Espinoza y col., 2000), A2 (Granzow y col., 1997a) y

A3 (Todd y McNulty, 1979; Schwanz-Pfitzner y col., 1984; Özel y Gelderblom, 1985), con el objeto de comprobar si su presencia se limitaba a las cepas de estos 3 serotipos mayoritarios, realizamos un análisis mediante MET de 23 cepas virales, que abarcaban los 9 serotipos del serogrupo A, así como el único serotipo del serogrupo B. Este análisis nos ha permitido comprobar que la formación de túbulos es un proceso que no depende del serotipo o serogrupo y que no guarda relación con la especie hospedadora ni con su origen geográfico, dado el amplio abanico de cepas analizadas.

Debido a que el segmento A es el implicado en la codificación de la proteína VP2, y con el fin de detectar posibles mutaciones que explicasen la formación de los túbulos se procedió a la secuenciación completa de este segmento en los 7 clones objeto de estudio. El análisis de estas secuencias reveló que los clones formadores de túbulos mostraban diferencias muy significativas en 3 de los genes de este segmento. Así, respecto a la proteína VP5, la iniciación de su ORF es una característica diferenciadora de los clones formadores de túbulos. De este modo, en estos clones la VP5 se sintetiza a partir del segundo codón de iniciación, generando una proteína putativa de 134 aminoácidos, truncada respecto a la codificada por la misma ORF en el clon 6B1_A, así como en la cepa Ab (148 aminoácidos), que a su vez tiene un aminoácido menos que en las cepas VR-299 y DRT (149 aminoácidos). Según Heppell y col. (1995a), la formación de una correcta VP5 depende de las mutaciones que se produzcan en la región NC 5', altamente variable, comprendida entre los residuos 91 y 120. De hecho, sus resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo; además, estos autores añaden que la cepa He carece de VP5, debido a que posee una inserción en esta región y no posee ni el segundo ATG ni el codón de terminación para la VP5. Aunque el significado biológico de este hecho no puede ser desvelado con los resultados del presente estudio, para Santi y col. (2004) la existencia de una VP5 truncada está

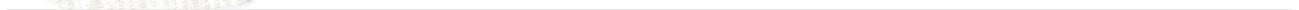
relacionada con una menor virulencia, lo cual obedece a un posible mecanismo para asegurar la persistencia de las cepas con esta característica VP5 en células y tejidos infectados. Por ello, no podemos descartar que éste haya sido un mecanismo adoptado por parte de las cepas de IPNV del FC como vía de adaptación al huésped, asegurando su supervivencia en este banco de peces. Sin embargo, resulta difícil y extremadamente especulativo aventurar cualquier tipo de implicación en el propio mecanismo generador de túbulos.

A parte de los lógicos cambios nucleotídicos esperables entre cepas de birnavirus acuáticos, en la región codificadora de la pVP2 no se encontraron mutaciones especialmente sospechosas de estar implicadas en la formación de túbulos. De hecho, *a priori* pensamos que debería de existir alguna mutación en el entorno del punto de corte de pVP2 a VP2, la cual explicase la imposibilidad de maduración del precursor pVP2 y, por lo tanto, la construcción de las estructuras tubulares. Sin embargo, la mutación reseñable más próxima (en forma de delección-inserción) se detectó al comienzo de la secuencia correspondiente a la proteína VP4, 64 aminoácidos más allá del punto de maduración de pVP2-VP2. Por otro lado, en los clones formadores de túbulos también la proteína VP3 se vio alterada por una inserción de un nucleótido hacia el final de la secuencia, generando un extremo C-terminal 8 aminoácidos más largo que en la cepa del FC no formadora de túbulos y en las cepas de referencia. Determinados autores (Chevalier y col., 2002; Galloux y col., 2004) han apuntado que la maduración de la pVP2 a VP2 puede estar dirigida por la VP4, aunque con la probable intervención de la VP3; de hecho, en estudios recientes se ha demostrado que la actividad de esta proteína depende de su extremo C-terminal (Chevalier y col., 2004; Oña y col., 2004). Por ello, no es descabellado pensar que las mutaciones específicas detectadas en estos genes en las cepas formadoras de túbulos sean responsables de esa aberrante morfogénesis. No

obstante, serán necesarios futuros estudios, empleando mutaciones selectivas y cristalografía de rayos X para determinar el efecto que esas mutaciones pueden tener sobre las proteínas codificadas por el segmento A. Finalmente, la coincidencia de las 3 mutaciones (en VP5, VP4 y VP3) en los clones formadores de túbulos nos hace sospechar que podría ser la base de una estrategia múltiple de adaptación al huésped para asegurar la persistencia de estas cepas en un ambiente como el océano, donde existen bajas densidades de poblaciones de peces y, por lo tanto, el número de hospedadores disponibles para la infección es bajo.

CAPÍTULO 4

COINFECCIÓN Y RECOMBINACIÓN EN BIRNAVIRUS MARINOS DEL FLEMISH CAP



RESUMEN

En el presente estudio se ha llevado a cabo un análisis de la secuencia completa de ambos segmentos genómicos de una selección de aislados de birnavirus del FC. Los resultados de este análisis han aportado una valiosa información de cara a establecer el posible origen de estas cepas. Así, la mayoría resultaron ser muy parecidas a la cepas del serotipo A1 Dry Mills (DM) y West Buxton (WB), ambas originalmente aisladas a partir de trucha en Maine (costa este de EEUU); otro de los aislados, procedente de bacalao (6B1_A), se agrupó en base a la secuencia de ambos segmentos con el tipo europeo Ab. La presencia de ambos tipos virales en los bacalaos de este banco pesquero hace pensar en la existencia de un modelo migratorio a lo largo del Atlántico Norte para esta especie. Además, el hecho de que el análisis (llevado a cabo en el capítulo 2) de otro clon (6B1_D) procedente del mismo aislado 6B1, lo hubiese clasificado como de tipo WB, demuestra la existencia de coinfección de diferentes cepas de birnavirus en el mismo pez.

Por otra parte, otro aislado del FC (20G1_D) mostró un tipado distinto para ambos segmentos (segmento A de tipo WB y segmento B de tipo Ab). Este resultado demuestra claramente la existencia, en birnavirus acuáticos, de “reassortición” *in vivo* (recombinación entre segmentos), como consecuencia esperable de la coinfección de 2 cepas distintas en un mismo huésped.

ABSTRACT

In the present study it has been carried out an analysis of the whole sequence of both genomic segments of a number of birnaviruses isolated from the FC. The results obtained have provided valuable information on the possible origin of these strains. Thus, most of them were very similar to the strains of the serotype A1, Dry Mills (DM) and West Buxton (WB), both originally isolated from trout in Maine (East coast of the USA); another strain, from cod (6B1_A), was clustered, on the basis of the sequence of both segments, in the same genogroup as the Ab European type. The presence of both viral types in cods from this fishing ground suggests the existence of a migratory model for these species along the North Atlantic Ocean. Furthermore, the fact that another clone (6B1_D) from the same isolate 6B1, had showed to be WB type (results described in the second chapter), demonstrates the existence of coinfection of different birnavirus strains in the same fish.

On the other hand, another strain from the FC (20G1_D) was classified as WB type according to its segment A, and as Ab type according to its segment A. This result demonstrates the existence of reassortment *in vivo*, as an expected consequence of the coinfection of 2 different strains in the same host.

INTRODUCCIÓN

Los avances en la caracterización de los virus a nivel molecular sugieren que los virus co-evolucionan con sus organismos hospedadores, posiblemente debido a que los virus son parásitos intracelulares obligados y, por lo tanto, requieren de la supervivencia del hospedador para poder asegurar su propia supervivencia. Es interesante notar que cuando un virus replica en su hospedador natural, tiende a no causarle enfermedad o a causar una enfermedad leve y autolimitada en la mayoría de los casos. Varios de los virus conocidos producen enfermedades severas sólo cuando infectan organismos diferentes a sus hospedadores naturales. Lo anterior sugiere que buena parte de los virus asociados con la producción de enfermedades son virus que están en proceso de adaptación a un nuevo tipo de hospedador y que, una vez lograda esa adaptación, la estrategia del virus consiste en perpetuarse y propagarse sin afectar al organismo hospedador.

Uno de los mecanismos de adaptación viral es la mutación, que representa la fuente primaria de variabilidad genética viral. Otra fuente de variabilidad del material hereditario viral es la recombinación, fenómeno que se produce cuando dos virus diferentes o dos cepas de un mismo virus infectan la misma célula, pudiendo intercambiar fragmentos genómicos y, como consecuencia, generar partículas virales recombinantes con nuevas combinaciones genéticas. Estos dos mecanismos actúan, por consiguiente, como vectores de evolución viral, aumentando así la capacidad del virus de adaptarse al hospedador.

Hasta el presente, el fenómeno de recombinación natural ha sido descrito en algunos virus de ARN de vertebrados, como bunyavirus (Akashi y col., 1997; Rodríguez y col., 1998; Gerrard y col., 2004; Hewson y col., 2004), reovirus (Pierce y col., 1998; Trabelsi y col., 2000; Iturriza-Gómara y col., 2001), poliovirus (Guillot y

col., 2000) y ortomixovirus (Li y col., 2003), así como en virus de plantas, tanto pertenecientes al género *Tenuivirus* (Miranda y col., 2000) como *Bunyavirus* (Qiu y col., 1998). Además, en cerdos se han observado virus quiméricos entre virus de muy diferentes orígenes, como virus influenza A humano-aviares (Castrucci y col., 1993) y rotavirus humano-porcinos (Santos y col., 1999).

En 1996, Brown y Skinner encontraron que las secuencias de la polimerasa VP1 de algunas cepas muy virulentas del birnavirus del pollo, IBDV, se agrupaban, en un análisis filogenético, en un *cluster* diferente al del esperado en función de la secuencia de sus segmentos A, por lo que sugirieron que el segmento B de estas cepas podría estar originado por un mecanismo de recombinación entre segmentos genómicos. Sin embargo, hasta la fecha no existe evidencia directa de la ocurrencia de este fenómeno en birnavirus en condiciones naturales.

Por otra parte, la creación de virus recombinantes *in vitro* ha sido utilizada en nodavirus de peces para analizar qué fragmento de ARN determinaba la especificidad del hospedador (Iwamoto y col., 2004). En birnavirus acuáticos también se han generado virus recombinantes *in vitro* entre dos cepas de IPNV, la cepa Buhl (serotipo A1), muy virulenta para trucha arcoiris y la cepa avirulenta EVE (serotipo A3), para determinar qué segmento genómico era responsable de la virulencia. Este estudio reveló que las cepas recombinantes cuyo segmento A era de tipo Buhl eran muy virulentas, lo que demostraba que la virulencia estaba determinada por el segmento A (Sano y col., 1992). Del mismo modo, Müller (1991) utilizó aislados de IBDV no-patógenos para pollos, con el fin de crear cepas de virus recombinantes mediante coinfección y estudiar las características de las nuevas cepas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Secuenciación de los segmentos genómicos

Una selección de 7 cepas del FC (5B1_D, 17F2, 19F3_B, 19G3_E, 19G7_E, 20G1_D 6B1_A) se sometió a secuenciación de ambos segmentos genómicos completos, siguiendo el protocolo indicado en el capítulo anterior. Para ello se llevó a cabo una amplificación, mediante RT-PCR, de fragmentos de secuencia solapante, utilizando 3 parejas de cebadores para el segmento A: FA5'NC/WAApaR, FASpeF/FASalR y WA1850F/FA3'NC, y 2 parejas para el segmento B: FB5'NC/VRB1500R y WBBF/FB3'NC (*sense/antisense*, respectivamente) (Tabla 4.1; figura 4.1).

Tabla 4.1. Cebadores empleados para la secuenciación de los segmentos genómicos completos (A y B) de birnavirus del FC.

Cebadores	Secuencia	Posición *	Longitud esperada del producto de PCR	
FA5'NC	5'-GGAAAGAGAGTTTCAACG-3'	1-18	730 pb	Segmento A
WAApaR	5'-GTACCTCCTTGGTGCGATTG3'	731-711		
FASpeF	5'-GGTCCACAACCAACTAGTGA-3'	571-591	1669 pb	
FASalR	5'-CTGAATCAGGTGTGATGC-3'	2240-2222	1247 pb	
WA1850F	5'-GTCCTATCCTACTTCAAGAAC-3'	1850-1870		
FA3'NC	5'-GAAGATCTCCCGGGGGCCCC-3'	3097-3078		
FB5'NC	5'-GGAAACAGTGGGTCAACG-3'	1-19	1523 pb	Segmento B
VRB1500R	5'-CCGTGGGTCTTCAGCTGAAGATTG3'	1524-1500	1400 pb	
WBBF	5'-CAAACGAGGATGGCTCTCCGCGGTACAATC-3'	1383-1413		
FB3'NC	5'-AAGATCTGGGGTCCCT-3'	2783-2767		

* Las posiciones de los cebadores se indican en base a la secuencia de la cepa West Buxton (Yao y Vakharia, 1998) (número de acceso de la GenBank AF078669).

2. Análisis de las secuencias

El análisis de las secuencias se llevó a cabo como se describió previamente (capítulo 2). Con fines comparativos se emplearon las secuencias del segmento A de

otros aquabirnavirus depositadas en la base de datos GenBank con los siguientes números de acceso: AF078668 (WB-Vakharia), AF342727 (WB-Blake), AF343571 (DM), M18049 (Ja-Dobos), AF342735 (Ja-ATCC), AF342729 (Ab), AF342731 (Te-2), AF342732 (C1), D00701 (N1), AF342728 (Sp), AF342733 (C2), AF342734 (C3) y AF342730 (He). Debido a que las secuencias de las cepas WB remitidas por Blake y col. (2001) son sutilmente diferentes a las remitidas por Yao y Vakharia (1998), se decidió incluir ambas. El mismo criterio se usó para incluir 2 secuencias de la cepa Ja, la de la ATCC (Blake y col., 2001) y la remitida por Dobos (Duncan y Dobos, 1986). Del segmento B se incluyeron las secuencias: AF078669 (WB-Vakharia), M58756 (Ja-Dobos) y M58757 (Sp-Dobos). Debido a la ausencia de la secuencia del segmento B de la cepa de referencia Ab, decidimos incluir 2 cepas tipo Ab, 2290 y 24R, secuenciadas por Cutrín y col. (2004), con los números de acceso AJ489249 y AJ489243, respectivamente.

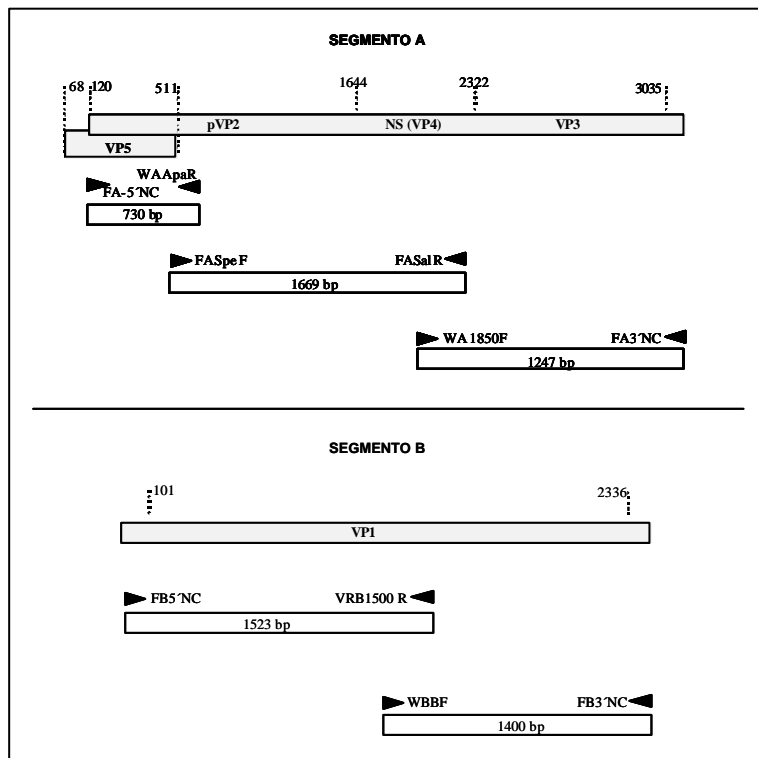


Figura 4.1. Mapa genómico de los segmentos A y B con las posiciones relativas de los cebadores empleados para la secuenciación del genoma completo de las cepas del FC (posiciones según la secuencia de la cepa West Buxton de Yao y Vakharia (1998) con número de acceso de la GenBank AF078669).

RESULTADOS

1. Análisis de secuencias

En el capítulo anterior se mostró el resultado del análisis de secuencias del segmento A de las mismas 7 cepas del FC. Este análisis reveló que la mayoría de las cepas del FC (5B1_D, 17F2, 19F3_B, 19G3_E, 19G7_E y 20G1_D) mostraban un segmento A con un alto grado de homología con las cepas norteamericanas WB y DM (serotipo A1), mientras que la cepa 6B1_A mostró un elevado nivel de homología con el tipo europeo Ab (serotipo A3). Las secuencias nucleotídicas del segmento A de los aislados bajo estudio aparecen en la GenBank con los siguientes números de acceso: AY780918 (5B1_D), AY780919 (6B1_A), AY780920 (17F2), AY780921 (19F3_B), AY780922 (19G3_E), AY780923 (19G7_E) y AY780924 (20G1_D).

En el presente estudio se ha secuenciado el segmento B de los mismos aislados, y las secuencias se han incluido en la GenBank con los siguientes números de acceso: AY780925 (5B1_D), AY780926 (6B1_A), AY780927 (17F2), AY780928 (19F3_B), AY780929 (19G3_E), AY780930 (19G7_E) y AY780931 (20G1_D). El análisis de secuencias reveló que la mayoría de las cepas del FC tenía un segmento B de una longitud de 2783 nucleótidos (5B1_D, 17F2, 19F3_B, 19G3_E y 19G7_E) (Apéndice, A.5) y mostraron características idénticas a las de la cepa de referencia americana WB. Las cepas 6B1_A y 20G1_D mostraron una región no-codificante (RNC) en el extremo 5' más corta que las del resto (la RNC del extremo 3' de estas dos cepas no pudo ser secuenciada). La ORF VP1 de todas las cepas analizadas mostró una longitud de 2538 nucleótidos, que codifica una proteína VP1 de 846 aminoácidos.

En la tabla 4.2 se muestran los resultados de la comparación de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos (deducidas de la ORF VP1) entre los aislados del FC y las cepas de referencia. La mayoría de los aislados del FC (5B1_D, 17F2, 19F3_B, 19G3_E y

19G7_E) mostraron un elevado porcentaje de homología nucleotídica entre sí y con la cepa de referencia WB (sólo 1 aminoácido/1 nucleótido de diferencia). Los aislados más divergentes fueron 20G1_D y 6B1_A, con un porcentaje de homología nucleotídica de tan sólo el 79,7% ± 0,5 con el resto de aislados del FC (89,9% ± 0,07 en aminoácidos), y con una gran homología (aminoácidos: 98,4% ± 0,3; nucleótidos: 91,5 ± 0,4) con las cepas tipo Ab empleadas como referencia para el segmento B (2290 y 24R).

Tabla 4.2. Porcentajes de homología ente las secuencias de amoniácidos (encima de las celdas negras) y de nucleótidos (debajo de las celdas negras) de la ORF VP1 de las cepas del FC y cepas de referencia de IPNV.

		Porcentajes de homología de las secuencias de aminoácidos											
Porcentajes de homología de las secuencias de nucleótidos		99,9	99,9	100,0	100,0	99,9	97,2	88,7	89,0	88,9	90,0	90,0	5B1 _D
	100,0		100,0	99,9	99,9	99,8	97,0	88,5	88,9	88,8	89,8	89,8	17F2
	100,0	100,0		99,9	99,9	99,8	97,0	88,7	88,9	88,8	89,8	89,8	19F3 _B
	100,0	100,0	100,0		100,0	99,9	97,2	88,7	89,0	88,9	90,0	90,0	19G3 _E
	100,0	100,0	100,0	100,0		99,9	97,2	88,7	89,0	88,9	90,0	90,0	19G7 _E
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		97,3	88,9	89,0	89,0	90,1	90,1	WB
	90,4	90,4	90,3	90,4	90,4	90,3		88,6	89,5	89,5	90,5	90,5	Ja
	75,7	75,7	75,6	75,7	75,7	80,1	75,8		94,0	93,8	94,8	94,8	Sp
	79,3	79,3	79,2	79,3	79,3	80,4	81,2	84,6		99,3	98,1	98,1	20G1 _D
	79,2	80,3	80,3	80,3	80,3	80,3	81,2	83,6	98,8		98,7	98,7	6B1 _A
	73,4	73,4	73,3	73,4	73,4	73,4	74,0	84,0	91,1	91,9		100,0	2290
	73,4	73,4	73,3	73,4	73,4	73,4	74,0	84,0	91,1	91,9	100		24R
	5B1 _D	17F2	19F3 _B	19G3 _E	19G7 _E	WB	Ja	Sp	20G1 _D	6B1 _A	2290	24R	Cepas
GENOGRUPO I							G II	GENOGRUPO III					

2. Análisis filogenético

Las relaciones filogenéticas entre las 7 cepas del FC y los principales serotipos de IPNV determinadas en función de los porcentajes de homología aminoacídica de la poliproteína PP (segmento A) y la VP1 (segmento B) se muestran en las figuras 4.2 y 4.3, respectivamente.

El dendograma obtenido para el segmento A (Figura 4.2) mostró que 6 de los 7 aislados del FC (5B1_D, 17F2, 19F3_B, 19G3_E, 19G7_E y 20G1_D) se agrupaban en el genogrupo I, junto con la cepa de referencia WB y otras cepas americanas de los

serotipos A1 (DM y WB) y A9 (Ja). Únicamente la cepa 6B1_A se incluyó en el genogrupo II, junto con la cepa Ab, que corresponde al serotipo A3.

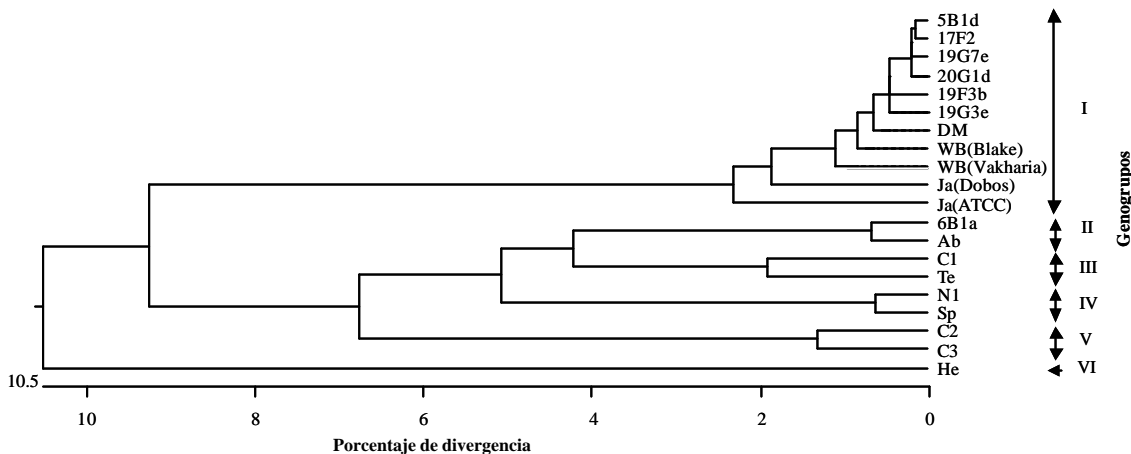


Figura 4.2. Dendrograma de *cluster* obtenido a partir del porcentaje de divergencia entre las secuencias de aminoácidos de la ORF PP del segmento A de las cepas del FC y las cepas de referencia de otros birnavirus acuáticos disponibles en la GenBank.

Por otra parte, el análisis filogenético del segmento B (Figura 4.3) implicó un cambio claro en el tipado del aislado 20G1_D; que se agrupó con las cepas de tipo Ab (genogrupo II). Para los demás aislados se obtuvo el mismo resultado que con el segmento A (Tabla 4.3).

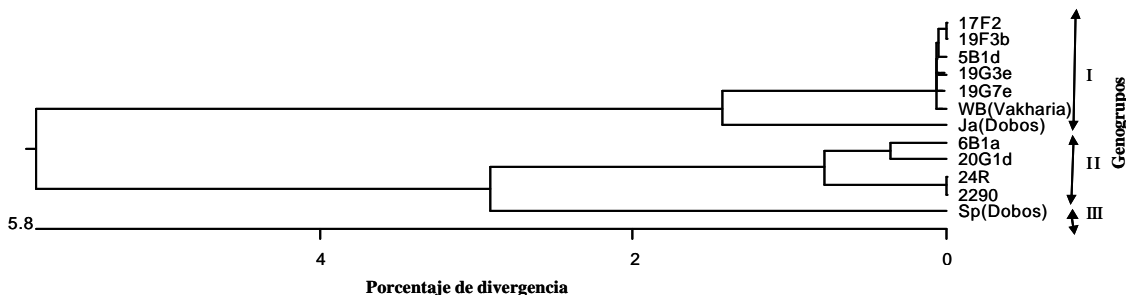


Figura 4.3. Dendrograma de *cluster* obtenido a partir del porcentaje de divergencia entre las secuencias de aminoácidos de la ORF VP1 del segmento B de las cepas del FC y las cepas de referencia de otros birnavirus acuáticos disponibles en la GenBank.

Tabla 4.3. Relaciones filogenéticas de los segmentos genómicos de los aislados FC con los tipos virales de referencia.

Segmento	Cepas		
	6B1 _A	20G1 _D	FC*
A	Ab	WB	WB
B	Ab	Ab	WB

* cepas 5B1_D, 17F2, 19F3_B, 19G3_E y 19G7_E

DISCUSIÓN

Los resultados de capítulos previos indicaban, en base a la secuenciación de pequeños fragmentos del segmento A, que los birnavirus del FC eran del tipo americano WB/DM; sin embargo, teníamos la sospecha de que podía haber aislados de otros tipos. Por ello, se hizo una selección de aislados para secuenciar el genoma completo, con el fin de asegurar la detección de incluso pequeñas diferencias con el tipo A1.

Dado que la mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha se basan en la secuencia del segmento A (Heppell y col., 1993; Hosono y col., 1996; Blake y col., 2001; Cutrín y col., 2004) nosotros decidimos secuenciar, en primer lugar, el segmento A de estas cepas. Los resultados demostraron que, al igual que lo que se había observado previamente (capítulo 2) con el análisis de secuencias de pequeños fragmentos del segmento A, la mayoría de las cepas del FC analizadas en este capítulo se agrupan en el mismo *cluster* que las cepas del genotipo I, correspondientes a los tipos americanos WB y DM (del serotipo A1) y Ja (del serotipo A9). Estos resultados concuerdan, además, con los hallados por Heppell y col. (1993), quienes analizando las

secuencias de una región comprendida entre la VP2 y la NS (VP4) de 17 cepas de IPNV aisladas de piscifactorías de Terranova y Québec (Canadá) (cercanas al FC) las incluyeron en el mismo grupo que las cepas WB y Ja.

Sin embargo una de las cepas del FC, procedente de bacalao, fue clasificada como tipo Ab (serotipo A3), cepa europea originalmente aislada de trucha en Dinamarca (Jørgensen y Grauballe, 1971). Es interesante señalar que 6B1_A es un clon obtenido mediante diluciones seriadas de la cepa original, procedente de bacalao, 6B1. Otro clon derivado de esta cepa es el 6B1_D, que fue previamente clasificado como de tipo americano WB (capítulo 2). Este resultado indica que son posibles las infecciones mixtas con 2 cepas diferentes en un mismo individuo, y sugiere una doble fuente de este virus: transmisión desde las áreas continentales de América del Norte y migración de las poblaciones de peces desde zonas europeas.

El análisis de las secuencias del segmento B de 6 de las 7 cepas del FC confirmó los resultados obtenidos con el segmento A, lo que denota la existencia de una gran homología entre estas cepas. Sin embargo, se observó una discrepancia importante ya que la cepa 20G1_D, procedente de gallineta, que había sido clasificada como tipo WB en función de la secuencia de su segmento A, se incluyó en el genogrupo II, que comprendía también las cepas 6B1_A y 2290 y 24.R (de tipo Ab).

La mayoría de los trabajos sobre secuenciación de birnavirus acuáticos realizados hasta la fecha, tal y como se ha indicado anteriormente, se basan en las secuencias del segmento A, y sólo unas pocas secuencias del segmento B están disponibles en las bases de datos, al menos de las cepas de referencia de IPNV. Además, los únicos casos en los que se realizó un tipado de birnavirus basado en la secuencia del segmento B (Zhang y Suzuki, 2003; Cutrín y col., 2004) obtuvieron un genotipado equivalente al obtenido con la ORF PP del segmento A (Hosono y col., 1996; Cutrín y

col., 2004). Sin embargo, en el presente análisis la secuenciación de los dos segmentos de la cepa 20G1_D indica que no siempre coinciden los resultados obtenidos con el segmento A y el B, lo que pone de relevancia la importancia de llevar a cabo la secuenciación de ambos segmentos para realizar una caracterización más fiable de los birnavirus.

Por otra parte, los resultados obtenidos también evidencian la existencia de una recombinación genética natural entre diferentes cepas de birnavirus acuáticos en un hospedador. La cepa recombinante 20G1_D podría corresponder a un birnavirus recombinante americano-europeo generado en gallineta. La recombinación natural entre birnavirus sólo había sido sugerida, pero no demostrada, en IBDV (Brown y Skinner, 1996), siendo esta la primera vez que se describe en birnavirus acuáticos. Su origen es fácilmente comprensible si consideramos la existencia de coinfección de diferentes cepas de birnavirus acuáticos en un único pez, como ocurre con las cepas 6B1_A y 6B1_D, que cohabitan en bacalao. La recombinación se generaría como consecuencia de la existencia de estas coinfecciones. Aunque desconocemos la implicación biológica que puede tener la existencia de estas cepas recombinantes en términos de virulencia y/o adaptación a nuevos hospedadores, se sabe que, en términos generales, el intercambio genético que ocurre mediante la recombinación de cepas de diferentes orígenes genera mayor diversidad genética entre los virus y se cree que este mecanismo juega un papel clave en la evolución, la patogénesis y la epidemiología de importantes patógenos virales (Pierce y col., 1998; Iturriza-Gómara y col., 2001; Li y col., 2003).

El hecho de que la mayoría de las cepas del FC analizadas, independientemente del segmento estudiado, fuese de tipo WB puede explicarse fácilmente por la cercanía de esta pesquería a América del Norte, mientras que la aparición en 2 de estas cepas de secuencias relacionadas con la cepa europea Ab podría explicarse teniendo en cuenta la

migración de los peces a través del Atlántico Norte. Aunque el comité científico de la NAFO consideró durante mucho tiempo que las poblaciones de bacalao y gallineta que habitan esta pesquería eran poblaciones aisladas, debido a la existencia de un estrecho cañón de 1.100 metros de profundidad (Flemish Pass), que separaría a este banco del resto de grandes bancos de Terranova, actualmente se cree que tanto el bacalao como la gallineta que viven en el FC migran a lo largo del Atlántico Norte (Roques y col., 2002; de Cárdenas, 2004). Nuestros resultados apoyan esta idea de la migración, según la cual la cepa 6B1_A sería un birnavirus de origen europeo, generado en peces de aguas europeas que podrían haber migrado al FC; más aún, la cepa 20G1_D sería un birnavirus recombinante americano-europeo, generado probablemente en gallinetas parasitadas por birnavirus de ambos lados del Atlántico Norte. El hecho de que el serotipo Ab (A3) hubiese sido detectado previamente en peces salvajes del estuario del río Pamlico en aguas de la costa de Carolina del Norte (EEUU) (McAllister y col., 1984) apoya también la existencia de movimientos migratorios transatlánticos. Todos estos datos respaldan, por tanto, la distribución de determinados serotipos en determinadas zonas, que se ha visto quebrantada por las migraciones de peces y, más recientemente, por la manipulación humana con la importación de peces y huevos.

CONCLUSIONES

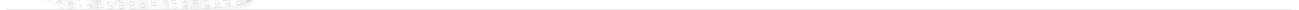


1. Los peces del banco pesquero Flemish Cap son hospedadores naturales de birnavirus acuáticos, que los parasitan sin causarles enfermedad aparente, quizás como resultado de una infección antigua.
2. La presencia de otros tipos virales (como picornavirus/nodavirus, flavivirus, coronavirus, arenavirus/paramixovirus y ortomixovirus/paramixovirus) poco frecuentes o completamente ausentes en la literatura de la patología de peces, pero algunos de ellos considerados de riesgo en clínica animal y humana, debe hacernos conscientes de la necesidad de conocer el estado sanitario de las poblaciones naturales de peces como medida de reducción del riesgo de introducción de nuevos patógenos tanto en acuicultura (por introducción de nuevas especies de cultivo), como ganadería (a través de piensos) y sanidad humana (por consumo).
3. La caracterización molecular preliminar de los birnavirus del FC indicó que poseen un origen común norteamericano, lo cual era esperable teniendo en cuenta la ubicación de este banco pesquero, en la costa oeste de Canadá. Sin embargo, el análisis de la secuencia genómica completa de un mayor número de cepas, ha revelado la presencia en este banco pesquero de cepas de birnavirus de dos orígenes (europeo y americano), lo que apoya la existencia de un modelo migratorio de las especies de peces implicadas (bacalao y gallineta) a lo largo Atlántico Norte. Nuestros resultados demuestran, además, que es posible la coexistencia, *in vivo*, de dos cepas distintas de birnavirus en un mismo huésped. Los resultados de esta parte del estudio han demostrado lo que, en nuestra opinión, es un resultado de gran trascendencia puesto que, por primera vez se ha demostrado que el mecanismo de recombinación viral por “reasorción” (reorganización de segmentos) puede

darse *in vivo* en este virus, como consecuencia lógica de la coinfección de 2 cepas distintas en un mismo huésped.

4. Finalmente, se han encontrado partículas tubulares asociadas a birnavirus, partículas que son de origen viral y están formadas únicamente por proteínas del virus IPNV (principalmente pVP2 y VP2). Su existencia no parece guardar relación con el serotipo ni, por extensión, con la especie de pez hospedador ni con el origen geográfico de la cepa bajo estudio. Asimismo, su formación no parece estar relacionada ni con la fase p.i., ni con la MOI, ni con la línea celular. Por otra parte, la coincidencia de mutaciones especialmente significativas en los genes que codifican las proteínas VP5, VP4 y VP3 en los clones formadores de túbulos nos hace sospechar que la formación de los mismos podría responder a una estrategia viral para asegurar la persistencia de estas cepas en un ambiente con bajo número de hospedadores como es el de este banco natural de peces.

BIBLIOGRAFÍA



- Ahne, W. 1978. Isolation and characterization of infectious pancreatic necrosis virus from pike (*Esox lucius*). *Arch. Virol.* 58: 65-69.
- Ahne, W. 1985. Virusinfektion bei Fischen: Ätiologie, Diagnose und Bekämpfung. *Zentralbl Veterinärmed [B]* 32: 237-264.
- Ahne, W. y Kölbl, O. 1987. Occurrence of reoviruses in European cyprinid fishes (*Tinca tinca* Lin; *Leuciscus cephalus* Lin.). *J. Appl. Ichthyol.* 3: 139-141.
- Ahne, W. y Thomsen, I. 1985. Occurrence of VHS virus in wild white fish (*Coregonus sp.*). *Zentralbl. Veterinarmed.* 32 (1): 73-75.
- Ahne, W., Jørgensen, P. E. V., Olesen, N. J., Fischer-Scherl, T. y Hoffmann, R. 1989. Aquatic birnaviruses: Virus of the serogroup II isolated from an IPN outbreak in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 9: 14-16.
- Akashi, H., Kaku, Y., Kong, X. y Pang, H. 1997. Antigenic and genetic comparisons of Japanese and Australian Simbu serogroup viruses: evidence for the recovery of natural virus reassortants. *Virus Res.* 50: 205-213.
- Amend, D. F. y Wedemeyer, G. 1970. Approved procedure for determining absence of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in certain fish and fish products. *Western Fish Disease Laboratory, Sand Point Naval Air Station, Seattle, Washington* 27:1-4.
- Amend, D. F., McDowell, T. y Hedrick, R. P. 1984. Characteristics of a previously unidentified virus from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 41: 807-811.
- Amin, O. M. 1979. Lymphocystis disease in Wisconsin fishes. *J. Fish Dis.* 2: 207-217.
- Amos, A. H. 1985. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. 3rd ed. Fish Health Section. *American Fisheries Society*. Corvallis, Oregon.
- Anders, K. 1988. Biology of tumour- and tumour-like diseases of fish from the lower Elbe River. *Möller Publications*, Kiel.
- Anders, K. 1989. A herpesvirus associated with an epizootic epidermal papillomatosis in European smelt, *Osmerus eperlanus* L. En: *Viruses of Lower Vertebrates* (Ahne, W. y Kurstak, E., Eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 184-197.
- Anónimo. 2003. Fish farming: the promise of a blue revolution. *The Economist.* 7 de agosto.
- Armstrong, R., Robison, J., Rymes, C. y Needhan, T. 1993. Infectious hematopoietic necrosis in Atlantic salmon in British Columbia. *Can. Vet. J.* 34: 312-313.
- Ashburner, L. D. 1975. Lymphocystis in paradise fish (*Macropodus opercularis*) in Australia. *Aust. Vet. J.* 51: 448-449.
- Bandín, I., Silva, A., Olveira, J. G., Cutrín, J. M., Dopazo, C. P. y Barja, J. L. 1997. Virus in marine wild fish. VIIIth Int. Conf. on Diseases of Fish and Shellfish. *Eur. Ass. Fish Pathol.* 14-19 Sept., Edinburgh, Scotland, p. 001.
- Ball, L. A. 2001. Replication strategies of RNA viruses. En: *Fields Virology. Vol. 1* (Knipe, D. M. y Howley, P. M., Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp. 105-118.
- Barke, D. E., MacKinnon, A. M., Boston, L., Burt, M. D., Cone, D. K., Speare, D. J., Griffiths, S., Cook, M. Ritchie, R. y Olivier, G. 2002. First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New

- Brunswick, Canada. *Dis. Aquat. Org.* 10; 49 (2): 99-105.
- 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.) Acad. Press, pp. 91-99.
- Bell, G. R. y Margolis, L. 1976. The fish health program and the occurrence of fish diseases in the Pacific region of Canada. *Fish Pathol.* 10: 115-122.
- Bergh, O., Nilsen, F. y Samuelsen, O. B. 2001. Diseases, prophylaxis and treatment of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: a review. *Dis. Aquat. Org.* 48 (1): 57-74.
- Berry, E. S., Shea, T. B. y Gabliks, J. 1983. Two iridovirus isolates from *Carassius auratus* (L.). *J. Fish Dis.* 6: 501-510.
- Biering, E., Melby, H. P. y Mortensen, S. H. 1997. Sero- and genotyping of some marine aquatic birnavirus isolates from Norway. *Dis. Aquat. Org.* 28: 169-174.
- Bjerkås, E., Bjerkås, I. y Morsness, E. 1998. An outbreak of cataract with lens rupture and nuclear extrusion in wolf-fish (*Anarhichas spp.*). *Veterinary Ophthalmology* 1: 9-15.
- 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. L., 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.
- Blixenkron-Moller, M., Bolt, G., Jensen, T. D., Harder, T. y Svanson, V. 1996. Comparative analysis of the attachment protein gene (H) of dolphin morbillivirus. *Virus Res.* 40: 47-55.
- Bloch, B. y Larsen, J. L. 1993. A case of severe general edema in young farmed turbot associated with a herpesvirus infection. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 14: 130-131.
- Bonami, 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. Fish Pathol.* 3: 41.
- 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 sensitivity of five fish cell lines to wild infectious pancreatic necrosis viruses isolated in Northeastern Italy. En: *Fish and Shellfish Pathology* (Ellis, A. E., Ed.), Acad. Pres, London, pp. 289-292.
- Bowering, W. R. y Brodie, W. B. 1991. Distribution of commercial flatfishes in the Newfoundland-Labrador region of the Canadian Northwest Atlantic and changes in certain biological parameters since exploitation. *Neth. J. Sea Res.* 27 (3/4): 407-422.
- Bragg, R. R. y Combrink, H. 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, M. D. y Skinner, M. A. 1996. Coding sequences of both genome segments of a European very virulent infectious bursal disease virus. *Virus Research* 40: 1-15.
- Bucke, D., Finlay, J., McGregor, D. y Seagrave, C. 1979. Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus: its occurrence in captive

and wild fish in England and Wales. *J. Fish Dis.* 2: 549-553.

Byrne, P. J., MacPhee, D. D., Ostland, V. E., Johnson, G. y Ferguson, H. W. 1998. Haemorrhagic kidney syndrome of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 21: 81-91.

Calvert, J. G., Nagy, E., Soler, M. y Dobos, P. 1991. Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 72: 2563-2567.

Cárdenas de, E. 2004. Relative isolation of the Flemish Cap cod population. *NAFO Symposium on the Ecosystem of the Flemish Cap*. September 8-10, Dartmouth, Nova Scotia, Canada.

Caspar, D. L. D. y Klug, A. 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 27: 1-24.

Castón, J. R., Martínez-Torrecedrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J. F., Casal, I. y Carrascosa, J. L. 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J. Virol.* 75: 10815-10828.

Castric, J., Baudin-Laurencin, F., Coustans, M. F. y Auffret, M. 1987. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus Ab serotype from epizootic in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 67: 117-126.

Castric, J., Jeffroy, J., Bearzotti, M. y de Kinkelin, P. 1992. Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus from wild evers *Anguilla anguilla*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 12: 21-23.

Castrucci, M. R., Donatelli, I., Sidoli, L., Barigazzi, G., Kawaoka, Y. y Webster, R. G. 1993. Genetic reassortment between avian and

influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* 193: 503-506.

Caswell-Reno, P., Reno, P. y Nicholson, B. 1986. Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus: Analysis of viral epitopes and comparison of different isolates. *J. Gen. Virol.* 67: 2193-2206.

Caswell-Reno, P. A., Carlin, L. J., Bouchard, D. A., Parker, R., Nicholson, B. L. y Reno, P. W. 1990. Serological analysis of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolates from Eastern North America using monoclonal antibodies. En: *Proceedings of the 19th Annual Eastern Fish Health Workshop*, University of Prince Edward Island, Charlottetown, PEI, p. 7.

Chang, N., MacDonald, R. y Yamamoto, T. 1978. Purification of infectious pancreatic necrosis (IPNV) virus and comparison of polypeptide composition of different isolates. *Can. J. Microbiol.* 24: 19-27.

Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B. y Delmas, B. 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.* 76(5): 2384-2392.

Chevalier, C., Lepault, J., Da Costa, B. y Delmas, B. 2004. The last C-terminal residues of VP3, glutamine acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 78(7): 3296-3303.

Cheville, N. 1967. Studies on the pathogens of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen and thymus of the chicken. *Am. J. Pathol.* 51: 527-551.

Christie, K. E., Håvarstein, 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.

- Christmas, J. Y. y Howse, H. D. 1970. The occurrence of lymphocystis in *Micropogon undulatus* and *Cynoscion arenarius* from Mississippi estuaries. *Gulf Res. Rep.* 3: 131-154.
- Cohen, D. M. 1986. *Moridae*. En: *Smiths' sea fishes* (Smith, M. M. y Heemstra, P. C., Eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 326-328.
- Cohen, J. A., Poinsard, A. y Scherrer, R. 1973. Physico-chemical and morphological features of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 21: 485-498.
- Cohen, D. M., Inada, T., Iwamoto, T. y Scialabba, N. 1990. FAO species catalogue Vol. 10. Gadiform fishes of the world (Order *Gadiformes*). An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. *FAO Fish. Synop.* (125, Vol. 10): 442 pp.
- Comps, M., Menu, B., Breuil, G. y Bonami, J. R. 1991. Viral infection associated with rotifer mortalities in mass culture. *Aquaculture.* 93: 1-8.
- Cotor, F., Zavate, O. y Avram, G. 1990. The presence of enteroviruses in species of shellfish and fish. *Rev. Roum. Virol.* 41 (1): 19-23.
- Couve, E., Kiss, J. y Kuznar, J. 1992. Infectious pancreatic necrosis virus internalization and endocytic organelles in CHSE-214 cells. *Cell. Biol. Int. Rep.* 16: 899-906.
- Crane, M. S. 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. Aquat. Org.* 43: 1-14.
- Cutrín, J. M., Olveira, F. G., Barja, J. L. y Dopazo, C. P. 2000. Diversity of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish and reservoirs in Northwestern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 839-843.
- Cutrín, J. M., Barja, J. L., Nicholson, B. L., Bandín, I., 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 aquabirnavirus isolated from Northwestern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(2): 1059-1067.
- Dales, S. 1963. Association between spindle apparatus and reovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 50: 268-275.
- Dannevig, B. H., Falk, K. y Namork, E. 1995. Isolation of the causal virus of infectious salmon anaemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *J. Gen. Virol.* 76: 1353-1359.
- Darragh, A. y MacDonald, R. 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.
- 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.
- Devold, M., Krossøy, B., Aspehaug, V. y Nylund, A. 2000. Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Dis. Aquat. Org.* 40: 9-18.
- DFO, 1999. Interaction between wild and farmed Atlantic salmon in the Maritime Provinces. DFO Maritimes Regional Habitat Status Report 99/1E.
- Dixon, P. F. 1999. VHSV came from the marine environment: clues from the

- literature, or just red herrings? *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19: 60-65.
- Dixon, P. F., Feist, S., Kehoe, E., Parry, L., Stone, D. M. y Way, K. 1997. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from Atlantic herring *Clupea harengus* from the English Channel. *Dis. Aquat. Org.* 30: 81-89.
- Dobos, P. 1995a. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Ann. Rev. Fish. Dis.* 5: 25-54.
- Dobos, P. 1995b. Protein-primed RNA synthesis in vitro by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 208: 19-25.
- Dobos, P. y Rowe, D. 1977. Peptide map comparison of infectious pancreatic necrosis virus-specific polypeptides. *J. Virol.* 24: 805-820.
- Dobos, P., Hallett, 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., Hallett, 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.
- 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., Toranzo, A. E., Roberson, B. S., Baya, A. y Hetrick, F. M. 1992. Antigenic relationships among rotaviruses isolated from fish. *J. Fish Dis.* 15: 27-36.
- Dopazo, C. P., Bandín, I., López-Vázquez, C., Lamas, J., Noya, M. y Barja, J. L. 2002. Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus from Greenland halibut *Reinhardtius hippoglossoides* caught at the Flemish Cap. *Dis. Aquat. Org.* 50: 171-179.
- Dorson, M. 1982. Vaccination against infectious pancreatic necrosis. *Fish Vaccination* 2: 162-171.
- Drolet, B. S., Chiou, P. P., Heidel, J. y Leong, J.-A. 1995. Detection of truncated virus particles in a persistent RNA virus infection in vivo. *J. Virol.* 69 (4): 2140-2147.
- Duncan, R. y Dobos, P. 1986. The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucl. Acids Res.* 14: 5934-5935.
- Duncan, R., Nagy, E., Krell, P. y Dobos, P. 1987. Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein. Detection of a virus-encoded protease and the fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J. Virol.* 61: 3655-3664.
- 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.
- Durham, P. J., Allanson, M. J. y Hutchinson, W. G. 1996. Lymphocystis disease in snapper (*Pagrus auratus*) from Spencer Gulf, South Australia. *Aust. Vet. J.* 74 (4): 312-313.
- Eaton, W. D., Hulett, J., Brunson, R. y True, K. 1991. The first isolation in North America of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) and viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) in coho salmon from the same watershed. *J. Aquat. Animal Health* 3: 114-117.
- Eiras, J. C. 1984. Virus infection of marine fish: prevalence of viral erythrocytic

- necrosis (VEN) in *Mugil cephalus* L., *Blennius pholis* L., and *Platichthys flesus* L. in coastal waters of Portugal. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 4: 52-56.
- Eiras, J. C. y Santos, P. J. 1992. Presumptive viral erythrocytic necrosis (VEN) in fishes off the Portuguese coast. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 12: 45-47.
- Enzmann, P. J. y Konrad, M. 1984. Die virale hämorrhagische Septikämie der Regenbogenforelle (VHS) und ihre Bekämpfung in Epidemiologischer. *Sicht. Tierärztl. Umschau.* 42: 228-230.
- Espinoza, J. C., Hjalmarsson, A., Everitt, E. y Kuznar, J. 2000. Temporal and subcellular localization of infectious pancreatic necrosis virus structural proteins. *Arch. Virol.* 145: 739-748.
- Essbauer, S. y Ahne, W. 2001. Viruses of Lower Vertebrates. *J. Vet. Med.* 48: 403-475.
- Estay, A., Farias, G., Soler, M. y Kuznar, J. 1990. Further analysis on the structural proteins of infectious pancreatic necrosis virus. *Virus Res.* 15: 85-96.
- Evelyn, T. P. T. y Traxler, G. S. 1978. Viral erythrocytic necrosis: natural occurrence in Pacific salmon and experimental transmission. *J. Fish. Res. Board Can.* 35: 903-907.
- FAO. 2000. The state of world fisheries and aquaculture. *FAO information division. Food and Agriculture Organization of the United Nations.* Rome.
- Fernández- Puentes, C., Figueras, A. y Novoa, B. 1993a. Initiation of a cell line from turbot. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 29: 899-900.
- Fernández- Puentes, C., Figueras, A. y Novoa, B. 1993b. A new fish cell line derived from turbot (*Scophthalmus maximus*) TV-1. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 13: 94-96.
- Fields, B. N., Knipe, D. M. y Howley, P. M. (Eds.). 1996. (3rd ed.). *Fundamental Virology.* Lipponcott-Raven, New York. 1340 pp.
- Finch, J. T. y Klug, A. 1965. The presence of viruses of the papiloma-polyoma type. III. Structure of rabbit papilloma virus. *J. Mol. Biol.* 13: 1-2.
- Frimodt, C. 1995. Multilingual illustrated guide to the world's commercial coldwater fish. *Fishing News Books,* Osney Mead, Oxford, England. 215 pp.
- Frost, P., Håvarstein, B., Lygren, B., Stahl, S., Endresen, C. y Christie, K. E. 1995. Mapping of neutralization epitopes on infectious pancreatic necrosis viruses. *J. Gen. Virol.* 76: 1165-1172.
- Galloux, M., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J.-C., Da Costa, B. y Delmas, B. 2004. Peptides resulting from the pVP2 C-terminal processing are present in infectious pancreatic necrosis virus particles. *J. Gen. Virol.* 85: 2231-2236.
- Gerrard, S. R., Li, L., Barrett, A. D. y Nichol, S. T. 2004. Ngari virus is a Bunyamwera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa. *J. Virol.* 78: 8922-8926.
- Ghittino, P. y Ghittino, C. 1985. Probalie adenovirosi nel giovane storione d' allevamento (*Acipenser transmontanus*). *Riv. Ital. Piscic. Ittiop.* 10: 137-139.
- Giraud, P., Facon, J., Catel, J., Knockaert, H., Guenot, J. y Sevin, J. M. 1994. Recherche d'une transmission éventuelle des virus SHV et NHI aux populations naturelles a partir de salmonicultures contaminées. *Bull. Fr. Pêche Piscis.* 333: 159-166.
- Gjedrem, T. 1997. Breeding to raise resistance. En: *Furunculosis. Multidisciplinary*

- Fish Diseases Research* (Bernouth, E. M., Ellis, A. E., Midtyling, P. J., Oliver, G. y Smith, Eds.). Acad. Press, San Diego. 529 pp.
- Granzow, H., Weiland, F., Fichtner, D. y Enzmann, F. 1997a. Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. *J. Fish. Dis.* 20: 1-10.
- Granzow, H., Birghan, C., Mettenleiter, T. C., Beyer, J., Köllner, B. y Mundt, E. 1997b. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J. Virol.* 71(11): 8879-8885.
- Gravell, M. y Malsberger, R. G. 1965. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 126: 555-565.
- Grischkowsky, R. S. y Amend, D. F. 1976. Infectious hematopoietic necrosis virus: prevalence in certain Alaskan sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 186-188.
- Grizzle, J. M., Altinok, I., Frasser, W. A. y Francis-Floyd, R. 2002. First isolation of largemouth bass virus. *Dis. Aquat. Org.* 50 (3): 233-235.
- Guillot, S., Caro, V., Cuervo, N., Korotkova, E., Combiescu, M., Persu, A., Aubert-Combiescu, A., Delpeyroux, F. y Crainic, R. 2000. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* 74: 8434-8443.
- Harboe, T., Mangor-Jensen, A., Naas, K. E. y Næss, T. 1998. A tank design for first feeding of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Aquaculture Research* 29: 913-919.
- Harkness, J. W., Alexander, D. J., Pattison, M. y Scott, A. C. 1975. Infectious bursal disease agent: morphology by negative stain electron microscopy. *Arch. Virol.* 48: 63-73.
- Håvarstein, L., Kalland, K., Christie, K. E. y Endresen, C. 1990. Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other *Birnaviridae*. *J. Gen. Virol.* 71: 299-308.
- Heberling, R. L. y Kalter, S. S. 1986. Dot immunobinding assay of viral antigen and antibodies. *Dev. Biol. Stand.* 64:199-203.
- Hedrick, R. P. y Okamoto, K. 1983. Biochemical and antigenic characteristics of eel European compared to selected strains of infectious pancreatic necrosis virus. En: *Double-stranded RNA viruses* (Compans, D. y Bishop, H. L., Eds.), Elsevier, New York, pp. 245-251.
- Hedrick, R. P., Fryer, J. L., Chen, S. N. y Kon, G. H. 1983a. Characteristics of four birnaviruses isolated from fish in Taiwan. *Fish Pathol.* 18: 91-97.
- Hedrick, R. P., Okamoto, K., Sano, T. y Fryer, J. L. 1983b. Biochemical characterization of eel virus European. *J. Gen. Virol.* 64: 1412-1416.
- 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., Eaton, W. D., Fryer, J. L., Groberg, W. D. y Boonyaratapalin, S. 1986a. Characteristics of a birnavirus isolated from cultured sand goby *Oxyleotris marmoratus*. *Dis. Aquat. Org.* 1: 219-225.
- Hedrick, R. P., McDowell, T., Rosemark, R., Aronstein, D. y Chan, L. 1986b. A comparison of four apparatuses for

recovering infectious pancreatic necrosis virus from rainbow trout. *Prog. Fish Cult.* 48: 47-51.

Hedrick, R. P., Croff, J. M., McDowell, T. S. y Wingfield, W. H. 1990. An iridovirus infection of the integument of the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Dis. Aquat. Org.* 8: 39-44.

Helms, R. F. 1981. Pamlico River flounder fish kill (an investigation). *North Carolina Dept. Nat. Resour. Commun. Develop.* pp. 1-28.

Heppell, J., Berthiaume, L., Corbin, F., Tarrab, E., Lecomte, J. y Arella, M. 1993. Comparison of amino acid sequences deduced from a cDNA fragment obtained from infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains of different serotypes. *Virology* 195: 840-844.

Heppell, J., Berthiaume, L., Tarrab, E., Lecomte, J. y Arella, M. 1992. Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles. *J. Gen. Virol.* 73: 2863-2870.

Heppell, J., Tarrab, E., Berthiaume, L., Lecomte, J. y Arella, M. 1995a. Characterization of the small open reading frame on genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 76: 2091-2096.

Heppell, J., Tarrab, E., Lecomte, J., Berthiaume, L. y Arella, M. 1995b. Strain variability and localization of the important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 214: 40-49.

Herman, R. L., Burke, C. N. y Perry, S. 1997. Epidermal tumors of rainbow smelt in associated virus. *J. Wildl. Dis.* 33: 925-929.

Hershberger, P. K., Kocan, R. M., Elder, N. E., Meyers, T. R. y Winton, J. R.

1999. Epizootiology of viral hemorrhagic septicemia virus in Pacific herring from the spawn-on-kelp fishery in Prince William Sound, Alaska, USA. *Dis. Aquat. Org.* 37 (1): 23-31.

Hetrick, F. M., Samal, S., Lupiani, B., Dopazo, C., Subramanian, K. y Mohanty, S. 1992. Members of the family *Reoviridae* found in aquatic animals. En: *Proceedings of the OIJ International Symposium on Salmonid Diseases* (Kimura, T., Ed.), Hokkaido University Press, Sapporo, pp. 33-40.

Hewson, R., Gmyl, A., Gmyl, L., Smirnova, S. E., Karganova, G., Jamil, B., Hasan, R., Chamberlain, J. y Clegg, C. 2004. Evidence of segment reassortment in Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *J. Gen. Virol.* 85: 3059-3070.

Hill, B. J. 1976a. Molluscan viruses: their occurrence, culture and relationships. En: *Proceedings of the 1st International Colloquium on Invertebrate Pathology*, Queens University Press, Canadá, pp. 25-29.

Hill, B. J. 1976b. Properties of a virus isolated from the bivalve mollusc *Tellina tenuis* (Da Costa). En: *Wildlife Diseases* (Page, L. A., Ed.), Plenum Press, New York, pp. 445-452.

Hill, B. J. 1982. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. En: *Microbial Diseases of Fish* (Roberts, R. J., Eds.), Acad. 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. y Dixon, P. F. 1987. Studies of IPN virulence and immunization. *Bull. Off. Int. Epiz.* 5-6: 425-427.

Hill, B. J. y Way, K. 1988. Proposed standardisation of the serological classification

- of aquatic birnavirus. *Int. Fish Health Conf. Vancouver*, B. C. Canada. July 19-21. p. 151.
- 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.
- Holmes, H. I., Ruck, B. J., Bishop, R. F. y Davidson, G. P. 1975. Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. *J. Virol.* 16(4): 937-943.
- Hong, J. R., Gong, H. Y. y Wu, J. L. 2002. IPNV VP5, a novel anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression. *Virology* 295: 217-229.
- Hosono, N., Suzuki, S., Kusuda, R. 1996. Genogrouping of birnaviruses isolated from marine fish: A comparison of VP2/NS regions on genome segment A. *J. Fish Dis.* 19: 295-302.
- Howatson, A. F. y Almeida, J. D. J. 1960. Observations on the fine structure of polyoma virus. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* 8: 828-834.
- Hsu, Y. L., Chen, B. S. y Wu, J. L. 1989. Comparison of RNAs and polypeptides of infectious pancreatic necrosis virus isolates from eel and rainbow trout. *J. Gen. Virol.* 70: 2233-2239.
- Hsu, Y. L., Chen, B. S. y Wu, J. L. 1993a. Demonstration of infectious pancreatic necrosis virus strain VR-299 in Japanese eel, *Anguilla japonica* Temmick & Schlegel. *J. Fish Dis.* 16: 123-129.
- Hsu, Y. L., Hong, J. L., Wu, M. F. y Wu, J. L. 1993b. Infectious pancreatic necrosis virus infection in Taiwan's aquatic fishes. *Fish. Soc. Taiwan* 20: 249-256.
- Hsu, Y.-L., Chiang, S.-Y., Lin, S.-T. y Wu, J.-L. 1989. The specific detection of infectious pancreatic necrosis virus in infected cells and fish by the immuno dot blot method. *J. Fish Dis.* 12: 561-571.
- Hummeler, K., Koprowski, H. y Wiktor, J. 1967. Structure and development of rabies virus in tissue culture. *J. Virol.* 1: 152-170.
- Hureau, J.-C. y Litvinenko, N. I. 1986. *Scorpaenidae*. En: *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean* (Whitehead, P. J. P., Bauchot, M. L, Hureau, J.-C., Nielsen, J. y Tortonese, E., Eds.), UNESCO, Paris, Vol. 3, pp. 1225-1226.
- ICES. 1997. Report of the workshop on the interaction between salmon lice and salmonids. Edinburg, Scotland, UK. Nov 11-15, 1996. ICES CM 1997/M:4.
- ICES. 1998. Report of the working group on pathology and diseases of marine organisms. *Gdyna Poland*, March 3-7 1998. ICES CM 1997/F:7.
- Isshiki, T., Kawai, K., Kusuda, R. 1989. Incidence of yellowtail ascites virus (YAV) in wild yellowtail fingerling. *Nippon Suissan Gakkaishi* 55: 633-637.
- Isshiki, T., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T. y Miyazaki, T. 2001. An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.* 47 (2): 87-99.
- Iturriza-Gomara, M., Isherwood, B., Desselberger, U. y Gray, J. 2001. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 75(8): 3696-3705.
- Iwamoto, T., Okinata, Y., Mise, K., Mori, K.-I., Arimoto, M., Okuno, T. y Nakai, T. 2004. Identification of host-specificity determinants in betanodaviruses by using

- reassortants between stripped jack nervous necrosis virus and sevenband grouper nervous necrosis virus. *J. Virol.* 78: 1256-1262.
- Jensen, N. J. y Bloch, B. 1980. Adenovirus-like particles associated with epidermal hyperplasia in cod (*Gadus morhua*). *Nord. Vet. Med.* 32 (3-4): 173-175.
- Jensen, N. J. y Larsen, J. L. 1982. The ulcus-syndrome in cod (*Gadus morhua*). IV. Transmission experiments with two viruses isolated from cod and *Vibrio anguillarum*. *Nord. Vet. Med.* 34: 136-142.
- Jensen, N. J., Bloch, B. y Larsen, J. L. 1979. The ulcus syndrome on cod (*Gadus morhua*). III. A preliminary virological report. *Nord. Vet.* 31: 436-442.
- Jørgensen, P. E. V. 1972. Egtved virus: Antigenic variation in 76 isolates examined in neutralization test and by means of the fluorescent antibody technique. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 30: 333-340.
- 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. Veterinarmed.* 23: 568-575.
- Kahn, R. A. y Newman, M. W. 1982. Blood parasites from fish of the Gulf of Maine to Cape Hatteras, Northwest Atlantic Ocean, with notes on the distribution of fish hematozoa. *Can. J. Zool.* 60: 396-402.
- Karlsen, Ø., Skiftesvik, A. B. y Helvik, J. V. 1998. The effect of light on activity and growth of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk-sac larvae. *Aquaculture Research* 29: 899-912.
- Kasornchandra, J., Engelking, H. M., Lannan, C. N., Rohovec, J. S. y Fryer, J. L. 1992. Characterization of three rhabdoviruses from snakehead fish *Ophicephalus striatus*. *Dis. Aquat. Org.* 13: 89-94.
- Kelly, R. K. y Loh, P. C. 1972. Electron microscopical and biochemical characterization of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 10: 824-834.
- 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.
- Kent, M. L., Eaton, W. D. y Casey, J. W. 1997. Plasmacytoid leukemia of chinook salmon. *Leukemia* 11 (Suppl 3): 170-171.
- Kibenge, F. S., Garate, O. N., Johnson, G., Arriagada, R., Kibenge, M. J. y Wadowska, D. 2001. Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. *Dis. Aquat. Org.* 45 (1): 9-18.
- Kimura, T., Yoshimizu, M. y Tanaka, M. 1981. Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*-II. Oncogenic nature. *Fish Pathology* 15: 149-153.
- King, J. A., Snow, M., Smail, D. A. y Raynard, R. S. 2001. Distribution of viral septicemia virus in wild fish species of the North Sea, North east Atlantic Ocean and Irish Sea. *Dis. Aquat. Org.* 47 (2): 81-86.
- Konrad, M., Rapp, J. y Enzmann, P. J. 1984. Epidemiological studies on VHS in a wild fish population. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 4: 69-70.
- Krag, M. L. y Schonheyder, H. C. 1996. Seal fingers and other infections

- transmitted from seals. *Ugeskr. Laegen.* 158: 5015-7.
- Krantz, G. E. 1970. Lymphocystis in striped bass, *Roccus saxatilis*, in Chesapeake Bay. *Chesapeake Sci.* 11: 137-139.
- Kristiansen, T. S., Otterå, H. y Svåsand, T. 2000. Size-dependent mortality of juvenile Atlantic cod, estimated from recaptures of released reared cod and tagged wild cod. *Journal of Fish Biology.* 56: 792-801.
- Krossøy, B., Hordvik, I., Nilsen, F., Nylund, A. y Endressen, C. 1999. The putative polymerase sequence of infectious salmon anaemia suggests a new genus within the *Orthomyxoviridae*. *J. Virol.* 73: 2136-2142.
- Kuchler, R. 1977. Biochemical methods in cell culture and virology. En: *Dowden, Hutchinson y Ross, Inc.* Pensilvania, USA. 331 pp.
- 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 (Fish Pathology).* 28: 91-92.
- Kuznar, J., Soler, M., Farias, G. y Espinoza, J. C. 1995. Attachment and entry of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) into CHSE-214 cells: Brief report. *Arch. Virol.* 140: 1833-1840.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Laird, M. y Bullock, W. L. 1969. Marine fish haematozoa from New Brunswick and New England. *J. Fish Res. Board Can.* 26: 1075-1102.
- Lamas, J., Cepeda, C., Dopazo, C. P., Toranzo, A. E., Anadón, R. y Barja, J. L. 1996. Occurrence of an erythrocytic virus infection in cultures turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Org.* 25: 217-223.
- Lang, G., Gagnon, A. y Geraci, J. R. 1981. Isolation of an influenza A virus from seals. *Arch. Virol.* 68: 189-95.
- Langdon, J. S., Humphrey, J. D., Williams, L. M., Hyatt, A. D. y Westbury, H. A. 1986. First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.* 9: 263-268.
- Lavender, K. L., Davis, R. E. y Owens, W. B. 2000. Mid-depth recirculation observed in the interior Labrador and Irminger seas by direct velocity measurements. *Nature* 407: 66-69.
- Ledo, A., Dopazo, C. P., Lupiani, B., Barja, J. L. y Toranzo, A. E. 1987. Incidencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en Galicia. *Cuadernos Marisqueros.* Publicaciones Técnicas 12: 645-650.
- Lee, M.-K., Blake, S. L., Singer, J. T y Nicholson, B. L. 1996. Genomic variation of aquatic birnaviruses analyzed with restriction fragment length polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2513-2520.
- Li, K. S., Xu, K. M., Peiris, J. S., Poon, L. L., Yu, K. Z., Yuen, K. Y., Shortridge, K. F., Webster, R. G. y Guan, Y. 2003. Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans? *J. Virol.* 77(12): 6988-6994.
- Lientz, J. C. y Springer, J. E. 1973. Neutralization test of infectious pancreatic necrosis virus with polyvalent antiserum. *J. Wild. Dis.* 9: 120-125.
- Lightner, D. y Post, G. 1969. Morphological characteristics of infectious pancreatic necrosis virus in trout pancreatic tissues. *J. Fish Res. Board Can.* 26: 2247-2250.

- 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.
- Lumb, C. M. 1989. Self-pollution by Scottish fish farms? *Mar. Poll. Bull.* 20: 375-379.
- Macadam, A. J., Arnold, C., Howlett, J., Marsden, J. A., Taffs, S., Reeve, P., Hamada, N., Wareham, K., Almond, J. W., Cammack, N. y Minor, P. D. 1989. Reversion of attenuated and temperature sensitivity phenotypes of the Sabin type poliovirus in vaccines. *Virology* 174: 408-414.
- MacDonald, R. D. 1978. Ringed plaque formation in infectious pancreatic necrosis correlates with defective interfering particle production. *J. Gen. Virol.* 41: 523-528.
- 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. y Yamamoto, T. 1978. Quantitative analysis of defective interfering particles in infectious pancreatic necrosis virus preparations. *Arch. Virol.* 57: 77-89.
- 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.
- Magyar, G., Chung, H. y Dobos, P. 1998. Conversion of the VP1 to VPg in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 245: 142-150.
- 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.
- Malsberger, R. G. y Cerini, C. P. 1965. Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 126: 320-327.
- Mangor-Jensen, A., Harboe, T., Hennø, J. S. y Troland, R. 1998. Design and operation of halibut egg incubator. *Aquaculture Research* 29: 887-893.
- Mann, H. 1970. Über den Befall der Plattfische der Nordsee mit Lymphocystis. *Ber. Dtsch. Wiss. Komm. Meeresforsch.* 21: 219-223.
- Manning, D. S., Mason, C. L. y Leong, J. C. 1990. Cell-free translational analysis of the processing of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein. *Virology* 179: 9-15.
- Martínez-Torrequevedra, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. y Casal, I. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278: 322-331.
- Martínez-Torrequevedra, J. L., Saubi, N., Pagès-Manté, A., Castón, J. R., Espuña, E. y Casal, J. I. 2003. Structure dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines. *Vaccine* 21: 3342-3350.
- McAllister, P. E. y Bebak, J. 1997. Infectious pancreatic necrosis virus in the environment: relationship to effluent from aquaculture facilities. *J. Fish Dis.* 20: 201-207.
- McAllister, P. E. y Reyes, X. 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri*

- Richardson, imported into Chile. *J. Fish Dis.* 7: 319-322.
- McAllister, P. E., Newman, M. W., Sauber, J. H. y Owens, W. J. 1983. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from southern flounder, *Paralichthys lethostigma*, during an epizootic. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 3: 37-38.
- McAllister, P. E., Newman, M. W., Sauber, J. H. y Owens, W. J. 1984. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus (serotype Ab) from diverse species of stuarine fish. *Helgoländer Meeresunters.* 37: 317-328.
- McArn, G. E., McCain, B. y Wellings, S. R. 1978. Skin lesions and associated virus in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) in the Bering Sea. *Fed. Proc.* 37: 937.
- McCarthy, I., Moksness, E., Pavlov, D. A. y Houlihan, D. F. 1999. Effect of water temperature on protein synthesis and protein growth in juvenile Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus* L.). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56: 231-241.
- McFerran, J., McNulty, M., McKillop, E., Vonner, T., McCracken, R., Collins, D. y Allan, G. 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl turkey and duck: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.* 9: 395-404.
- McKnight, I. J. y Roberts, R. J. 1976. The pathology of infectious pancreatic necrosis virus. 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 comparison of three strains of infectious pancreatic necrosis virus of salmonid fishes. *Aquaculture.* 6: 203-210.
- McVicar, A. H. 1997. Inactivation of pathogens in aquaculture with wild fish populations. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 17: 197-199.
- Meier, W., Schmitt, M. y Wahli, T. 1994. Viral hemorrhagic septicemia (VHS) of nonsalmonids. *Ann. Rev. Fish Dis.* 4: 359-373.
- Melby, H. P., Caswell-Reno, P. y Falk, K. 1994. Antigenic analysis of Norwegian aquatic birnavirus isolates using monoclonal antibodies-with special reference to fish species, age and health status. *J. Fish Dis.* 17: 85-91.
- Mellegard, S. y Bloch, B. 1988. Herpesvirus-like particles in angelfish (*Pterophyllum altum*). *Dis. Aquat. Org.* 5: 151-155.
- Meyers, T. R., Sullivan, J., Emmenegger, E., Follet, J., Short, S., Batts, W. N., Winton, J. R. 1992. Identification of viral hemorrhagic septicemia virus isolated from Pacific cod *Gadus macrocephalus* in Prince William Sound, Alaska, USA. *Dis. Aquat. Org.* 12: 167-175.
- Meyers, T. R., Short, S., Lipson, K., Batts, W. N., Winton, J. R., Wilcock, J. y Brown, E. 1994. Association of viral hemorrhagic septicemia virus with epizootic hemorrhages of the skin in Pacific herring *Clupea harengus pallasii* from Prince William Sound and Kodiak Island, Alaska, USA. *Dis. Aquat. Org.* 19: 27-37.
- Meyers, T. R., Short, S. y Lipson, K. 1999. Isolation of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in two new host species of Alaskan marine fish. *Dis. Aquat. Org.* 38: 81-86.
- Miranda, G. J., Azzam, O. y Shirako, Y. 2000. Comparison of nucleotide sequences between Northern and Southern Philippine isolates of rice grassy stunt virus indicates

- occurrence of natural genetic reassortment. *Virology* 266: 26-32.
- Miyazaki, T. y Egusa, S. 1972. A histopathological observation on lymphocystis disease in the sea bass *Lateolabrax japonicus* (Cuvier and Valenciennes). *Fish Pathol.* 6: 83-89.
- Miyazaki, T., Asai, Y., Kobayashi, T. y Miyata, M. 2000. Lympholeukemia in madai *Pagrus major* in Japan. *Dis. Aquat. Org.* 40: 147-155.
- Miyazaki, T. K., Fujiwara, K., Kobara, J., Matsumoto, M., Abe, M. y Nagano, T. 1989. Histopathology 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 schlegeli*. *J. Aquat. Anim. Health* 1: 85-93.
- Moewus-Kobb, L. 1965. Studies with IPN virus en marine hosts. *Annals New York Academy of Sciences* 126: 328-342.
- Moore, A. y McMenemy, M. 1988. Five new virus isolates from fish and shellfish in the Maritime Provinces. *Abstracts 13th Eastern Fish Health Workshop*, Orono, Maine, USA.
- Morrison, C. M., Leggiadro, C. T. y Martell, D. J. 1996. Visualization of viruses in tumors of rainbow smelt *Osmerus mordax*. *Dis. Aquat. Org.* 18: 95-102.
- Mortensen, S. H., Hjeltnes, B., Rodsth, 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.
- Mortensen, H. F., Heue, O. E., Lorenzen, N., Otte, L., Olensen, N. J. 1999. Isolation of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Res.* 63: 95-106.
- Moss, L. H. y Gravell, M. 1969. Ultrastructure and sequential development of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 3 (1): 52-58.
- Mulcahy, D., Klaybor, D. y Batts, W. N. 1990. Isolation of infectious hematopoietic necrosis virus from a leech (*Piscicola salmositica*) and a copepod (*Salmincola sp.*) ectoparasites of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. *Dis. Aquat. Org.* 8: 29-34.
- Müller, H. 1991. Effect of viral structure and replication characteristics on the pathogenesis of infectious bursal disease. *Berl. Much. Tierarztl. Wochenschr.* 104 (4): 113-117.
- Mullins, J. E., Groman, D. y Wadowska, D. 1998. Infectious salmon anaemia in salt water Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in New Brunswick, Canada. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 11: 110-114.
- Munday, B. L. y Nakai, T. 1997. Special topic review: nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 375-381.
- Munday, B. L., Kwang, J. y Moody, N. 2002. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.* 25: 127-142.
- 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. *Proc. Royal Soc. Edinb.* 75: 223-232.
- Munro, A. L., Smail, D. A., Waddell, I. F. y Liversidge, J. 1983. The occurrence of IPN virus in salmonid farm stocks in Scotland.

Abstracts COPRAQ IV Meeting on Fish and Shellfish Diseases. Madrid.

Murchelano, R. A. 1990. Fish health and environmental health. *Environ. Health Perspect.* 86: 257-259.

Murphy, F. A., Borden, E. C., Shope, R. E. y Harrison, A. 1971. Physicochemical and morphological tongue virus-a new taxonomic group. Electron microscopy studies. *J. Gen. Virol.* 13: 273-288.

Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Chabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. y Summers, M. D. 1995. Virus taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 10. Springer-Verlag, Wien.

Muus, B. J. y Nielsen, J. G. 1999. Sea fish. *Scandinavian Fishing Year Book*, Hedehusene, Denmark, 340 pp.

Myjak, P., Szostakowska, B., Pietkiewicz, H., Potajallo, U., Dabrowski, J. y Grawinski, I. E. 1995. Occurrence of parasites, bacteria, viruses and fungi in fish that are pathogenic to men and fish. *Wiad. Parazytol.* 41(2): 139-47.

Nagy, E., Duncan, R., Krell, P. y Dobos, P. 1987. Mapping of the large RNA genome segment of infectious pancreatic necrosis virus by hybrid arrested translation. *Virology* 158: 211-217.

Neumann, W., Wilke, I., Friedich, D. y Böhme, R. 1986. Electron microscopy for detection of paramyxovirus-like particles in coarse fish. *Mh. Vet. Med.* 41: 164-66.

Newman, M. W. 1980. IPN virus of clupeid fishes. *International Council for Exploration of the Sea, Special Meeting on Diseases of Commercially Important Marine Fish and Shellfish*. No. 24.

Nicholson, B. 1971. Macromolecule synthesis in RTG-2 cells following infection with infectious pancreatic necrosis (IPN) virus. *J. Gen. Virol.* 13: 369-372.

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.

Nielsen, J. G. 1986. *Pleuronectidae*. En: *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean* (Whitehead, P. J. P., Bauchot, M. L., Hureau, J.-C., Nielsen, J. y Tortonese, E., Eds.), UNESCO, Paris, Vol. 3. pp. 1306-1307.

Nielsen, O., Clavijo, A. y Boguen, J. A. 2001. Serologic evidence of influenza A infection in marine mammals of arctic Canada. *J. Wildl. Dis.* 37: 820-5.

Nims, L., Fryer, J. L. y Pilcher, K. S. 1970. Studies of the replication of four selected viruses in two cell lines derived from salmonid fish. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 135: 6-12.

Novoa, B. 1993. Caracterización de birnavirus aislados de rodaballo (*Scophthalmus maximus*). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.

Novoa, B. 1996. Immunogold technique applied to electron microscopy of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Pathol.* 31:141-143.

Novoa, B., Figueras, A., Fernández-Puentes, C., Ledo, A., y Toranzo, A. E. 1993. Characterization of a birnavirus isolated from diseased turbot cultured in Spain. *Dis. Aquat. Org.* 15: 163-169.

Nylund, A., Alexandersen, S., Rolland, J. B. y Jakobsen, P. 1995. Infectious salmon anaemia virus (ISAV) in brown trout. *J. Aquat. Anim. Health* 7: 236-240.

Nylund, A., Krossøy, B., Devold, M., Aspehaug, V., Steine, N. O. y Hovland, T. 1999.

- Outbreak of ISA during first feeding of salmon fry (*Salmo salar*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 19: 70-74.
- Nylund, A., Devold, M., Plarre, H., Isdal, E. y Aarseth, M. 2003. Emergence and maintenance of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Europe: a new hypothesis. *Dis. Aquat. Org.* 56: 11-24.
- Oellerman, R. A., Els, H. J. y Erasmus, B. J. 1970. Characterization of African horsesickness virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 29: 163-174.
- Ohishi, K., Ninomiya, A., Kida, H., Park, C. H., Maruyana, T., Arai, T., Katsumata, E., Tobayama, T., Boltunov, A. N., Khuraskin, L. S. y Miyazaki, N. 2002. Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiol. Immunol.* 46: 639-644.
- 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., Vestergard-Jørgensen, P. E., Bloch, B. y Mellergaard, S. 1988. Isolation of an IPN-like virus belonging to the serogroup II of the aquatic birnavirus from dab, *Limanda limanda* L. *J. Fish Dis.* 11: 449-451.
- Olveira, J. G., Cutrín, J. M., Bandín, I., Barja, J. L. y Dopazo, C. P. 1997. Routine diagnosis of IPN virus using RT-PCR and nucleic acid hybridation. *EAFP VIIIth Int. Conf. Diseases of Fish and Shellfish*, Edinburg, p. 085.
- Olveira, J. G., Cutrín, J. M., Bandín, I., Barja, J. L. y Dopazo, C. P. 1998. Optimization of a diagnosis method for aquatic birnaviruses by RT-PCR. *4th Int. Symp. Viruses of Lower Vertebrates*, Weymouth, UK, p. 04.
- Oña, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Castón, J. R. y Rodríguez, J. F. 2004. The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology* 322: 135-142.
- Opstad, I., Bergh, Ø. y Skiftesvik, A. B. 1998. Large-scale rearing of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk sac larvae: Effects of flow rate on growth, survival and accumulation of bacteria. *Aquaculture Research* 29: 949-952.
- Özel, M. y Gelderblom, H. 1985. Capsid symmetry of viruses of the proposed birnavirus group. *Arch. Virol.* 84: 149-161.
- Paperna, I. 1973. Lymphocystis in fish from East African lakes. *J. Wildl. Dis.* 9: 331-335.
- Park, J. y Gajin, J. 1996. Identification of VP3 as an important neutralising epitope from DRT strain, a Korean isolate on infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Shellfish Imm.* 6: 207-219.
- Pavlov, D. A., Knudsen, P., Emel'yanova, N. G. y Moksness, E. 1997. Spermatozoon ultrastructure and sperm production in wolffish (*Anarhichas lupus*), a species with internal fertilization. *Aquatic Living Resources* 10: 187-194.
- Pérez, L., Chiou, P. y Leong, L. 1996. The structural proteins of infectious pancreatic necrosis virus are not glycosylated. *J. Virol.* 70: 7247-7249.
- Perkins, E. J., Gilchrist, J. R. S. y Abbott, O. J. 1972. Incidence of epidermal lesions in fish of the North-east Irish Sea area, 1971. *Nature* 238: 101-103.
- Persson, R. H. y MacDonald, R. D. 1982. Evidence that infectious pancreatic

- necrosis virus has a genome-linked protein. *J. Virol.* 44: 437-443.
- Pierce, C. M., Balasuriya, U. B. y MacLachlan, N. J. 1998. Phylogenetic analysis of the S10 gene of field and laboratory strains of bluetongue virus from the United States. *Virus Res.* 55(1): 15-27.
- Pintó, R. M., Álvarez-Pellitero, P., Bloch, A. y Jofre, J. 1989. Occurrence of a viral erythrocytic infection in the Mediterranean sea bass *Dicentrarchus labrax*. *J. Fish Dis.* 12: 185-191.
- Pintó, R. M., Jofre, J. y Bloch, A. 1991. Viral erythrocytic infection in sea bass: virus purification and confirmative diagnoses. *Arch. Virol.* 120: 83-96.
- Pintó, R. M., Riber, E., Jofre, J. y Bloch, A. 1995. Retroviral properties inherent to viral erythrocytic infection in sea bass. *Arch. Virol.* 140: 721-725.
- Plumb, J. A., Bowser, P. R., Grizzle, J. M. y Mitchell, A. J. 1979. Fish viruses: a double-stranded RNA icosahedral virus from a North American cyprinid. *J. Fisheries Res. Board Can.* 36: 1390-1394.
- Porterfield, J. 1989. *Birnaviridae*. En: *Andrew's viruses of vertebrates*, 5th edition, Bailliere Tindall, London, pp. 11-17.
- Qiu, W. P., Geske, S. M., Hickey, C. M. y Moyer, J. W. 1998. Tomato spotted wilt Tosspovirus genome reassortment and genome segment-specific adaptation. *Virology* 244 (1): 186-194.
- Raynard, R. S., Murray, A. G. y Gregory, A. 2001. Infectious salmon anaemia virus in wild fish from Scotland. *Dis. Aquat. Org.* 46 (2): 93-100.
- Reed, L. J. y Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
- Reno, P.W. 1999. Infectious pancreatic necrosis virus and associated birnaviruses. En: *Fish Diseases and Disorders*, vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections (Woo, P. T. K. y Bruno, D. W., Eds.). pp. 1-55.
- Reno, P. W. y Nicholson, B. L. 1981. Ultrastructure and prevalence of viral erythrocytic necrosis (VEN) virus in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., from the Northern Atlantic Ocean. *J. Fish Dis.* 4: 361-370.
- Rimstad, E. y Mjaaland, S. 2002. Infectious salmon anaemia virus. *APMIS* 110 (4): 273-282.
- 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, R. J. 1970. Lymphocystis in young plaice, and some other aspects of disease in plaice husbandry. *J. Fish Biol.* 2: 283.
- Roberts, T. E. y Dobos, P. 1983. Studies on the mechanism of temperature sensitivity of infectious pancreatic necrosis virus replication. *J. Gen. Virol.* 64: 331-339.
- Robin, C. R. y Ray, G. C. 1986. A field guide to Atlantic coast fishes of North America. Houghton Mifflin Company, Boston, USA. 354 pp.
- Rodger, H. D., Turnbull, T., Muir, F., Millar, F. S. y Richards, R. H. 1998. Infectious salmon anaemia (ISA) in the United Kingdom. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 18: 115-120.
- Rodríguez, L. L., Owens, J. H., Peters, C. J. y Nichol, S. T. 1998. Genetic reassortment

among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 242: 99-106.

Roizman, B., Carmichael, L. E., Deinhardt, F., de-The, G., Nahmias, A. J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M. y Wolf, K. 1981. *Herpesviridae*. Definition, provisional nomenclature and taxonomy. The herpesvirus study group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 16 (4): 201-217.

Roques, S., Sévigny, J.-M. y Bernatchez, L. 2002. Genetic structure of deep-water redbfish, *Sebastes mentella*, populations across the North Atlantic. *Marine Biology* 140: 297-307.

Rowley, H., Graham, D. A., Campbell, S., Way, K., Stone, D. M., Curran, W. L. y Bryson, D. G. 2001. Isolation and characterisation of rhabdovirus from wild common bream *Abramis brama*, roach *Rutilus rutilus*, farmed brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Northern Ireland. *Dis. Aquat. Org.* 48 (1): 7-15.

Sano, T. 1971. Studies on viral diseases of Japanese fishes-V. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: first isolation from epizootics in Japan. *Bull. Soc. Sci. Fish.* 37: 495-498.

Sano, T., Okamoto, N. y Nishimura, T. 1981. A new viral epizootic of *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. *J. Fish Dis.* 4: 127-139.

Sano, T., Fukuda, H., Okamoto, N. y Kaneko, F. 1983. Yamame tumor virus: Lethality and oncogenicity. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49: 1159-1163.

Sano, T., Okamoto, N., Fukuda, M., Saneyoshi, M. y Sano, T. 1992. Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated

with the larger RNA segment (RNA segment A). *J. Fish Dis.* 15: 283-293.

Santi, N., Vakharia, V. N. y Evensen, O. 2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 322 (1): 31-40.

Santos, N., Lima, R. C. C., Nozawa, C. M., Linhares, R. E. y Gouvea, V. 1999. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types C1 and C5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2734-2736.

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.

Schmale, M. C. 1991. Prevalence and distribution patterns of tumors in bicolor damselfish (*Pomacentrus partitus*) on South Florida reefs. *Marine Biol.* 109: 203-212.

Schmale, M. C., Amn, M. R. y Gill, K. A. 1996. A retrovirus isolated from cell lines derived from neurofibromas in bicolor damselfish (*Pomacentrus partitus*). *J. Gen. Virol.* 77: 1181-1187.

Schutz, M., May, E. B., Kraeuter, J. N. y 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.

Schwanz-Pfützner, I., Özel, M., Darai, G. y Gelderblom, H. 1984. Morphogenesis and fine structure of eel virus (Berlin), a member of the proposed birnavirus group. *Arch. Virol.* 81: 151-162.

Sherburne, S. W. 1973. Erythrocyte degeneration in the Atlantic herring *Clupea*

harengus L. *U. S. Natl. Mar. Fish. Serv. Bull.* 71: 125-134.

Sherburne, S. W. 1977. Occurrence of piscine erythrocytic necrosis (PEN) in the blood of the anadromous alewife, *Alosa pseudoharengus* from Maine coastal streams. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 281-286.

Sherburne, S. W. 1984. The occurrence of piscine erythrocytic necrosis (PEN), in the sea lamprey *Petromyzon marinus*, from several Maine localities. *U. S. Dep. Commer. Fish. Bull.* 82: 541-544.

Sherburne, S. W. y Bean, L. L. 1979. Incidence and distribution of piscine erythrocytic necrosis and the microsporidian, *Glugea hertwigi*, in rainbow smelt, *Osmerus mordax*, from Massachusetts to the Canadian Maritimes. *U. S. Natl. Mar. Fish. Serv. Bull.* 77: 503-509.

Smail, D. A. 1995. Isolation and identification of viral haemorrhagic septicemia (VHS) virus from North Sea cod (*Gadus morhua* L.). *ICES Committee Meeting 1995/F15*: 1-6.

Smail, D. A. y Egglestone, S. J. 1980. Virus infection of the marine fish erythrocytes: electron microscopical studies on the blenny virus. *J. Fish Dis.* 3: 47-54.

Smith, A. W., Skilling, D. E. y Brown, R. J. 1980a. Preliminary investigation of a possible lungworm (*Parafilaroides decorus*), fish (*Girella nigricans*), and marine mammal (*Callorhinus ursinus*) cycle for San Miguel sea lion virus type 5. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1846-1850.

Smith, A. W., Skilling, D. E., Dardiri, A. H. y Latham, A. B. 1980b. Calicivirus pathogenic for swine: a new serotype isolated from opaleye *Girella nigricans*, an ocean fish. *Science* 209: 940-941.

Smith, A. W., Skilling, D. E., Prato, C. M. y Bray, H. L. 1981. Calicivirus (SMSV-5) infection in experimentally inoculated opaleye fish (*Girella nigricans*). *Arch. Virol.* 67: 165-168.

Smith, A. W., Skilling, D. E., Benirschke, K., Albert, T. F. y Barlough, J. E. 1987. Serology and virology of the bowhead whale (*Balaena mysticetus* L.). *J. Wildl. Dis.* 23: 2-8.

Smith, F. G. 1972. Lymphocystic disease in *Cynoscion nothus*, *Cynoscion regalis* and *Stellifer lanceolatus* from Georgia estuaries. *Proc. Annu. Conf. Southest. Assoc. Game Fish Comm.* 26: 598-608.

Snow, M., Cunnigham, C. O., Melvin, W. T. y Kurath, G. 1999. Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Vir. Res.* 63: 35-44.

Somogyi, P. y Dobos, P. 1980. Virus-specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 129-139.

Sonstegard, R. A. 1977a. The potential utility of fishes as indicator organisms for environmental carcinogens. En: *Wastewater renovation and reuse* (D'Itri, F. M. Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 561-577.

Sonstegard, R. A. 1977b. Environmental carcinogenesis studies in fishes of the Great Lakes of North America. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 298: 261-269.

Sonstegard, R. A., McDermott, L. A. y Sonstegard, K. S. 1972. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from white suckers (*Catostomus commersoni*). *Nature* 36: 174-175.

Souter, B. W., Dwilow, A. G., Knight, K. 1984. Infectious pancreatic necrosis virus:

- Isolation from asymptomatic wild Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.). *J. Wildl. Dis.* 20: 338-339.
- Stephens, E. B. y Hetrick, F. M. 1983. Molecular characterization of infectious pancreatic necrosis virus isolated from a marine fish. En: *Bacterial and Viral Diseases of Fish. Molecular Studies* (Crosa, J. H., Ed.), Washington University, Seattle, USA.
- Stephens, E. B., Newman, M. W., Zachary, A. L. y Hetrick, F. M. 1980. A viral aetiology for the annual spring epizootics of Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus* (Latrobe) in Chesapeake Bay. *J. Fish Dis.* 3: 387-398.
- Stephens, J. S., Johnson, R. K., Key, G. S. y McCosker, J. E. 1970. The comparative ecology of three sympatric species of California blennies of the genus *Hypsoblennius* gill (*Teleostomi, Blennidae*). *Ecol. Monogr.* 40: 227-233.
- Stone, D. M., Way, K., Dixon, P. F. 1997. Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from different geographical areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus morhua* L.). *J. Gen. Virol.* 78: 1319-1326.
- Takano, R., Nishizawa, T., Arimoto, M. y Muroga, K. 2000. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 20: 186-192.
- Takano, R., Mori, K., Nishizawa, T., Arimoto, M. y Muroka, K. 2001. Isolation of viruses from wild Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.* 20: 186-192.
- Tarrab, E., Berthiaume, L., Heppell, J., Arella, M. y Lecomte, J. 1993. Antigenic characterization of serogroup "A" of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 74: 2025-2030.
- Tarrab, E., Berthiaume, L., Grothe, S., C. M. M. O., Heppell, J. y Lecomte, J. 1995. Evidence of a major neutralizable conformational epitope region on VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 76: 551-558.
- Teninges, D., Ohanessian, A., Richard-Molard, C. y Contamine, D. 1979. Isolation and biological properties of Drosophila X virus. *J. Gen. Virol.* 42: 241-254.
- Terjersen, B. F., Mangor-Jensen, A. y Fyhn, H. J. 1998. Ammonia dynamics in relation to hatching in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 18: 189-201.
- Thorud, K. y Djupvik, H. O. 1988. Infectious anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 18: 109-111.
- Tidona, C. A., Darai, G. y Büchen-Osmond, C. (Eds.). 2002. The Springer index of viruses. Springer-Verlag Berlin. 1511 pp.
- 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 balesti riba (viral disease of fish). Final report on research under a part of project. 6n/1966, Zagreb.
- 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.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. 1979. Electrophoresis transfer of proteins from

polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.

Trabelsi, A., Peenze, I., Pager, C., Jeddi, M. y Steele, D. 2000. Distribution of rotavirus VP7 serotypes and VP4 genotypes circulating in Sousse, Tunisia, from 1995 to 1999: emergence of natural human reassortants. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3415-3419.

Traxler, G. S. 1983. A survey for infectious hematopoietic necrosis virus in adult sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Great Central Lake, British Columbia. *Can. Tech. Rep. Fish Aquat. Sci.* 1205.

Traxler, G. S. 1986. An epizootic of infectious hematopoietic necrosis in 2-year-old kokanee, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) at Lake Cowichan, British Columbia. *J. Fish Dis.* 9: 545-549.

Traxler, G. S., Roome, J. R., Lauda, K. A. y LaPatra, S. 1997. Appearance of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and neutralizing antibodies in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* during their migration and maturation period. *Dis. Aquat. Org.* 28: 31-38.

van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. y Wickner, R. B. 2000. Virus taxonomy. *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Acad. Press, New York, NY.

Varner, P. W. y Lewis, D. H. 1991. Characterization of a virus associated with head and lateral line erosion syndrome in marine angelfish. *J. Aquat. Animal Health.* 3: 198-205.

Vestergård-Jørgensen, P. E. 1982. Egtved virus: occurrence of inapparent infectious with virulent virus free -living

rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at low temperature. *J. Fish Dis.* 5: 251-255.

Vogt, P. K. y Jackson, A. O. (Eds.). 1999. Satellites and defective viral RNAs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 239 pp.

Walker, P. J., Benmansour, A., Dietzgen, R., Fang, R. X. y otros 6. 2000. Family *Rhabdoviridae*. En: *Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Van Regenmortel, V. H. M., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B. y otros 7, Eds.), Acad. Press, London, pp. 563-83.

Walker, R. 1969. Virus associated with epidermal hyperplasia in fish. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 31: 195-207.

Walker, R. 1971. PEN, a viral lesion of erythrocytes. *Am. Zool.* 11: 707. Abstract.

Watanabe, L., Pakingking, R., Iida, H., Nishizawa, T., Yoshisuke, I., Arimoto, M. y Muroga, K. 2002. Isolation of aquabirnavirus and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild marine fishes. *Fish Pathol.* 37(4): 189-191.

Watrach, A. M. 1962. Intranuclear filaments associated with infectious laryngotracheitis virus. *Virology.* 18: 324-327.

Wattanavavijarn, W. S., Wattanodorn, S., Hunnak, P., Tangtrongpiros, J. y Rattanaphani, R. 1986. Viruses of ulcerative diseased fish. *Electron Microsc. Soc. Thailand News.* 3: 20-23.

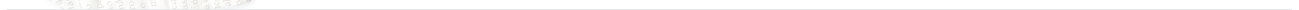
Weber, S., Fichtner, D., Mettenleiter, T. C. y Mundt, E. 2001. Expression of VP5 of infectious pancreatic necrosis virus strain VR299 is initiated at the second in-frame start codon. *J. Gen Virol.* 82: 805-812.

Williams, I. V. y Amend, D. F. 1976. A natural epizootic of infectious hematopoietic necrosis in fry of sockeye salmon

- (*Oncorhynchus nerka*) at Chilko Lake, British Columbia. *J. Fish. Res. Board. Can.* 33: 1564-1567.
- Winqvist, G., Ljungberg, O., y Hellstroem, B. 1968. Skin tumors of Northern pike (*Esox lucius* L.). II. Viral particles in epidermal proliferations. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 69: 1023-1031.
- Winton, J. R., Lannan, C. N., Fryer, J. L. y Kimura, T. 1981. Isolation of a new reovirus from chum salmon in Japan. *Fish Pathol.* 15: 155-162.
- Winton, J. R., Lannan, D., Ranson, P. y Fryer, J. L. 1985. Isolation of a new virus from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in Oregon USA. *Fish Pathol.* 20: 373-80.
- 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. y Kurstak, E., Eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 257-269.
- Wolf, K. 1966. The fish viruses. *Adv. Virus Res.* 12: 35-101.
- Wolf, K. 1988. Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press, Ithaca, NY. 476 pp.
- 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. Lymphocystis 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.), Acad. Press, New York, pp. 253-350.
- Wolf, K. y Quimby, M. C. 1971. Salmonid viruses: infectious pancreatic necrosis virus. Morphology, pathology and serology of first European isolations. *Archiv. Gesamte Virusforsch.* 34: 144-156.
- Wolf, K., Snieszko, S. F. y Dunbar, C. E. 1959. Infectious pancreatic necrosis, a virus-caused disease of fish. *Excerpta Med.* 13: 228. Abstract.
- Wolf, K., Snieszko, S., Dunbar, C. y Pyle, E. 1960. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104: 105-108.
- Yamamoto, T. 1974. Infectious pancreatic necrosis virus occurrence at a hatchery in Alberta. *J. Fish Res. Board Can.* 31: 397-402.
- Yamamoto, T. R., Kelly, R. K. y Nielsen, O. 1983. Epidermal hyperplasia of Northern pike (*Esox lucius*) associated with herpesvirus and C-type particles. *Arch. Virol.* 9: 255-272.
- Yamamoto, T. R., Kelly, R. K. y Nielsen, O. 1984. Epidermal hyperplasia of Northern pike (*Esox lucius*) associated with herpesvirus and C-type particles. *Arch. Virol.* 9: 255-272.
- Yamamoto, T., Kelly, R. K. y Nielsen, O. 1985. Epidermal hyperplasia of walleye *Stizostedion vitreum vitreum* (Mitchell), associated with retrovirus-like particles: prevalence, histologic and electron microscopic observations. *J. Fish Dis.* 8: 425-436.
- Yao, K. y Vakharia, V. N. 1998. Generation of infectious pancreatic necrosis virus from cloned cDNA. *J. Virol.* 72(11):8913-20.

Zhang, C. X. y Suzuki, S. 2003.
Comparison of the RNA polymerase genes of
marine birnavirus strains and other birnaviruses.
Arch. Virol. 148: 745-758.

APÉNDICE



A.1. Resumen de las características del segmento A de las cepas del FC (**A**) y de los principales serotipos de IPNV disponibles en la GenBank (**B**).

A

Secuencia del segmento A	5B1 _D	6B1 _A	17F2	19F3 _B	19G3 _E	19G7 _E	20G1 _D
Segmento A	3098	3095	3098	3098	3098	3098	3098
ORF PP	RNC 5´	118	116	118	118	118	118
	RNC 3 ^a	37	60	37	37	37	37
	nucleótidos ^b	2943	2919	2943	2943	2943	2943
	codones	981	973	981	981	981	981
Peso molecular ^c	107,838	106,338	107,836	106,674	107,819	107,820	107,819
ORF VP5	RNC 5´	111	67	111	111	111	111
	nucleótidos ^b	402	444	402	402	402	402
	codones	133	148	133	133	133	133
	Peso molecular ^c	15,610	17,100	15,610	15,610	15,610	15,610

B

Secuencia del segmento A	WB (V)	WB (B)	DM	Ja (D)	Ja (A)	Ab	Te	C1	C2	C3	Sp	N1	He
Segmento A	3097	---	---	3097	---	---	---	---	---	---	---	3104	---
ORF PP	RNC 5´	118	---	---	119	---	---	---	---	---	---	130	---
	RNC 3 ^a	60	---	---	59	---	---	---	---	---	---	55	---
	nucleótidos ^b	2919	2904	2904	2919	2904	2904	2904	2904	2904	2904	2919	2904
	codones	972	968	968	972	968	968	968	968	968	968	972	968
	Peso molecular ^c	106,630	106,207	106,248	106,664	106,355	105,925	106,034	106,292	105,839	105,830	106,172	106,668
ORF VP5	RNC 5´	111			67							78	
	nucleótidos ^b	402			447							447	
	codones	133			148							148	
	Peso molecular ^c	15,610			17,362							17,032	

RNC, región no codificante. ^a Incluyendo el codón de parada. ^b Excluyendo el codón de terminación. ^c Expresado en kDa.

Números de acceso de la GenBank: WB (Vakharia) AF078668, WB (Blake) AF342727, DM AF343571, Ja (Dobos) M18049, Ja (ATCC) AF342735, Ab AF342729, Te AF342731, C1, AF342732, N1 D00701, Sp AF342728, C2 AF342733, C3 AF342734 y He AF342730.

MAKALSNKQT-ILISMNDEHKQGNRNLLLEIHYASRDWTSKHSGRHNGETHTKTRDLVIQL Secuencia consenso

1PT...Y..H..I.....E.A.....R.AYT.....	M18049-JaDobos
1PT...Y..H..I.....E.A.....R.AYT.....	L40584-VR299
1PT...C..H..I.....P.....E.A.....R.AYT.....P	D26526-DRT
1H..NK.....E.T.....R...T.....I...	AY780918-5B1_D
1H..NK.....E.T.....R...T.....I...	AF078668-WBVakharia
1NN.Y.IQ.....T...P.....P	D00701-N1
1Q.....F.....A...P.....L.....	L40581-C2
1-Q...Q...S...V...FQ.....L...F.L..	L40580-Ab
1-Q...Q...S...V...FQ...H...L...F.L..	AY780919-6B1_A
1D...-Q...Q...S...I..V.C.....FQH...H...L...F.L..	AJ489232-2290

RGLRLRKWASCLLPWSSRIQGRCPLOVESEPDGTRIRPVAGDVTGPEESIQLREADLTEI Secuencia consenso

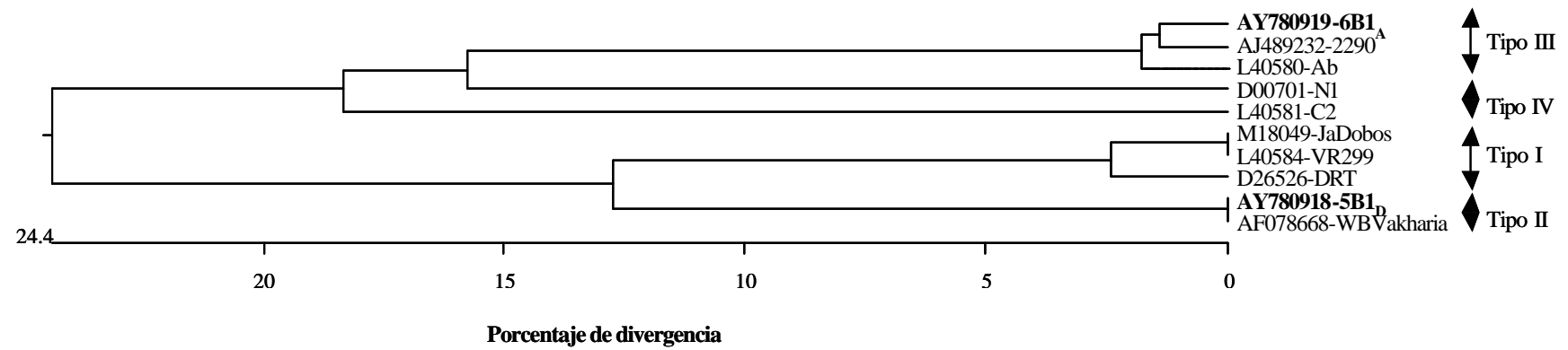
61	..I.I.....R..W.....I...R....K.G....T....	M18049-JaDobos
61	..I.I.....R..W.....I...R....K.G....T....	L40584-VR299
61	...I.....W...R.....I...R....K.G....T....	D26526-DRT
46G...S.....GI...V.NI.....V.....	AY780918-5B1_D
46G...S.....GI...V.NI.....V.....	AF078668-WBVakharia
61	...I...H...F..GT.LTD..T..M.C...AG.....A....L.....K..	D00701-N1
46S...GRT.LACW.S...C...A.I.....A....GL..W..Y.K..	L40581-C2
60	..G...C...F...T..K...S..M.C.....F.....IQ..	L40580-Ab
60	..G...C...F...T..K.G.S..M.C.....F.....IQ..	AY780919-6B1_A
60	..G...C...F...T..K...S..M.C.....FQL....IQ..	AJ489232-2290

RHPELHPSRWSLCTEWDPERHLLRQSV-

Secuencia consenso

121N.....V..Q.....C....K...	M18049-JaDobos
121N.....V..Q.....C....K...	L40584-VR299
121N.....V..Q..L..C....K....	D26526-DRT
106D....P...QR...CSY...K.F.	AY780918-5B1_D
106D....P...QR...CSY...K.F.	AF078668-WBVakharia
121	...K..TTGR...S.R.AQ.C.....	D00701-N1
106	..S...LTSRP.....KC..I...I.	L40581-C2
120	.RSK..AAG.A..P...HQ.....	L40580-Ab

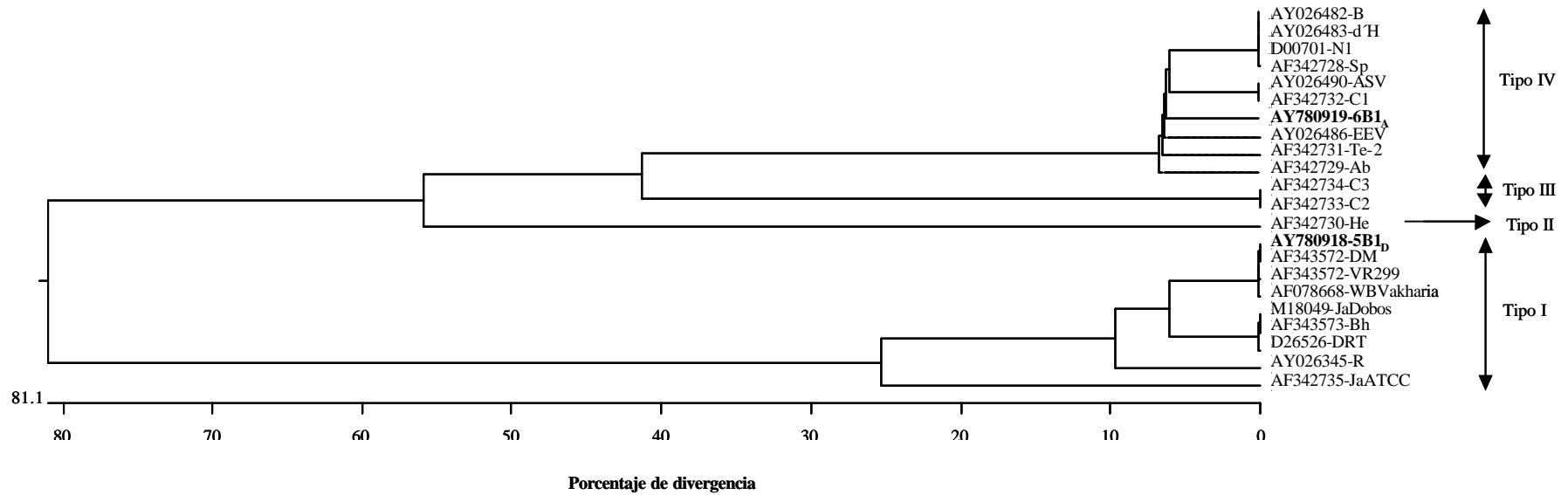
A.2.1. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la proteína VP5 de las cepas del FC 5B1_D y 6B1_A (formadora y no formadora de túbulos, respectivamente) y las cepas de otros birnavirus acuáticos disponibles en la GenBank.



A.2.2. Dendrograma de *cluster* obtenido a partir del porcentaje de divergencia entre las secuencias de aminoácidos de la ORF VP5 del segmento A de las cepas del FC 5B1_D y 6B1_A (formadora y no formadora de túbulos, respectivamente) y las cepas de otros birnavirus acuáticos disponibles en la GenBank. La longitud de las líneas horizontales que conectan dos cepas es proporcional a la distancia genética estimada entre sus secuencias.

G P D G K F S K A	Secuencia consenso
T E T . S Y . N H	AF342735-JaATCC
S E A . R Y . . H	AY026345-R
S E A . S Y . . H	M18049-JaDobos
S E A . S Y . . H	AF343573-Bh
S E A . S Y . . H	D26526-DRT
S E T . S Y . . H	AY780918-5B1_D
S E T . S Y . . H	AF343572-DM
S E T . S Y . . H	AF343572-VR299
S E T . S Y . . H	AF078668-WBVakharia
S N T . R . . M S	AF342730-He
K Q . . R . . Q S	AF342734-C3
K Q . . R . . Q S	AF342733-C2
. Q .	AF342729-Ab
. Q .	AF342731-Te2
. Q .	AY780919-6B1_A
. Q .	AY026486-EVE
. L .	AY026490-AS
. L .	AF342732-C1
. R .	AY026482-B
. R .	AY026483-d'H
. R .	D00701-N1
. R .	AF342728-Sp

A.3.1. Comparación de las secuencias de los 9 aminoácidos de la proteína VP4 de las cepas del FC 5B1_D y 6B1_A (formadora y no formadora de túbulos, respectivamente) y las cepas de otros birnavirus acuáticos disponibles en la GenBank.



A.3.2. Dendrograma de *cluster* obtenido a partir del porcentaje de divergencia entre las secuencias de los 9 aminoácidos de la proteína VP4 del segmento A de las cepas del FC 5B1_D y 6B1_A (formadora y no formadora de túbulos, respectivamente) y las cepas de otros birnavirus acuáticos disponibles en la GenBank. La longitud de las líneas horizontales que conectan dos cepas es proporcional a la distancia genética estimada entre sus secuencias.

T-CCGGCGACGACGGAGAAGTGTAAXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	Secuencia consenso
2897 T-CCGGCGATGACGGAGAAGTGTAA	M18049-JaDobos
2897 T-CCGGCGACGACGGAGAAGTGTAA	AF078668-WBVakharia
2897 TGCCGGCGACGACGGAGAAGTGTAAACGGCTACTCTCTTTCCTGAC TGA	AY780920-17F2
2897 TGCCGGCGACGACGGAGAAGTGTAAACGGCTACTCTCTTTCCTGAC TGA	AY780921-19F3_B
2897 TGCCGGCGACGACGGAGAAGTGTAAACGGCTACTCTCTTTCCTGAC TGA	AY780918-5B1_D
2897 C-GCGGAGAAGAAGCGGAGGTGTAA	AY780919-6B1_A
2897 C-GCGGAGAA	AF342729-Ab
2897 C-GCGGAGAAGAAGCGGAGGTGTAA	AJ489224-2290

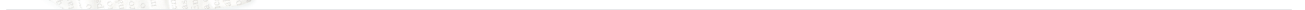
A.4. Comparación de las secuencias de nucleótidos del final de la ORF PP, correspondientes al extremo Cterminal de la proteína VP3, entre algunas cepas del FC formadoras de túbulos (17F2, 19F3_B y 5B1_D) y 6B1_A (no formadora) y las cepas de otros birnavirus acuáticos disponibles en la GenBank. En negrita se muestran los codones de terminación.

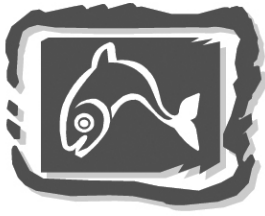
A.5. Resumen de las características del segmento B de las cepas del FC y de los principales serotipos de IPNV disponibles en la GenBank.

Secuencia del segmento B	Cepas del FC							Cepas de IPNV		
	5B1 _D	6B1 _A	17F2	19F3 _B	19G3 _E	19G7 _E	20G1 _D	WB	Ja	Sp
Segmento B	2783	2745	2783	2783	2783	2783	2745	2783	2784	2630
RNC 5 ^c	100	83	100	100	100	100	83	100	100	93
RNC 3 ^a	145	---	145	145	145	145	---	145	146	2
ORF VP1 (nucleótidos ^b)	2538	2538	2538	2538	2538	2538	2538	2538	2538	2535
ORF VP1 (codones)	846	846	846	846	846	846	846	845	845	844
Peso molecular de VP1 ^c	94,453	94,499	94,453	94,480	94,453	94,453	94,450	94,453	94,465	94,088

RNC, región no codificante. ^a Incluyendo el codón de parada. ^b Excluyendo el codón de parada. ^c Expresado en kDa. Números de acceso de la GenBank: WB (Vakharia) AF078669, Ja (Dobos) M58756 y Sp (Dobos) M58757.

PUBLICACIONES





Isolation of marine birnaviruses from new species of wild fishes

Romero-Brey, I., Bandín, I., Dopazo, C. and Barja, J. L.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Unidad de Ictiopatología. Instituto de Acuicultura. Universidad de Santiago de Compostela 15782. Santiago de Compostela, Spain.

Birnaviruses were first isolated from salmonids in the 60s (Wolf, 1988) but nowadays are known as parasites of several Classes of aquatic animals world-wide: *Teleostei*, *Agnatha*, *Mollusca* and *Crustacea*. The wide spreading of this virus can be explained by its high stability, and is also due to fish migrations and the relationships predator-prey. The number of species known as host for these viruses is around 80 (Reno, 1999) but is continuously increasing due to the isolations from new hosts. However, due to the economic importance of aquaculture, most of the studies regarding new isolations are referred to cultured fishes.

In the present study, we report the isolation of marine birnaviruses from seemingly healthy fishes caught in the Flemish Cap (FC), a Newfoundland fishery located at international waters along the American coastal platforms, and where fishing is regulated by NAFO (*Northwest Atlantic Fisheries Organisation*). Since 1994, our Ictiopathology group has collaborated in 2 research campaigns in that fishing ground organised by the Instituto de Investigaciones Mariñas (CSIC) and the Instituto Español de Oceanografía (IEO), Vigo, Spain, together with the Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR), Portugal. During the campaigns, fish from different species (a total of 80 fish during the FC 94's, and 538 in FC 99's campaign) were caught at depths between 162 and 668 meters, and several organs and tissues aseptically extracted and immediately frozen at -40°C until further processing for viral analysis in the laboratory. Fish species sampled were: Atlantic cod (*Gadus morhua*), Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*), witch flounder (*Glyptocephalus cynoglossus*), and American plaice (*Hippoglossoides platessoides*), at the FC 94', and the same 4 species and 4 new species including deepwater redfish (*Sebastes mentella*), onion-eye grenadier (*Macrourus berglax*), blue antimora (*Antimora rostrata*), and Atlantic wolf-fish (*Anarhichas lupus*), at the FC 99'.

Samples were processed and inoculated in CHSE-214, EPC, TV-1 and BB cells. Analysis of isolated viruses by electron microscopy (EM) (Fig. 1) revealed the presence of birnavirus-resembling icosahedral particles of 55 to 65 nm of diameter in around 35% of the sampled fish in the first campaign, and over 40% in the second one. Identification of the isolates was confirmed by RT-PCR. Among the 8 fish species analysed, only Atlantic wolf fish showed to be free of birnaviruses. Regarding the remaining species, percentages of fish infected with this virus ranged from 5 to 20%. It is interesting to point out that in some samples tubular structures were visualised together with birnavirus-like particles by EM (Fig. 2), which reacted with IPNV antisera by immunogold EM. These particles are being further studied.

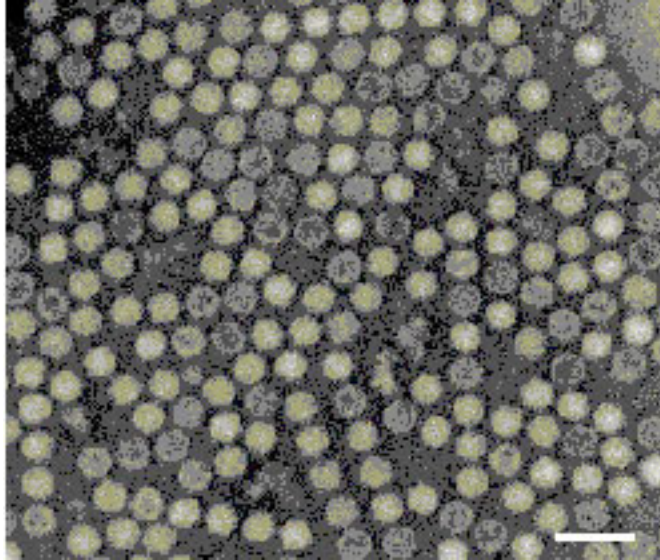


Figure 1

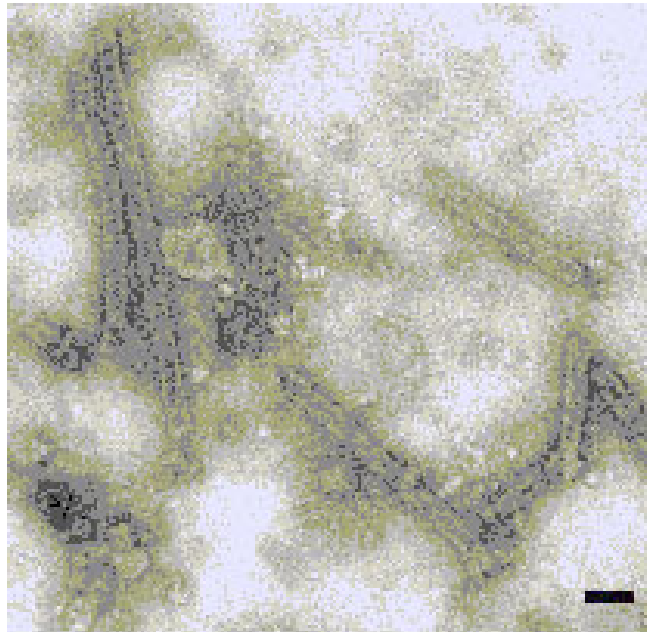


Figure 2

Among the wild fish species under study, 3 were never reported previously as host species of birnaviruses: deepwater redfish, onion-eye grenadier and blue antimora. The remaining host species Atlantic cod, Greenland halibut, witch flounder and American plaice were reported to be carriers of aquatic birnaviruses in a previous communication by members of our team, as a previous result of the first campaign (Bandín et al., 1997).

These findings support the world-wide distribution of aquatic birnaviruses and add 3 new species of fishes to the list of the great host range of these viruses. We consider that

is important to know as much as possible about the epidemiology of birnaviruses, including their reservoirs, since they can parasite many species of aquatic organisms susceptible of being cultured in the near future.

References

Bandín , I., Silva, A., Oliveira, J. G., Cutrín, J. M., Dopazo, C. P. and Barja, J. L. 1997. Virus in marine wild fish. VIIIth Int. Conf. on Diseases of Fish and Shellfish. Eur. Ass. Fish Pathol. 14-19 Sept., Edinburg, Scotland. p. 001.

Wolf, K. 1988. Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press. New York. pp. 115.

Reno, P. W. 1999. Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. 1999. Fish Diseases and Disorders, vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections (eds. P.T.K. Woo and D.W. Bruno). pp. 1-55.

Molecular characterization of birnaviruses isolated from wild marine fishes at the Flemish Cap (Newfoundland)

I. Romero-Brey¹, W.N. Batts², I. Bandín¹, J.R. Winton², C.P. Dopazo^{1,*}

¹Unidade de Ictiopatóloxía, Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía, Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

²Western Fisheries Research Center, United States Geological Survey, 6505 NE 65th St., Seattle, Washington 98115, USA

ABSTRACT: Several isolates of aquatic birnaviruses were recovered from different species of wild fish caught in the Flemish Cap, a Newfoundland fishery close to the Atlantic coast of Canada. The nucleotide sequence of a region of the NS gene was identical among the isolates and was most similar to the Dry Mills and West Buxton reference strains of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Phylogenetic analysis of the sequence of a region of the VP2 gene demonstrated that the isolates were most closely aligned with the American strains of IPNV serotype A1. Electron microscopy of virus structures clarified and concentrated from cultures of infected chinook salmon embryo (CHSE-214) cells revealed a majority of typical IPNV-like icosahedral particles, as well as a low proportion of type I tubules having a diameter of approximately 55 nm and a variable length of up to 2 µm. The tubules could be propagated in cell cultures, but always in the presence of low proportions of icosahedral particles. Cloning of selected isolates by serial dilution yielded preparations with a high proportion of the tubular structures with a density in CsCl gradients of approximately 1.30 g cm⁻³. Polyacrylamide gel electrophoresis revealed the material in the band was composed of the IPNV pVP2 and VP2 proteins.

KEY WORDS: Wild fishes · Birnavirus · Aquabirnavirus · IPNV

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is the type species of the *Aquabirnavirus* genus of the family *Birnaviridae* (van Regenmortel et al. 2000). This family of single-shelled, non-enveloped, icosahedral viruses, so called because their genome consist of 2 segments of double-stranded RNA (Dobos et al. 1979), also includes infectious bursal disease virus (IBDV) of domestic fowl (Müller et al. 1979) and *Drosophila* X virus of *Drosophila melanogaster* (Teninges et al. 1979).

As one of the most important viral pathogens of trout and salmon, highly virulent strains of IPNV can cause greater than 90 % mortality in fry less than 4 mo of age. Survivors of infection may remain life-long asympto-

matic carriers and can serve as reservoirs of infection (McAllister et al. 1987).

The genome of IPNV consists of 2 segments of double-stranded RNA that are surrounded by a single-shelled icosahedral capsid of 60 to 65 nm in diameter (Dobos 1976). The larger genome segment A (3.2 kb) contains 2 partially overlapping open reading frames (ORFs). The largest encodes a 106 kDa polyprotein (5'-pVP2-NS-VP3-3'), which is co-translationally cleaved by the viral nonstructural (NS or VP4; 29 kDa) protease to generate pVP2 (63 kDa) and VP3 (29 to 31 kDa) proteins (Huang et al. 1986, Duncan et al. 1987, Nagy et al. 1987). The pVP2 is processed into the mature 50–55 kDa VP2 (Manning & Leong 1990). Both VP2 and VP3 are major components of the virion, while VP4 is present in smaller amounts. Major neutralizing

*Corresponding author. Email: mpdopazo@usc.es

epitopes are carried on VP2, suggesting that it is at least partly exposed in the outer surface of the capsid; this protein is glycosylated in the virion and freely in the cytoplasm (Hjalmarsson et al. 1999, Espinoza et al. 2000). The VP3 contains a very basic carboxy-terminal region, which is likely to interact with the packaged RNA and, therefore, believed to be inside the capsid. Segment A also encodes a 17 kDa arginine-rich NS protein (VP5) from a small ORF, which precedes and partially overlaps the major polyprotein ORF (Håvarstein et al. 1990). Although this protein is not present in the virion, it is detected in IPNV-infected cells (Magyar & Dobos 1994) and it could be involved in the regulation of the host apoptosis-off system for enhancing progeny production (Hong et al. 2002). The smaller genome segment B (2.9 kb) contains one ORF that encodes VP1, a protein of 90 to 110 kDa considered to be an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) responsible for the replication and transcription of the viral genome.

Preparations of purified IPNV virions have been reported to contain both full and empty icosahedral virions as well as tubules having a diameter of approximately 50 nm (type I), made up of regularly repeated subunits and composed mainly of pVP2 (Granzow et al. 1997b, Crane et al. 2000, Espinoza et al. 2000). However, the origin and function of these tubules is still unknown. Whereas type I tubules were observed in cells infected by members of all genera of *Birnaviridae* (Teninges et al. 1979, Schwanz-Pfützner et al. 1984, Özel & Gelderblom 1985), type II tubules, which contain VP4, were only detected in cells infected with IBDV or in purified IBDV preparations (Granzow et al. 1997a).

Most aquatic birnaviruses, regardless of host species or geographic origin, are antigenically related and are members of a single large serogroup A (Caswell-Reno et al. 1989, Christie et al. 1990, Nicholson 1993). A relatively few antigenically unrelated aquatic birnaviruses are members of a second, minor serogroup B. On the basis of reciprocal neutralization tests with polyclonal antisera and enzyme immunoassays with monoclonal antibodies, serogroup A has been demonstrated to contain 9 serotypes, named A1 to A9 (Hill & Way 1995). The A1 serotype includes most of the isolates from the United States (reference strain West Buxton [WB]). Four serotypes (A6 to A9) occur in Canada (reference strains C1, C2, C3, and Jasper [Ja]), while the remaining 4 serotypes (A2 to A5) are found principally in Europe (reference strains Sp, Ab, Hecht

[He] and Tellina [Te], respectively). Isolates related to the Ab, Sp or WB types have also been found in Asia and South America.

In the summers of 1994 and 1999, our laboratory collected tissues samples from marine fishes at the Flemish Cap (Newfoundland). During the FC'99 oceanographic campaign, most of the viruses isolated were identified as birnavirus-like viruses but, interestingly, electron microscopy revealed the presence of tubular structures together with icosahedral virus-like particles (Romero-Brey et al. 2002). In this study, we sought to further characterize and to compare these isolates, as well as to determine the nature and composition of the tubules.

MATERIALS AND METHODS

Viruses and cells. The birnavirus isolates characterized in the present study were as follows: 19F3_A, 19F3_B and 20F2, recovered from Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*); 5B1_D and 6B1_D, from Atlantic cod (*Gadus morhua*); 9R3, from onion-eye grenadier (*Macrourus berglax*); 17R5, from Atlantic wolf-fish (*Anarhichas lupus*); and 19G5, from deepwater redfish (*Sebastes mentella*). All isolates were propagated at 15°C in chinook salmon embryo (CHSE-214) cell cultures (Lannan et al. 1984) using Eagle's minimum essential medium (EMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS). The EPC (*epithelioma papillosum cyprini*) cell line was also used for protein and Western blot analysis. Cloning of viral isolates was performed by inoculation of serial dilutions onto 96-well plates of CHSE-214 cells, using 15 wells per dilution.

RT-PCR amplification. Primer sequences are shown in Table 1 and their relative positions on the IPNV segment A are shown in Fig. 1. Primer set Pr D, described

Table 1. Description of primers used for identification and sequence analysis of the birnavirus isolates

Primer	Primer sequence	Primer position ^b
D ₁ ^a	5'-AAAGCCATAGCCGCCCATGAAC-3'	2139–2160
D ₂ ^a	5'-TCTCATCAGCTGGCCAGGTAC-3'	2312–2291
IB ₁	5'-ACCAAGACCAACTCAGC-3'	1563–1579
IB ₂	5'-GCAGCTGGAGGCCGCTA-3'	1602–1618
IB ₃₋	5'-CTCGTCGACCCCTGGTTG-3'	2201–2184
IB _{VP2 ext+}	5'-GGGTTTGACAAGCCATACGT-3'	624–643
IB _{VP2 ext-}	5'-TTGGATACGCCGCCACGGT-3'	1231–1212
IB _{VP2 int+}	5'-TACGAAATAGACCTCCATC-3'	729–748
IB _{VP2 int-}	5'-ACCCCGGCACATTGCCATT-3'	1156–1137

^aAs described by Blake et al. (1995)
^bMap position of the primers based on the published sequence of Jasper strain (Duncan & Dobos 1986) (GenBank # M18049)

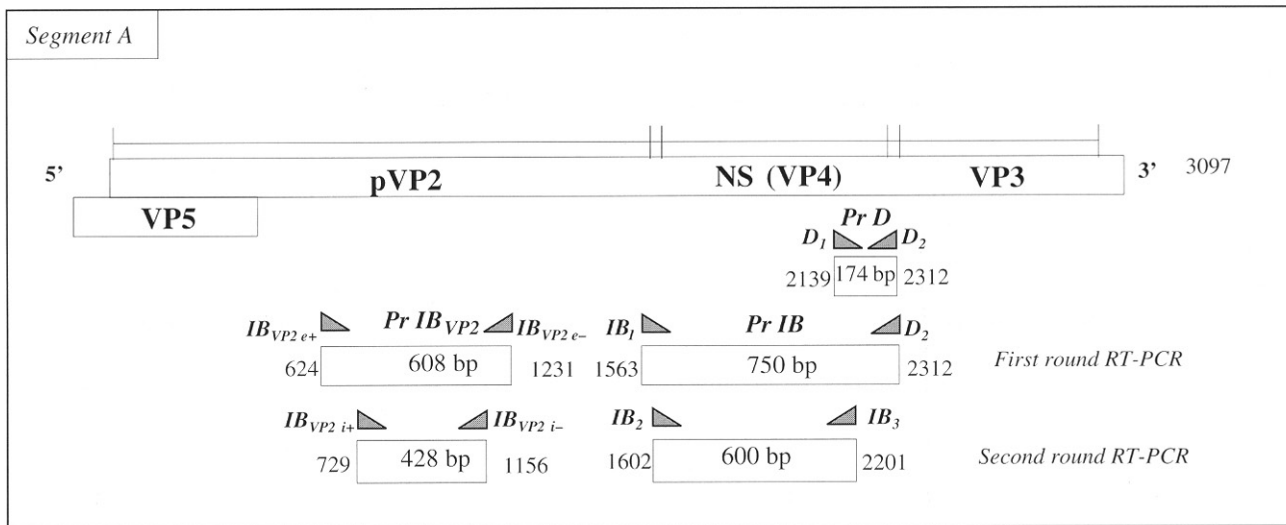


Fig. 1. Map of the genome segment A with the relative locations of the target sequences for primer sets Pr D, Pr IB and Pr IB_{VP2}, according to the published sequence of Jasper strain (Duncan & Dobos 1986, Dobos 1995) (GenBank # M18049)

by Blake et al. (1995), was used to confirm that the isolates under study were aquatic birnaviruses. Primer sets Pr IB and Pr IB_{VP2}, employed for sequencing, were selected on the basis of published sequences of the genome segment A of the West Buxton (GenBank # AF342727) and Dry Mills (GenBank # AF343571) strains (Blake et al. 2001). In addition, to amplify a sufficient quantity of DNA for direct sequencing, we designed a nested-PCR using 2 pairs of primers (external and internal).

Release of viral RNA and RT-PCR amplification was performed as previously reported by Huang et al. (1996), with slight modifications: 100°C for 10 min instead of 95°C for 2 min for the release of RNA, and using 30 cycles instead of 25 in the nested PCR.

PCR products (10 ml) were analyzed on 1.5–2% agarose DNA Grade gels (Fisher Scientific) in TBE buffer (0.89 M Tris, 0.89 M Boric acid, 0.02 M EDTA) at 200 V for 45 min. The gels were stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

DNA sequencing and sequence analysis. Prior to sequencing, the PCR products were purified using the commercial StrataPrep™ PCR Purification kit (Stratagene), following the protocol described by the manufacturer. The purified PCR products were sequenced using *Taq* polymerase-mediated incorporation of dye-labeled dideoxy terminators (ABI Prism™ Big Dye™ Terminator, Cycle Sequencing Ready Reaction Kit). The labelling reaction mixture was purified using Spin-Columns (Sephadex™ G-50 Medium, Amersham Pharmacia Biotech AB). The sample was dried in a vacuum centrifuge, resuspended in 25 µl of TSR (Template Suppression Reagent, Applied Biosystems) and sub-

jected to sequencing in an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). The sequences were obtained by a 310 Data Collection Software, version 3.0, and edited using the Sequence Navigator (Applied Biosystems) program. Deduced amino acid sequences were derived with the DNASTAR (Lasergene) EditSeq computer program. Multiple sequence alignments were performed using DNASTAR (Lasergene) MegAlign program, with suggested parameters of Unweighted Gap penalty of 10 and Gap length penalty of 10. Phylogenetic trees were constructed with the MegAlign program, using a Clustal algorithm. Apart from the main serotypes of IPNV, the marine birnaviruses yellowtail ascites virus (YAV) and blotched snakehead virus (BSV), as well as IBDV, were included with comparative purposes.

Viral nucleic acid analysis. Analysis of genomic electropherotypes was performed as previously described by Cutrín et al. (2000). Reference strains of IPNV Ab, Sp, WB, C1, C2 and Ja were used as controls. Viral RNA from the aquareovirus HBR was included as a molecular weight marker (Dopazo et al. 1992).

Protein analysis. Supernatant fluids from CHSE-214 and EPC cell cultures exhibiting a cytopathic effect (CPE) were collected and centrifuged for 30 min at 1500 × *g*. The supernatants were ultracentrifuged for 90 min at 90000 × *g* and the pellets resuspended in 100 ml of sample buffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1M NaCl). Culture fluid from uninfected cells was also included as a negative control.

Viral proteins were analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to the method of Laemmli (1970) using a 12% polyacry-

lamide gel in a Mini-PROTEAN® II vertical gel electrophoresis system (Bio-Rad), at 200 V for 2 h. Before electrophoresis, samples were mixed 1:1 with 2 × sample buffer and heated at 100°C for 10 min. The Buhl strain of IPNV and non-infected CHSE-214 and EPC cells were included as controls. Polypeptide bands were detected by Coomassie blue staining.

Western blot analysis. Following SDS-PAGE, proteins were transferred to 0.45 mm nitrocellulose sheets (Bio-Rad) at 80 V for 90 min at 4°C, using the buffer system described by Towbin et al. (1979). Western blot analysis was performed using a polyclonal antibody against IPNV obtained from rabbit. The membranes were blocked for 1 h in a solution of 10% milk in PBS at 37°C, washed 3 times (20 min each) with PBS-Tween 20 (0.05%), and reacted with antiserum that was diluted 1:1000 in PBS at room temperature for 2 h on a slow-speed flat-bed orbital shaker. The membranes were washed and then incubated for 1 h at room temperature with anti-rabbit appropriate secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase (Anti-rabbit IgG:AP, adsorbed with Human IgG; Stressgen) diluted 1:1000 with PBS-Tween 20 (0.05%). After washing, the membranes were developed with an AP conjugate substrate (Bio-Rad) at room temperature for 5 to 20 min.

CsCl density gradient centrifugation. Fluids from CHSE-214 cell cultures exhibiting CPE were collected and centrifuged for 30 min at 3 000 × *g*. The supernatant was ultracentrifuged for 90 min at 90 000 × *g*, and the pellets resuspended in 500 ml Hanks' balanced salt solution and sonicated for 30 sec at 20 Kcal. The samples were placed on the top of a discontinuous CsCl gradient: 40, 30 and 20% CsCl in 1 × SSC, and centrifuged at 115 000 × *g* for 22 h at 4°C in a swinging bucket rotor (Beckman SW 50.1). Virus bands were readily located by light scattering and collected from each gradient separately. The refractive indices were measured using a refractometer (Bausch & Lomb) and the density computed from tables. These fractions were then ultracentrifuged in a Beckman TLA 45 rotor at 125 000 × *g* for 1 h at 4°C. The pellets were resuspended in 100 ml of sample buffer (1M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA) and analyzed by electron microscopy and by SDS-PAGE.

Electron microscopy (EM). In total, 20 µl of the resuspended pellets were adsorbed to parlodion-film, carbon-coated 400 mesh copper grids. The adsorbed material was then stained with 2% (w/v) phosphotungstic acid (pH 6.09) and visualized by transmission electron microscopy (TEM, Philips CM 12). Immunogold EM was performed by the method of Novoa (1996), using IPNV-specific antiserum as above.

RESULTS

Identification of the viral isolates by RT-PCR

All of the isolates were confirmed to be aquatic birnaviruses by means of RT-PCR using the Pr D primer pairs, which yielded amplification products of the expected size of approximately 174 bp (Fig. 2).

Nucleotide sequences and phylogenetic analysis

Alignment of the sequences of the 174 bp fragment of the NS gene obtained by PCR amplification using primer set Pr D showed that the sequences were identical among the isolates and with published sequences of the same region of the NS gene of the Dry Mills (DM) and WB reference strains.

On the basis of these initial results, and in order to detect minor differences among the new isolates, a larger fragment of 600 bp, corresponding to most of the NS gene, was amplified by nested RT-PCR using primer sets Pr IB, and sequenced (GenBank accession numbers: AY542856 to AY542863). Of the new isolates, only one, isolate 9R3, showed a minor difference (1 nucleotide per 600 bp) from the remaining isolates, which were identical to each other and to the reference strain DM over this larger region of the NS gene.

For analysis of a region of the VP2 gene, a 428 bp fragment was amplified and the sequence of a 370 bp internal region was compared (GenBank accession numbers: AY542851 to AY542855). The analysis of

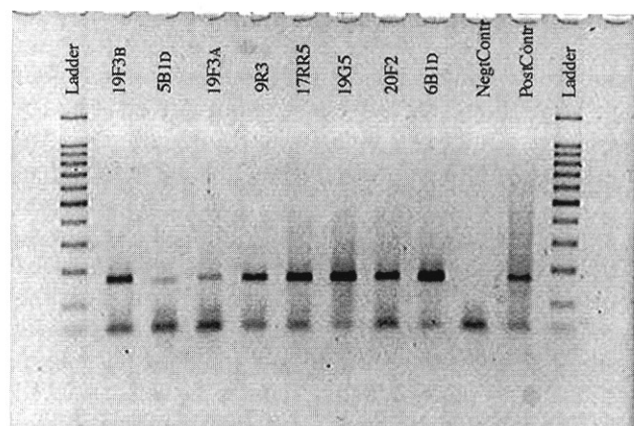


Fig. 2. Identification of the FC isolates by RT-PCR, employing the primer set Pr D. The amplification product showed the expected size around 174 bp. NegtContr: negative control (distilled water as template for PCR). PostContr: positive control (genome of IPNV WB as template for PCR). Ladder: molecular weight markers (100 DNA Ladder, Invitrogen; from bottom to top: 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, and 1500 bp)

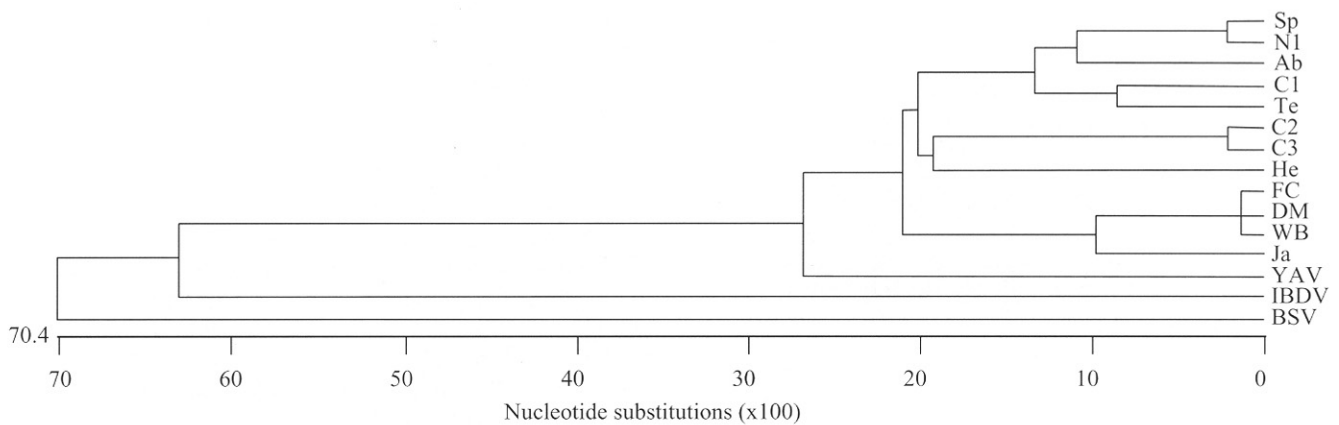


Fig. 3. Phylogenetic tree, based on the analysis of a 389 nt region, that encodes a portion of the VP2 protein, showing the relationship between our isolates (represented by FC) and the main serotypes of IPNV. YAV, BSV and IBDV were used as outgroups. The nucleotide sequence accession numbers are: AF343571 (DM); AF342727 (WB); M18049 (Ja); AF342728 (Sp); L40580 (Ab); AF342730 (He); AF342731 (Te); AF342732 (C1); L40581 (C2); AF342734 (C3); D0071 (N1); ABO11440 (YAV); AJ459382 (BSV); NC004178 (IBDV)

sequence pair distances (data not shown) indicates that the 9R3 isolate had a 100% nucleotide identity with the DM isolate, and 99.4% with the WB isolate. Lower percentages were obtained with the published sequences of the remaining IPNV reference strains. The 19G5 isolate (as representative of the isolates showing a 100% nucleotide sequence identity with DM in the NS gene) showed a slightly lower identity with DM (99.7%) and WB (99.2%). In terms of amino acid sequences all the new isolates were identical to the homologous region of the DM strain and 99.2% identical to WB. The phylogenetic tree, based on the nucleotide sequence of this fragment of the hypervariable region of VP2 (Fig. 3), showed that the FC isolates and the WB-type reference strains belong to the same cluster. The Jasper isolate was the next most closely related strain to our isolates. Isolates representing the remaining serotypes showed a much lower relationship to the FC isolates. As expected IBDV, YAV and BSV were widely separated from the other isolates analyzed.

Nucleic acid and protein analysis

When viral genomic RNA segments were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis, all the FC'99 isolates appeared identical, showing an extremely narrow profile (Fig. 4). The larger genome segment (A) had an estimated molecular weight of 2.06 MDa and the smaller genome segment (B) of 1.93 MDa. The pattern formed by the genome segments did not correspond with any of the reference strains of IPNV included in this study.

A total of 4 viral proteins having approximate molecular weights of 90, 50, 25 and 20 KDa could be distinguished from normal cellular proteins in polyacrylamide gels (Fig. 5A). No differences were detected among the protein profiles of the isolates when concentrated crude virus from CHSE-214 infected cells was used. On the contrary, when EPC cells were infected, only isolates 19F3_B and 17R5 showed the typical 4-band pattern (Fig. 5B).

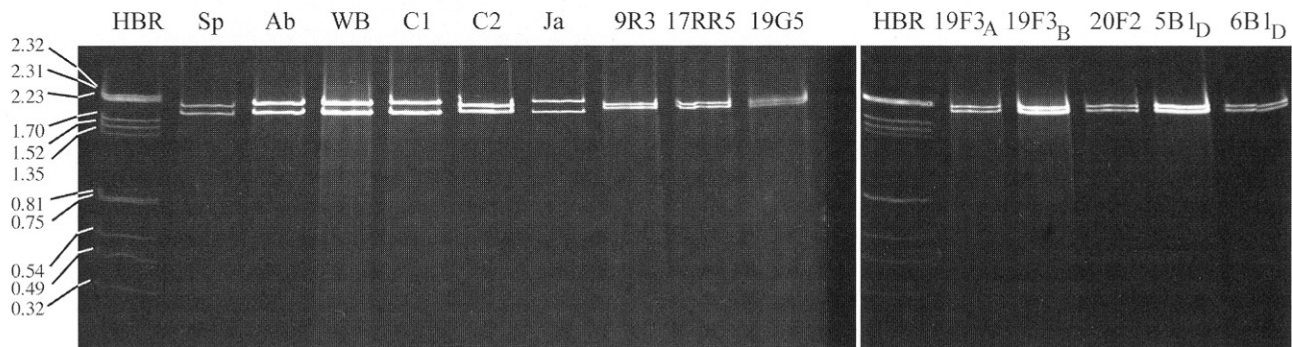


Fig. 4. Comparison of RNA patterns of FC'99 birnavirus isolates in 7.5% SDS-PAGE. RNA segments of the aquareovirus HBR (Dopazo et al. 1992) were included as molecular weight markers (data expressed as MDa)

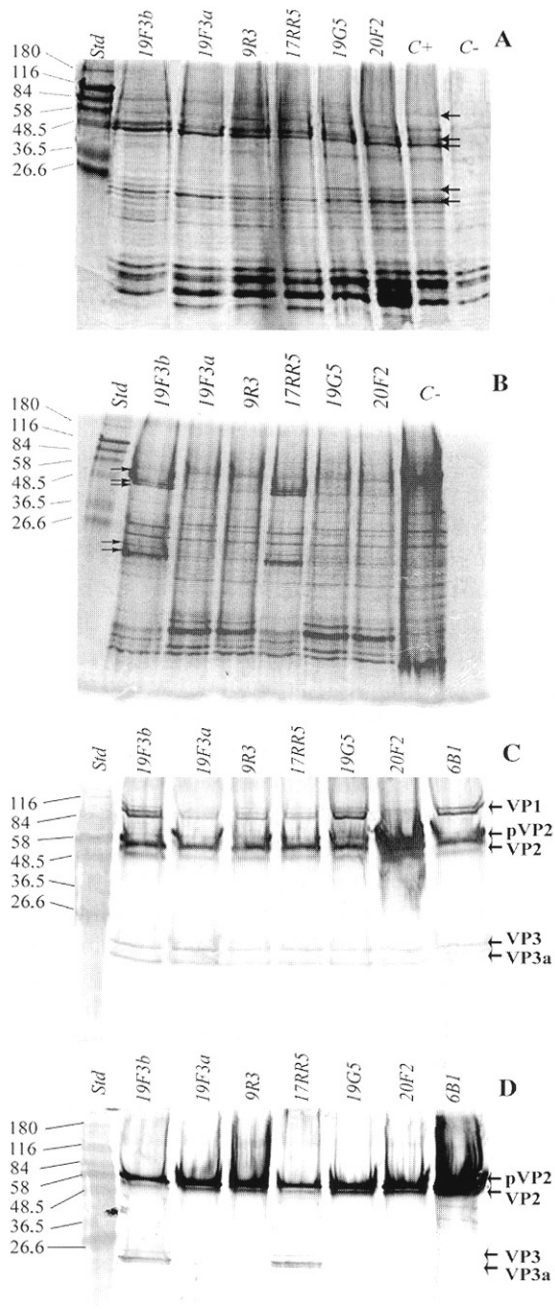


Fig. 5. Protein content of viral isolates. (A) Protein profile of viruses concentrated from CHSE-214 infected cells (C+: positive control, corresponding to the protein profile of the reference strain Buhl concentrated from CHSE-214 infected cells; C-: negative control, consisting of protein profile from non-infected CHSE-214 cells), and (B) protein profile of viruses concentrated from EPC infected cells; both gels were stained with Coomassie blue (C-: negative control, consisting of non-infected EPC cells). (C) Western blot assay applied to viral proteins obtained from CHSE-214 infected cells; (D) Western blot assay applied to viral proteins obtained from EPC infected cells. (Std: molecular weight markers shown in kDa) Arrows label the position of proteins VP1, pVP2, VP2, VP3 and VP3a (from top to bottom)

Western blot assays confirmed the viral origin of the proteins from CHSE-214 infected cells by reaction with anti-IPNV polyclonal antiserum (Fig. 5C). Western blots of proteins from EPC infected cells (Fig. 5D) revealed that, whereas the VP3 and VP3a viral proteins were present only in strains 19F3_B and 17R5, pVP2 and VP2 were detected in all the isolates and VP1 was not detected in any isolate. No reaction with the antiserum was observed with CHSE-214 and EPC non-infected cells (data not shown).

Buoyant density and EM

Electron microscopy of the viruses concentrated from infected CHSE-214 cells revealed the presence of icosahedral particles with a diameter of approximately 60 nm (Fig. 6A). In these preparations, a low proportion of tubular structures with a diameter of approximately 55 nm, a length of up to 2 μ m, and appearing to have a helical-like symmetry were also visualized. When the isolates were propagated in EPC cells, most showed the same results by EM, and only isolates 19F3_B and 17R5 showed a high proportion of rigid tubules (Fig. 6C). The tubular structures were demonstrated to react with IPNV-specific antiserum by immunogold staining (Fig. 6E).

Bands of 2 different densities were obtained in CsCl gradients. When viral samples were not subjected to cloning by serial dilution, a visible band corresponding to a density of approximately 1.32 g cm^{-3} was obtained. Visualization of the virus concentrated from this band revealed the presence of typical icosahedral birnavirus-like particles, and only occasionally were tubular structures observed (Fig. 6B). After cloning, 2 bands were obtained, one having the same density as described above, and another having a density in CsCl of approximately 1.30 g cm^{-3} in which a high proportion of tubular structures was observed by EM (Fig. 6D).

Analysis of the protein content of the virus in the fractions collected from the 2 bands was carried out by SDS-PAGE. As shown in Fig. 7, the material from the band having a density of 1.32 g cm^{-3} showed the typical IPNV 4-band polypeptide profile with some additional contaminating cellular proteins, as demonstrated in Western blot gels. However, when the 1.30 g cm^{-3} CsCl band was analyzed, only pVP2 and VP2 were seen.

DISCUSSION

Aquatic birnaviruses have a wide host range, infecting many species of fish. Although mainly known as agents affecting farmed salmonids, IPNV and IPNV-like viruses have also been isolated from wild fishes

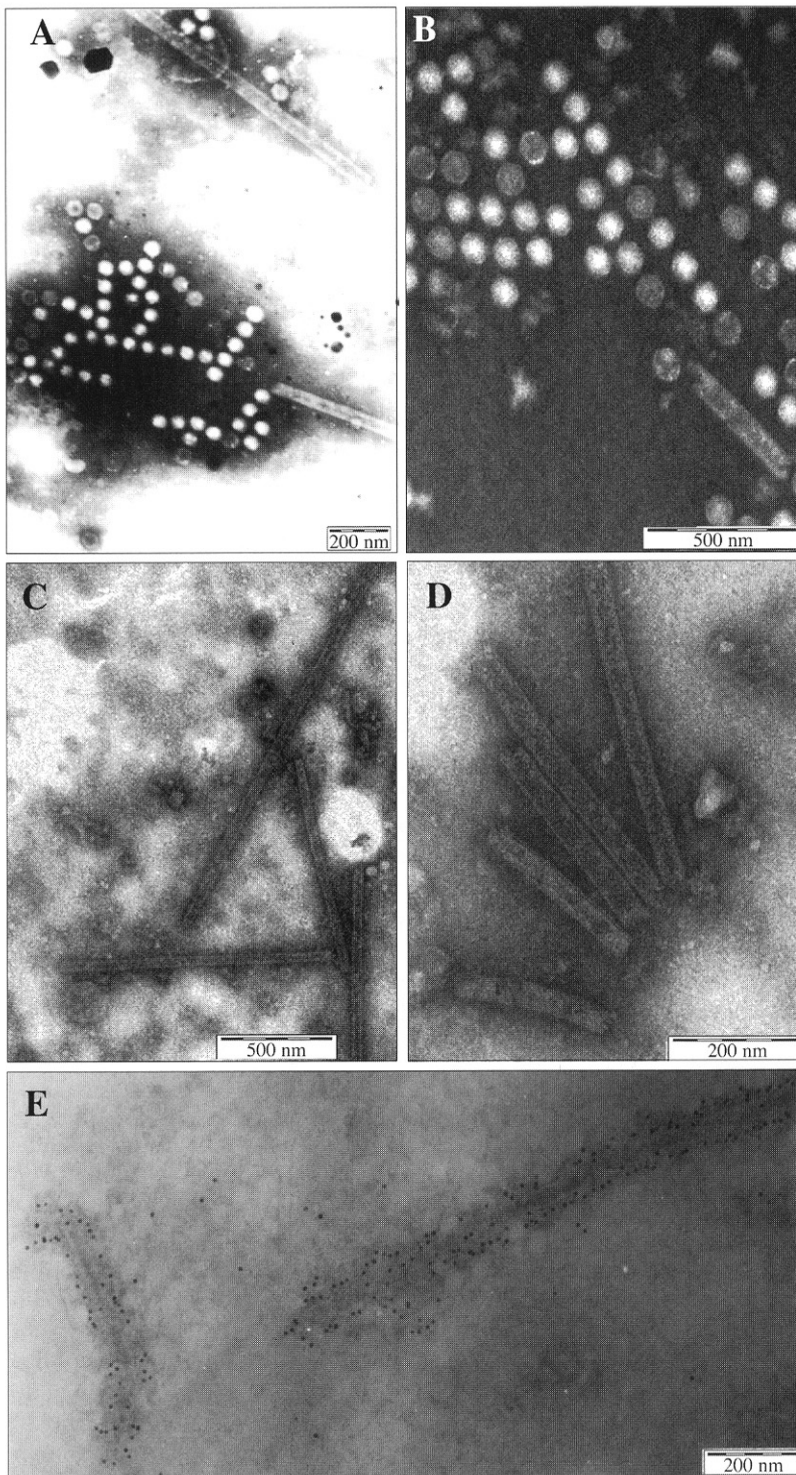


Fig. 6. Electron microscopy of birnavirus isolates. (A) Isolate 9R3 concentrated from CHSE-214 infected cells, showing a majority of icosahedral particles. (B) Isolate 17R5 after cloning by serial dilutions: sub-clone with a density in CsCl of around 1.32 g cm^{-3} , showing a majority of icosahedral particles. (C) Isolate 17R5 concentrated from EPC infected cells, showing a majority of tubular structures. (D) Isolate 17R5 after cloning by serial dilutions: sub-clone with a density in CsCl of around 1.30 g cm^{-3} . (E) Tubular structures labeled by immunogold using anti-IPNV specific antisera

(Hill 1982, Ahne 1985, Wolf 1988). The first isolation of IPNV from feral fish was reported by Sonstergard et al. (1972), who recovered IPNV from asymptomatic white suckers (*Catostomus commersoni*). Munro et al. (1976) reported the detection of IPNV among wild fish in Loch Awe and the virus was also reported from asymptomatic wild Arctic char (*Salvelinus alpinus*) by Souter et al. (1984). Until the 1990s, IPNV was isolated from only a few marine species: Atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) in Maryland, USA (Stephens et al. 1980); Southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) in North Carolina, USA (Helms 1981, McAllister et al. 1983); and wild yellow-tail (*Seriola quinqueradiata*) in Tosa Bay, Japan (Isshiki et al. 1989, Hosono et al. 1996). In 1998, birnaviruses were isolated from cod and herring in the United Kingdom (ICES 1998). In 1999, Mortensen et al. reported the isolation of aquatic birnaviruses from flounder (*Platichthys flesus*) and dab (*Limanda limanda*) from the marine waters surrounding Denmark. The most recent isolations of aquatic birnaviruses from marine species have been from wild flounder (*Rhombosolea tapirina*), cod (*Pseudophycis* sp.), spiked dogfish (*Squalus megalops*) and ling (*Genypterus blacodes*) during routine sampling in Australia (Crane et al. 2000), and from flounder (*Paralichthys olivaceus*), Japanese horse mackerel (*Trachurus japonicus*) and dark banded rockfish (*Sebastes inermes*) in Japan (Watanabe et al. 2002). The isolations from marine fish seem to constitute a separate genogroup, as recently demonstrated (Zhang & Suzuki 2003).

Our laboratory, in collaboration with the Instituto de Investigaciones Mariñas (CSIC) and the Instituto Español de Oceanografía (IEO) (Vigo, Spain), has participated in 2 research campaigns carried out at the Flemish Cap, a fishery located in international waters, close to the Canadian Atlantic coast, and where fishing is regulated by the Northwest Atlantic Fisheries Organization (NAFO). From these studies, both birnaviruses and viral hemorrhagic sep-

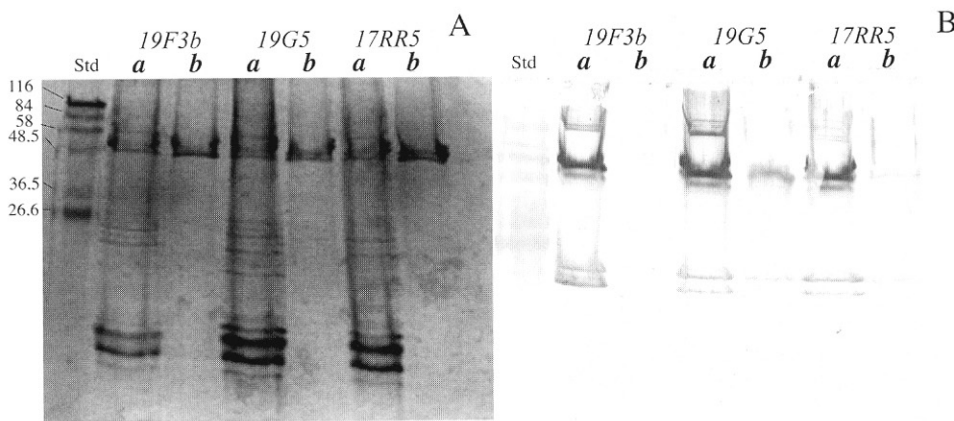


Fig. 7. SDS-PAGE gel showing the protein content of the viral particles constituting the fractions corresponding to densities 1.32 g cm^{-3} (lanes **a**) and 1.30 g cm^{-3} (lanes **b**) in CsCl gradient centrifugation. (A) Coomassie blue stained gel, (B) Western blot assay

ticemia virus (VHSV) have been isolated from different species of wild fish (Bandín et al. 1997, Dopazo et al. 2002). In the first campaign at the Flemish Cap in 1994 (FC'94), IPNV-like viruses were isolated from Atlantic cod (*Gadus morhua*), Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*), American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) and witch flounder (*Glyptocephalus cynoglossus*) (Bandín et al. 1997). From the 1999 campaign, viruses having the typical birnavirus morphology were isolated (Romero-Brey et al. 2002) and their identity confirmed by RT-PCR in the present study.

Results from nucleotide sequencing demonstrated that the FC isolates were closely related or identical to each other. The new isolates were also closely related to the American reference strains DM and WB (representing serotype A1), both originally isolated from trout in Maine, USA (Leintz & Springer 1973). This result was likely due to the geographic proximity of the Flemish Cap fishery to the Atlantic coast of the USA. In addition, it indicates a clear relatedness between IPNV isolates from aquaculture settings and from wild marine populations as reported for other fish viruses (Stone et al. 1997, Dixon 1999).

Interestingly, when the electropherotypes (EFT) of the viral genome segments of the FC isolates were analyzed, no similarity to any of the reference strains used was observed. Nevertheless, comparison with the electropherogroups (EGs) described by Cutrín et al. (2000) suggests the narrow pattern obtained for the FC isolates best corresponds to isolate EG6 related to the Ja strain. This does not agree with the results we obtained from sequence analysis, and Cutrín et al. (2003) have recently reported that the use of EFTs is not advised for typing of aquatic birnaviruses, as the results are not consistent with those obtained from serotyping, restriction fragment length polymorphism (RFLP), or sequencing.

The proteins in concentrated virus preparations were typical of IPNV-type proteins in their sizes and electrophoretic pattern. Moreover, they reacted with

the anti-IPNV polyclonal antiserum in Western blots, further confirming the identity of the isolates. It was interesting that 2 distinct protein patterns were obtained for the different isolates when the viruses were cultured in EPC cells. Electron microscopy showed the presence of a high proportion of tubular structures in the preparations of those isolates having only the pVP2 and VP2 type proteins. This result suggested the approach of cloning of selected strains by serial dilution and attempting to separate the tubular structures from the typical IPNV-icosahedral particles. This strategy enabled us to discover 2 important features of the tubules: (1) they have slightly lower density (1.30 g cm^{-3}) than icosahedral particles (1.32 g cm^{-3}) in CsCl, and (2) they are constructed principally (or exclusively) from pVP2 and VP2-type proteins. Because cloning could never eliminate the icosahedral particles, presence of the tubules appeared to be strictly dependent upon the presence of the complete birnavirus particles.

The shape and size of the tubules we observed resembled those described in other aquatic birnaviruses (Moss & Gravell 1969, Kudo et al. 1975, Novoa 1996, Espinoza et al. 2000). Similar structures have also been detected, and extensively studied, in infectious bursal disease virus (IBDV), a birnavirus from the genus *Avibirnavirus* (Granzow et al. 1997b). In this sense, the tubules described in the present report would be similar to those termed type I tubules by Granzow et al. (1997a) in IBDV, and Espinoza et al. (2000) in IPNV. Those tubules would be constructed exclusively from a precursor of the VP2 viral protein (Martínez-Torrecuadrada et al. 2000), probably due to a lack of maturation of the pVP2 form to the VP2 (Chevalier et al. 2002). However, the results from the present study indicate that both forms of that protein are incorporated in construction of the tubules.

Some authors have suggested that the VP3 would act as a scaffolding protein, which would be essential for the 'closing' of the tubular structures into icosahedral

capsids, as well as for the maturation of pVP2 into VP2 (Martínez-Torrecuadrada et al. 2000, Chevalier et al. 2002). Considering that the tubules can be propagated in cell culture but cannot be completely separated from the IPNV-typical icosahedral forms by cloning and that cloning appeared to enhance the ratio of tubular structures in selected preparations, it may be possible that many of the virus particles in preparations having a high proportion of tubular structures contain some kind of mutation resulting in a failure to produce an active VP3 polypeptide.

Whether or not a mutation in the genome is the mechanism to explain the generation of the tubules is under research at present, and will be the subject of a further report.

Acknowledgements. Inés Romero Brey thanks Julia Franke and people from the Western Fisheries Research Center (WFRC), Seattle, USA, for their helpful support during her stay there. This work was supported by grants MAR99-0637-C02-01 from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (DGSIC), ACU01-010/2001/PC159 from Ministerio de Ciencia y Tecnología, and PGIDIT02BTF23501PR from the Secretaría Xeral de I+D, Xunta de Galicia. This is Scientific Contribution no. 001/2003 of the Instituto de Acuicultura.

LITERATURE CITED

- Ahne W (1985) Virusinfektion bei Fischen: ätiologie, diagnose und bekämpfung. *Zbl Vet Med B* 32: 237–264
- Bandín I, Silva A, Oliveira JG, Cutrín JM, Dopazo CP, Barja JL (1997) Virus in marine wild fish. In: Proc VIIIth Int Conf Dis Fish and Shellfish, Sep 14–19, Edinburgh. European Association of Fish Pathologists, p 1
- Blake SL, Schill WB, McAllister PE, Lee MK, Singer JT, Nicholson BL (1995) Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J Clin Microbiol* 33: 835–839
- Blake SL, Ma JY, Caporale DA, Jairath S, Nicholson BL (2001) Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis Aquat Org* 45:89–102
- Caswell-Reno P, Lipipun V, Reno PW, Nicholson BL (1989) Utilization of a group-reactive and other monoclonal antibodies in an enzyme immunodot assay for identification and presumptive serotyping of aquatic birnaviruses. *J Clin Microbiol* 27:1924–1929
- Chevalier C, Lepault J, Erk I, Da Costa B, Delmas B (2002) The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J Virol* 76: 2384–2392
- Christie KE, Ness S, Djupvik HO (1990) Infectious pancreatic necrosis in Norway; partial serotyping by monoclonal antibodies. *J Fish Dis* 13:323–327
- Crane MSJ, Hardy-Smith P, Williams LM, Hyatt AD and 5 others (2000) First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia. *Dis Aquat Org* 43:1–14
- Cutrín JM, Oliveira FG, Barja JL, Dopazo CP (2000) Diversity of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish and reservoirs in Northwestern Spain. *Appl Environ Microbiol* 66:839–843
- Cutrín JM, Barja JL, Nicholson BL, Blake S, Dopazo CP (2004) Restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) and sequence analysis: an approach for genotyping IPNV reference strains and other aquabirnaviruses isolated from Northwestern Spain. *Appl Environ Microbiol* 10:1059–1067
- Dixon PF (1999) VHSV came from the marine environment: clues from the literature, or just red herrings? *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 19:60–65
- Dobos P (1976) Size and structure of the genome of the infectious pancreatic necrosis virus. *Nucleic Acids Res* 3: 1903–1919
- Dobos P (1995) The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annu Rev Fish Dis* 5:25–54
- Dobos P, Hill BJ, Hallett R, Kells DTC, Becht H, Teninges D (1979) Biophysical and biochemical characterization of 5 animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol* 32:593–605
- Dopazo CP, Toranzo AE, Roberson BS, Baya A, Hetrick FM (1992) Antigenic relationships among rotaviruses isolated from fish. *J Fish Dis* 15:27–36
- Dopazo CP, Bandín I, López-Vazquez C, Lamas L, Noya M, Barja JL (2002) Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus from Greenland halibut *Reinhardtius hippoglossoides* caught in the Flemish Cap. *Dis Aquat Org* 50: 171–179
- Duncan R, Dobos P (1986) The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucleic Acids Res* 14: 5934
- Duncan R, Nagy E, Krell PJ, Dobos P (1987) Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J Virol* 61:3655–3664
- Espinoza JC, Hjalmarsson A, Everitt E, Kuznar J (2000) Temporal and subcellular localization of infectious pancreatic necrosis virus structural proteins. *Arch Virol* 145:739–748
- Granzow H, Birghan C, Mettenleiter TC, Beyer J, Köllner B, Mundt E (1997a) A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *Virology* 8879–8885
- Granzow H, Weiland F, Fichtner D, Enzmann PJ (1997b) Studies on the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. *J Fish Dis* 20: 1–10
- Håvarstein LS, Kalland KH, Christie KE, Endresen C (1990) Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other *Birnaviridae*. *J Gen Virol* 71: 299–308
- Helms RF (1981) Pamlico River flounder fish kill (an investigation). North Carolina Dept Nat Resour Commun Develop p. 1–28
- Hill BJ (1982) Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In: R. J. Roberts (ed) *Microbial disease of fish*. Academic Press, London, p 91–114
- Hill J, Way K (1995) Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic Birnaviruses. *Annu Rev Fish Dis* 5:55–77
- Hjalmarsson A, Carlemalm E, Everitt E (1999) Infectious pancreatic necrosis virus: identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2. *J Virol* 73: 3484–3490
- Hong JR, Gong HY, Wu JL (2002) IPNV VP5, a novel anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression. *Virology* 295:217–229
- Hosono N, Suzuki S, Kusuda R (1996) Genogrouping of bir-

- naviruses isolated from marine fish: A comparison of VP2/NS regions on genome segment A. *J Fish Dis* 19: 295–302
- Huang C, Chien MS, Landolt M, Batts B, Winton JR (1996) Mapping the neutralizing epitopes on the glycoprotein of infectious haematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *J Gen Virol* 77:3033–3040
- Huang MTF, Manning DS, Warner M, Stephens EB, Leong JC (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
- ICES (1998) Report of the working group on pathology and diseases of marine organisms. Gdynia Poland March 3–7 1998. ICES CM 1997/F:7
- Isshiki T, Kawai K, Kusuda R (1989) Incidence of yellowtail ascites virus (YAV) in wild yellowtail fingerling. *Nippon Suissan Gakkaishi* 55:633–637
- Kudo S, Kurosaya D, Kunimine I, Nobusawa K, Kobayashi S (1975) Ultracytochemical observations on the ultrastructure of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus. *Jap J Ichthyol* 21:203–212
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
- Lannan CN, Winton JR, Fryer JL (1984) Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. In: *In Vitro* [In Vitro] 20:107–114
- Leintz JC, Springer J (1973) Neutralization test of IPNV with polyvalent antiserum. *J Wildl Dis* 9:120–124
- Magyar G, 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
- Manning DS, Leong JC (1990) Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 179:16–25
- Martínez-Torrecuadrada JL, Caston JR, Castro M, Carrascosa JL, Rodríguez JF, Casal J (2000) Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins. *Virology* 278:322–331
- McAllister PE, Newman MW, Sauber JH, Owens WJ (1983) Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from Southern flounder, *Paralichthys lethostigma*, during an epizootic. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 3:37–38
- McAllister PE, Owens WJ, Ruppenthal TM (1987) Detection of infectious pancreatic necrosis virus in pelleted cell and particulate components from ovarian fluid of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Dis Aquat Org* 2:235–237
- Mortensen HF, Heue OE, Lorenzen N, Otte L, Olensen NJ (1999) Isolation of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Res* 63: 95–106
- Moss LH, Gravell M (1969) Ultrastructural and sequential development of infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol* 3:52–58
- Müller H, Scholtissek C, Becht H (1979) The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of doubled stranded RNA. *J Virol* 44:384–392
- Munro ASL, Liversidge J, Elson KGR (1976) The distribution and prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in wild fish in Loch Awe. *Proc R Soc Edinb (B) (Nat. Environ.)* 75:223–232
- Nagy E, Duncan R, Krell P, Dobos P (1987) Mapping of the large RNA genome segment of infectious pancreatic necrosis virus by hybrid arrested translation. *Virology* 158: 211–217
- Nicholson BL (1993) Use of monoclonal antibodies in identification and characterization of fish disease. In: F. Hetrick and M. Faisal (eds) *Annu rev fish dis*. Pergamon Press, New York, p 241–257
- Novoa B (1996) Immunogold technique applied to electron microscopy of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Pathol* 31:141–143
- Özel M, Gelderblom H (1985) Capsid symmetry of viruses of the proposed birnavirus group. *Arch Virol* 84:149–161
- Romero-Brey I, Bandín I, Dopazo CP, López-Vázquez C, Silva A, Barja JL (2002) What viruses can be found in wild fish? A preliminary study. In: *Proc 5th Int Symp Viruses of Lower Vertebrates*, Aug 27–30, Seattle, p 48
- Schwanz-Pfützer I, Özel M, Darai G, Gelderblom H (1984) Morphogenesis and fine structure of eel virus (Berlin), a member of the proposed birnavirus group. *Arch Virol* 81: 151–162
- Sonstergard RA, McDermott LA, Sonstergard KS (1972) Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from white suckers (*Catostomus commersoni*). *Nature* 236:174–175
- Souter BW, Dwilow AG, Knight K (1984) Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from asymptomatic wild Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.). *J Wildl Dis* 20: 338–339
- Stephens EB, Newman MW, Zaczary AL, Hetrick FM (1980) A viral aetiology for the annual spring epizootics of Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus* (Latrobe) in Chesapeake Bay. *J Fish Dis* 3:387–398
- Stone DM, Way K, Dixon PF (1997) Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicemia (VHS) viruses from different geographical areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus morhua* L.). *J Gen Virol* 78: 1319–1326
- Teninges D, Ohanessian A, Richard-Molard C, Contamine D (1979) Isolation and biological properties of Drosophila X virus. *J Gen Virol* 42:241–254
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350–4354
- van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop HL, Carstens EB and 7 others (2000) Virus taxonomy. In: 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York, NY
- Watanabe L, Pakingking R, Iida H, Nishizawa T, Yoshisuke I, Arimoto M, Muroga K (2002) Isolation of aquabirnavirus and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild marine fishes. *Fish Pathol* 37:189–191
- Wolf K (1988) Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press, Ithaca, NY
- Zhang CX, Suzuki S (2003) Comparison of the RNA polymerase genes of marine birnavirus strains and other birnaviruses. *Arch Virol* 148:745–758

Sequencing of both genomic segments of aquabirnaviruses isolated from wild fish demonstrates existence of coinfection and natural reassortment

Romero-Brey¹, I., Vakharia, V. N.² and Dopazo, C. P.¹

¹ Unidade de Ictiopatoloxía. Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía. Instituto de Acuicultura. Universidade de Santiago de Compostela. 15782. Spain.

² Center for Biosystems Research, University of Maryland Biotechnology Institute and VA-MD Regional College of Veterinary Medicine, College Park, MD, 20742 USA.

Corresponding author: Carlos P. Dopazo. Tel: (+34) 981 563100 ext 16051; Fax: (+34) 981 547165; e-mail: mpdopazo@usc.es

Running title: Coinfection and Natural Reassortment in Birnaviruses

No. of words in Summary: 224

No. of words in the main text: 3728

Total no. of words (pages 1 to 20): 4937.

Total no. of figures (2) and tables (3): 5

Summary

In this study we report the sequencing of the whole genome (including the 5' and 3' non-coding regions of both segments A and B) of 7 birnavirus strains isolated from wild fishes living at the Flemish Cap (FC) fishery (Newfoundland). From the analysis and comparison of the sequences, most of the FC isolates were clustered with the North American reference strains West Buxton (WB), Dry Mill and Jasper. One of the strains has been included in the same genotype as the European strain Ab. In addition, at least in one case cohabitation of both type strains in one single individual fish has also been demonstrated. These results clearly suggest the existence of a double source for the presence of these viruses in that population of wild fish: first, the prevalence of the American type is easily explained by the close proximity of this fishing bank to the American coast whereas, although surprising, the presence of the European type strain could be due to migration of some species from European areas. Finally, in one of the strains segment A and Segment B sequences have been typed differently (WB and Ab types, respectively). These important findings evidence the existence of natural reassortment between both strains of aquabirnaviruses in a host, which can be an expected step after the demonstrated cohabitation of two IPNV strains in one fish.

INTRODUCTION

The aquatic birnavirus are the largest and most antigenically diverse group belonging to family *Birnaviridae*, which includes viruses from many species of fish and invertebrates. The virus that causes the infectious pancreatic necrosis (IPN) in fish, the IPNV virus, is the prototype species, and has been widely studied due to its high pathogenicity and repercussion in Aquaculture.

Members of this group have 2 segments of doubled-stranded RNA, and a naked single-layer icosahedral capsid approximately 60 nm in diameter. The larger genome segment A (around 3.2 kb) contains two partially overlapping open reading frames (ORFs). The largest (ORF PP) encodes a 106 kDa polyprotein (5' pVP2-NS-VP3 3') which, by co-translational cleavage and further maturation, generates the structural proteins VP2, VP3 and VP4 (Huang et al., 1986; Duncan et al., 1987; Nagy et al., 1987; Manning & Leong, 1990). Segment A also encodes the VP5, a 17 kDa arginine-rich protein, from a small ORF preceding and partially overlapping the ORF PP (Håvarstein et al., 1990). Although this protein is not present in the virion, it is detected in IPNV-infected cells (Magyar & Dobos, 1994), and could be involved in the regulation of the host apoptosis-off system for enhancing progeny production (Hong et al., 2002). The smaller genome segment B (2.9 kb) contains one ORF that encodes VP1, a protein of 90-110 kDa considered to be an RNA-dependent RNA polymerase responsible for the replication and transcription of the viral genome.

Although typing of aquabirnaviruses had been traditionally based on serological relationships establishing the existence of 10 serotypes (Hill & Way, 1995), genotyping has been demonstrated to be a powerful tool for typing new isolates (Heppell et al., 1993; Hosono et al., 1996; Blake et al., 2001; Cutrín et al., 2004). Recently, Cutrín et al. (2004) proposed the establishment of 6 genogroups with a clear correspondence with the recognized 10 serotypes as follows: genogroup I has 2 genotypes named I.1 and I.2 corresponding to serotypes A9 (type

strain: Jasper [Ja]) and A1 (West Buxton [WB]), respectively; genogroup II corresponds to serotype A3 (Ab); genogroup III is separated into genotypes III.1 and III.2, corresponding to serotypes A2 (Sp) and B1 (TV-1), respectively; genogroup IV includes type strains Te and C1 (serotypes a5 and A6, respectively), and strains C2 (serotype A7) and C3 (serotype A8) constitute genogroup V; finally, genogroup VI corresponds to serotype A4 (strain Hecht [He]). In addition, a seventh genogroup has been proposed by Zhang and Suzuki (2004) which includes the so named ‘marine birnaviruses’ (MABV).

A marked relationship between typing of aquabirnavirus strains and their geographical origin is widely known. In this sense, the A1 serotype includes most of the isolates from the United States (reference strain: West Buxton; WB). Four serotypes (A6 to A9) occur in Canada (reference strains C1, C2, C3, and Jasper [Ja]), while the remaining four serotypes (A2 to A5) are found principally in Europe (reference strains: Sp, Ab, Hecht [He] and Tellina [Te], respectively). Isolates related to the Ab, Sp or WB types have also been found in Asia and South America (Reno, 1999).

In the present study, we report the complete sequencing of both genomic segments of a number of strains of aquabirnaviruses isolated from wild fish at the Flemish Cap (Newfoundland). From the interpretation of the results, some interesting data have been extracted not only related with the geographical origin of those strains.

METHODS

Viruses and cells

The birnavirus strains subjected to genome sequencing were previously isolated from the Flemish Cap, a fishery located in international waters of the Canadian coast, and where fishing is regulated by NAFO (Romero-Brey et al., 2003). Those strains were: 6B1_A and 5B1_D, isolated from Atlantic cod (*Gadus morhua*); 17F2 and 19F3_B from Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*); and 19G3_E, 19G7_D and 20G1_D from deepwater redfish (*Sebastes mentella*).

All isolates were propagated at 15°C in chinook salmon embryo (CHSE-214) cells cultures using Eagle's minimum essential medium (EMEM; Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma) and 1% L-Glutamine (200 mM; Sigma).

Analysis of genome electropherotypes.

Analysis of genomic mobilities was performed as previously described by Cutrín et al. (2000). Reference strains of IPNV Ab, Sp and WB were used as controls. Viral RNA from the aquareovirus HBR was included as a molecular weight marker (Dopazo et al., 1992).

Extraction of viral RNA

After extensive cytopathic effect (CPE) appeared, culture fluid from infected CHSE-214 cells grown in 75 cm² flasks were harvested and centrifuged at 16,000 x g for 30 min to remove cellular debris, and the supernatant ultracentrifuged at 100,000 x g for 2 h at 4°C. The pellet was resuspended in 100 µl of diethyl pyrocarbonate-treated water (DEPC-H₂O; Quality Biological, Inc.). The viral suspension was treated with proteinase K (10 mg/ml) for 4 h at 37°C in a 2X proteinase buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 12 mM EDTA, 150 mM NaCl and 1% SDS). The viral RNA was extracted with phenol/chloroform and ethanol precipitated overnight at -20°C, in

presence of 0.3 M Na-Acetate. The pellet was washed with 70% ethanol, centrifuged, dried in a Speedvac (Savant) and resuspended in 15 μ l of DEPC-H₂O. The extracted RNA was checked every time by running on a 1% agarose gel and stored at -80°C before subjected to RT-PCR.

RT-PCR amplification and cDNA sequencing

In case of segment A, 3 pairs of primers were used for RT-PCR amplification: FA5'NC and WAApaR, FASpeF and FASaR, and WA1850F and FA3'NC. For the RT-PCR amplification of segment B, 2 pairs of primers were employed: FB5'NC and VRB1500R, and WBBF and FB3'NC (Table 1). The primers were selected to include the non-coding regions (NCR).

A volume of 4.5 μ l of viral RNA was mixed with 1 μ l of DMSO and 1 μ l of the antisense primer (1 μ g/30 μ l), and heated at 97°C for 7 min. The denatured RNA was added to 23.5 μ l of a reverse transcription mixture containing 10 \times PCR buffer (Applied Biosystems), 25 mM MgCl₂ solution (Applied Biosystems), dNTPs (2.5 mM/each; Applied Biosystems), RNase inhibitor (20 U/ μ l; Applied Biosystems), moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (50 U/ μ l; Applied Biosystems), and the mixture incubated at 42°C for 2 h. After heating at 95°C for 5 min for RT inactivation, the RT product was transferred to a PCR mixture containing 10 \times PCR buffer (Applied Biosystems), 25 mM MgCl₂ solution (Applied Biosystem), forward primer (1 μ g/30 μ l) and Ampli Taq® DNA polymerase (5 U/ μ l; Applied Biosystems), and this mixture subjected to 35 cycles of PCR amplification (denaturation for 30 s at 95°C, annealing for 30 s at 37°C, ramping to 72°C at 0.4°C/s and extension for 1.5 min at 72°C) in a thermal cycler (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc.), ending with a final extension at 72°C for 10 minutes.

PCR products were analyzed on 1% agarose DNA Grade gels (Fisher Scientific) in TBE buffer (0.89 M Tris, 0.89 M Boric acid, 0.02 M EDTA) at 100V for 1 h and the gels were stained

with ethidium bromide (10 mg/ml) and visualized under UV light. Purification of the cDNA was carried out using the QIAquick Gel Extraction Kit from QIAGEN as indicated by the manufacturer, and the purified DNA stored at -20°C until sequencing.

The sequence was determined by the dideoxy chain termination method with an Applied Biosystems automated DNA sequencer at the University of Maryland DNA Sequencing Facility. Multiple-sequence alignment and phylogenetic trees were performed using a Clustal W algorithm, with the software DNASTAR (Lasergene, Inc.) and the suggested multiple alignment parameters (gap penalty (GP) 15 and gap length penalty (GLP) 6.66, for nc sequence comparison; GP 10, GLP 0.2, for aa) and pairwise alignment parameters (GP 15, GLP 6.66, for nc; GP 10, GLP 0.1, for aa). For comparative purposes, nucleotide sequences of reference strains of aquabirnavirus deposited at the GenBank were used: AF078668 (WB Vakharia), AF342727 (WB Blake), AF343571 (DM), M18049 (Ja Dobos), AF342735 (Ja ATCC), AF342729 (Ab), AF342731 (Te), AF342732 (C1), D00701 (N1), AF342728 (Sp), AF342733 (C2), AF342734 (C3) and AF342730 (He), for segment A; AF078669 (WB Vakharia), M58756 (Ja Dobos) and M58757 (Sp Dobos) for segment B. Owing to the sequence of the WB strain submitted by Blake et al. (2001) is slightly different to that by Yao & Vakharia (1998), both have included. The same criterion was used to include the sequence of Ja from the ATCC (Blake et al. 2001) and that reported by Dobos (Duncan & Dobos, 1986). In addition, due to the lack of sequences of segment B from the reference strain Ab, we have also included the sequence of 2 isolates previously typed as Type Ab by Cutrín et al. (2004). Those were isolates 2290 and 24R with accession number AJ489240 and AJ489243, respectively.

RESULTS

Preliminary analysis by electrophoresis of the genomic RNA segment of the 7 IPNV strains under study showed an identical extremely narrow profile in 5 of the FC isolates (Fig 1). No similarity to any of the 3 reference strains included was observed. A different wider profile was obtained with isolates 6B1_A (close to Ab pattern) and 20G1_D (close to Sp).

Accession numbers for the nucleotide sequences obtained for the FC isolates are: AY780918 (5B1_D), AY780919 (6B1_A), AY780920 (17F2), AY780921 (19F3_B), AY780922 (19G3_E), AY780923 (19G7_E), AY780924 (20G1_D), for segment A, and AY780925 (5B1_D), AY780926 (6B1_A), AY780927 (17F2), AY780928 (19F3_B), AY780929 (19G3_E), AY780930 (19G7_E), AY780931 (20G1_D), for segment B.

Most of the FC strains (5B1_D, 17F2, 19F3_B, 19G3_E, 19G7_E and 20G1_D) showed a length of segment A of 3098 nucleotides (3095 nc, in the case of 6B1_A), with a ORF PP 2943 nc long encoding a polyprotein (pVP2-VP4-VP3) of 980 amino acids (aa). Isolate 6B1_A, showed a ORF PP 2919 nc long, encoding a polyprotein of 972 aa. No differences were observed in the ORF VP5, which was 402 nc long and encoded a protein of 133 aa.

Strains 5B1_D, 17F2, 19F3_B, 19G3_E and 19G7_E showed a length of segment B of 2783 nc. We were not able to determine the length of the whole segment B of isolates 6B1_A and 20G1_D since the 3' NCR could not be sequenced. ORF VP1 was 2538 nc long in all FC isolates, and encoded a protein of 845 aa.

As shown in table 2, a high homology between all FC isolates but 6B1_A was observed after comparison of the sequences of the ORF PP (99.0-100%) and the deduced polyprotein (99.5-100%). Lower similarity was observed with the isolate 6B1_A (82.7-83.4% in nc; 78.9-79.1% in aa), which demonstrated to be related to the reference strain Ab (98.7% nc homology, and 97.8% in aa). The remaining 6 FC isolates showed a higher relatedness to the American

reference strains WB (Blake) (98.6-99.3% in nc; 93.0-93.3% in aa), WB (Vakharia) (98.3-98.9% in nc; 99.5-99.6% in aa) and DM (97.6-98.3% nc; 93.4-93.7% aa). Quite similar results were obtained when comparing the ORF VP5 and its deduced protein (data not shown).

Interesting results were obtained when comparing segment B (Table 3). In this case, although 5 isolates (5B1_D, 17F2, 19F3_B, 19G3_E and 19G7_E) still showed high homology with WB, the other 2 (6B1_A and 20G1_D) were more related to the isolates 2290 and 24R employed as reference for Ab type (91.1-91.9% in nc; 98.1-98.7% in aa).

According to the phylogenetic trees obtained (Fig 2), most FC isolates (5B1_D, 17F2, 19F3_B, 19G3_E and 19G7_E) were clustered into the Genogroup I, which comprises reference strains WB and DM. Isolate 6B1_A was included in Genogroup II, corresponding to the Ab type strains. Again, the isolate 20G1_D demonstrated to be composed of segments belonging to 2 different genotypes: genome segment A from genotype I, and segment B from genotype II.

DISCUSSION

The aquatic birnaviruses under study represent a selection from a large number of IPNV-like strains previously reported to have been isolated from different species of wild fish captured during 2 research campaigns at the Flemish Cap, a Newfoundland fishery (Romero-Brey et al., 2003). In a recent study (Romero-Brey et al., 2004), we characterized a pool of isolates from that origin, observing that although all them showed a narrow genomic electropherotype (EFT), related to the Ja strain, the sequencing of a small fragment of segment A related them to the WB and DM type strains (Genotype I.2, as described by Cutrín et al., 2004).

In the present report, we decided to apply sequencing of the complete genome to a new pool of isolates. Among them, 2 isolates had already been included in the previous report, and the remaining 5 were selected according to their genomic EFT: 3 isolates showed the narrow

profile previously described, whereas other 2 (6B1_A and 20G1_D) showed a different profile, closer to the Sp pattern.

Since most of the reports on typing by sequencing analysis are based on the sequence of segment A (Heppell et al., 1993, Hosono et al., 1996; Blake et al., 2001; Cutrín et al., 2004), we decided to first analyze the sequence of this segment of the FC isolates under study, and the results demonstrated that most of them (those showing a narrow RNA mobility pattern, as well as 20G1_D, with a wider pattern) were clustered with the North American strains WB, DM and Ja. In a previous study (Romero-Brey et al., 2004), characterization of other FC isolates resulted in a similar result. In addition, other aquatic birnaviruses isolated from Newfoundland and included in a study by Heppell et al. (1993) were cultured with WB and Ja type strains. The existence of a majority of fish infected with the American type in the Flemish Cap is not surprising due to the close proximity of this fish bank to the North American coast. This finding evidences a relatedness between Aquaculture and wild marine fish populations.

Only isolate 6B1_A was classified as type Ab, a European strain originally isolated from trout in Denmark (Jørgensen & Grauballe, 1971). Although surprising due to the geographical area where the Flemish Cap is located, the presence of this type of IPNV strain could be due to migration of these fish species from the European areas. In this sense, although the scientific council of the NAFO has long considered the Atlantic cod and deepwater redfish populations, as well as other fish species inhabiting this bank, to be isolated, contrasted data nowadays support the idea of a migration hypothesis (Anonymous, 1994; Roques et al, 2002; de Cárdenas, 2004).

Regarding this strain, we must remark an interesting result. Thus, 6B1_A is a clone obtained by serial dilutions from the original fish tissue sample '6B1' from cod. Another clone of this sample (6B1_D) was previously classified as the American type WB by sequencing (Romero-Brey et al., 2004), whereas in the present study clone 6B1_A was included in genotype II, corresponding to the European type Ab. This result indicates that cohabitation of 2 different

strains of this virus in a individual fish is possible, and again supports the hypothesis of a double source of this virus: transmission from continental areas of North America, and migration of fish populations from European areas.

Further sequencing of segment B of these FC isolates confirmed the result obtained from segment A. However, an important discrepancy was observed with one of the isolates. Thus, strain 20G1_D, which was clustered as WB type from the sequence of segment A, showed a Ab type segment B. First at all, these findings suggest the need of knowing the sequence of both genomic segments in order to better characterize and type new isolates. In this sense, most reports on sequencing of IPNV-like viruses are based on the segment A, and quite few segment B sequences are available in the data bases, at least from IPNV reference strains.

More interestingly, these findings also evidence the existence of natural genetic reassortment occurring between different strains of aquabirnaviruses in a host. The reassortant strain 20G1_D would correspond to an American-European reassortant birnavirus generated in a deepwater redfish. Although natural reassortment in birnaviruses has already been demonstrated for infectious bursal disease virus (IBDV) (Brown & Skinner, 1996), to our knowledge this is the first time to be described in aquabirnaviruses. Although the cause of this natural reassortment is easy to explain from the demonstrated existence of cohabitation of both type strains in a single fish, it is risky to speculate on its biological implication. In a study by Sano et al. (1992), reassortment between 2 aquabirnaviruses (IPNV-Buhl and eel European virus [EVE]) was generated in order to determine what segment would be involved in virulence to rainbow trout, demonstrating that segment A was related to cell tropism *in vivo* and virulence. Other authors have reported on the implication of reassortment on diversification of host specificity and virulence (Scholtissek, 1987; Guan et al., 2002; Hatta et al., 2002; Iwamoto et al., 2004). However, in our case no data are available on the virulence of the 2 types of IPNV strains

involved in the present study on the fish species occupying the Flemish Cap fish bank (or related species), which will be the subject for further research.

ACKNOWLEDGEMENTS.

Inés Romero Brey thanks to staff from DNA Sequencing Facility at Center for Biosystems Research, University of Maryland Biotechnology Institute (UMBI), MD (USA), for their technical assistance. This work was supported by grants ACU01-010/2001/PC159 from Ministerio de Ciencia y Tecnología, and PGIDT02BTF23501PR and PGIDIT04RMA261014PR from the Secretaría Xeral de I+D, Xunta de Galicia. This represents Scientific Contribution No 008/2004 of the Instituto de Acuicultura.

REFERENCES

Anonymous (1994). Scientific report of the research campaign Flemish Cap'94. Instituto de Investigacións Mariñas. Vigo. Spain

Blake, S. L., Ma, J.-Y., Caporale, D. A., Jairath, S. & 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.

Brown, M.D. & Skinner, M.A. (1996). Coding sequences of both segments of a European 'very virulent' infectious disease virus. *Virus Research*. **40**, 1-15.

Cutrín J. M., Oliveira, F. G., Barja J. L. & Dopazo C. P. (2000). Diversity of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish and reservoirs in Northwestern Spain. *Appl Environ Microbiol* **66**, 839-843.

Cutrín J. M., Barja J. L., Nicholson B. L., Bandín, I., Blake S. & 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. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1059-1067.

De Cárdenas, E. (2004). Relative isolation of the Flemish Cap cod population. Symposium on the Ecosystem of the Flemish Cap. Dartmouth, Nova Scotia. 8-10 September.

Dopazo, C. P., Toranzo, A. E., Roberson, B. S., Baya, A. & Hetrick, F. M. (1992). Antigenic relationships among rotaviruses isolated from fish. *J Fish Dis* **15**, 27-36.

Duncan, R. & Dobos, P. (1986). The nucleotide sequences of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucleic Acids Res* **14**, 5934.

Duncan, R., Nagy, E., Krell, P. J. & Dobos, P. (1987). Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J Virol* **61**, 3655-3664.

Guan, Y., Peiris, M., Kong, K.F., Dyrting, K.C., Ellis, T.M., Sit, T., Zhang, L.J. & Shortridge, M.F. (2002). H5N1 influenza virus isolated from geese in Southeastern China: Evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to duck. *Virology* **292**, 16-23.

Hatta, M., Halfmann, P., Wells, K. & Kawaoka, Y. (2002). Human influenza A viral genes responsible for the restriction of its replication in duck intestine. *Virology* **295** 250-255.

Håvarstein, L. S., Kalland, K. H., Christie, K. E. & Endresen, C. (1990). Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other *Birnaviridae*. *J Gen Virol* **71**, 299-308.

Heppell, J., Berthiaume, L., Corbin, F., Tarrab, E., Lecomte, J. & Arella, M. (1993). Comparison of amino acid deduced from a cDNA fragment obtained from infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains of different serotypes. *Virology* **195**, 840-844.

Hill, B. J. & Way, K. (1995). Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic Birnaviruses. *Ann Rev Fish Dis* **5**, 5-77.

Hong, J. R., Gong, H. Y. & Wu, J. L. (2002). IPNV VP5, a novel anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression. *Virology* **295**, 17-29.

Hosono, N., Suzuki, S. & Kusuda, R. (1996). Genogrouping of birnaviruses isolated from marine fish: A comparison of VP2/NS regions on genome segment A. *J Fish Dis* **19**, 295-302.

Huang, M. T. F., Manning, D. S., Warner, M., Stephens, E. B. & Leong, J. 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.

Iwamoto, T., Okinaka, Y., Mise, K., Mori, K.-I., Arimoto, M., Okuno, T. & Nakai, I. (2004). Identification of host-specificity determinants in betanodavirus by using reassortants between striped jack nervous necrosis virus and sevenband grouper nervous necrosis virus. *J Virol* **78**, 1258-1262.

Jørgensen, P. E. V. & Grauballe, P. C. (1971). Problems in the serological typing of IPN virus. *Acta Vet Scand* **12**, 145-147.

Magyar, G. & 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.

Manning, D. S. & Leong, J. C. (1990). Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* **179**, 16-25.

Nagy, E., Duncan, R., Krell, P. & Dobos, P. (1987). Mapping of the large RNA genome segment of infectious pancreatic necrosis virus by hybrid arrested translation. *Virology* **158**, 211-217.

Reno, P.W. (1999). Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In *Fish Diseases and Disorders. Vol 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, pp 1-55. Edited by P.T.K. Woo & D.W. Bruno. Bristol, UK: CAB Publishing..

Romero-Brey, I., Bandín, I., Dopazo, C. P. & Barja, J. L. (2003). Isolation of marine birnaviruses from new species of wild fishes. *AFS/FHS Fish Health Newslett.* **31**, 21-23.

Romero-Brey, I., Batts, W. N., Bandín, I., Winton, J. R. & Dopazo, C. P. (2004). Molecular characterization of birnaviruses isolated from wild marine fishes at the Flemish Cap (Newfoundland). *Dis Aquat Org* **61**, 1-10.

Roques, S., Sévigny, J.-M. & Bernatchez, L. (2002). Genetic structure of deep-water redbfish, *Sebastes mentella*, populations across the North Atlantic. *Mar Biol* **140**: 297-307.

Scholtissek, C. (1987). Molecular aspects of the epidemiology of virus disease. *Experimentia* **43**, 1197-1201.

Sano, M., Okamoto, N., Fukuda, H., Saneyoshi, M. & Sano, T. (1992). Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment A). *J Fish Dis* **15**, 283-293.

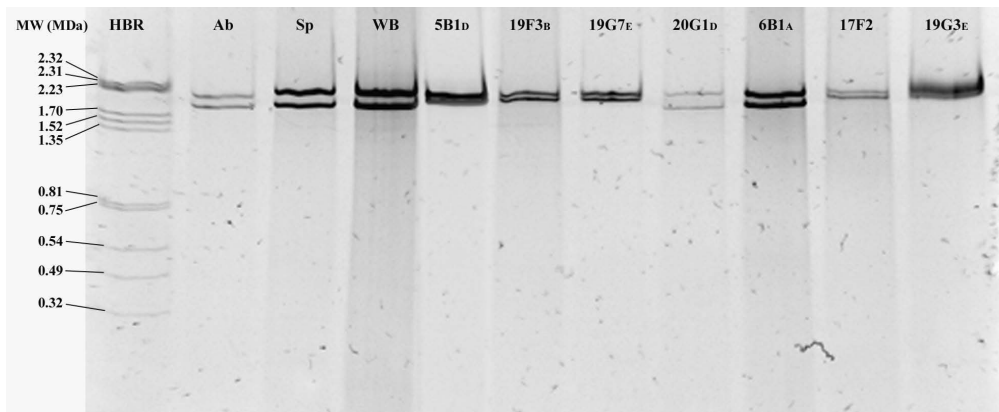
Yao K. & Vakharia V.N. (1998). Generation of infectious pancreatic necrosis virus from cloned cDNA" *J Virol* **72**, 8913-8920.

Zhang, C. X. & Suzuki, S. (2004). Aquabirnaviruses isolated from marine organisms from a distinct genogroup from other aquabirnaviruses. *J Fish Dis* **27**, 633-643.

Table 1. Oligonucleotides used for sequencing.

Segment	Nucleotide sequence	Orientation*	Primer	Position†
A	TAATACGACTCACTATA	+	FA-5'NC	1-18
	GTACCTCCTTGGTGCGATTG	-	WAApaR	711-731
	GGTCCACAACCAACTAGTGA	+	FASpeF	571-591
	CTGAATCAGGTGTGATGC	-	FASalR	2222-2240
	GTCCTATCCTACTTCAAGAAC	+	WA1850F	1850-1870
	GAAGATCTCCCGGGGGGCC	-	FA3'NC	3078-3097
B	TAATACGACTCACTATAG	+	FB5'NC	1-19
	CCGTGGGTCTTCAGCTGAAGATTC	-	VRB1500R	1500-1524
	CAAACGAGGATGGCTCTCCGCGGTACAATC	+	WBBF	1383-1413
	AAGATCTGGGGTCCCT	-	FB3'NC	2767-2783

*.-Orientation of the virus-specific sequence of the primer is shown as sense (+) or antisense (-). †.-The positions where the primers bind are in accordance with the published sequence of West Buxton strain (Yao & Vakharia, 1998).

**Figure 1**

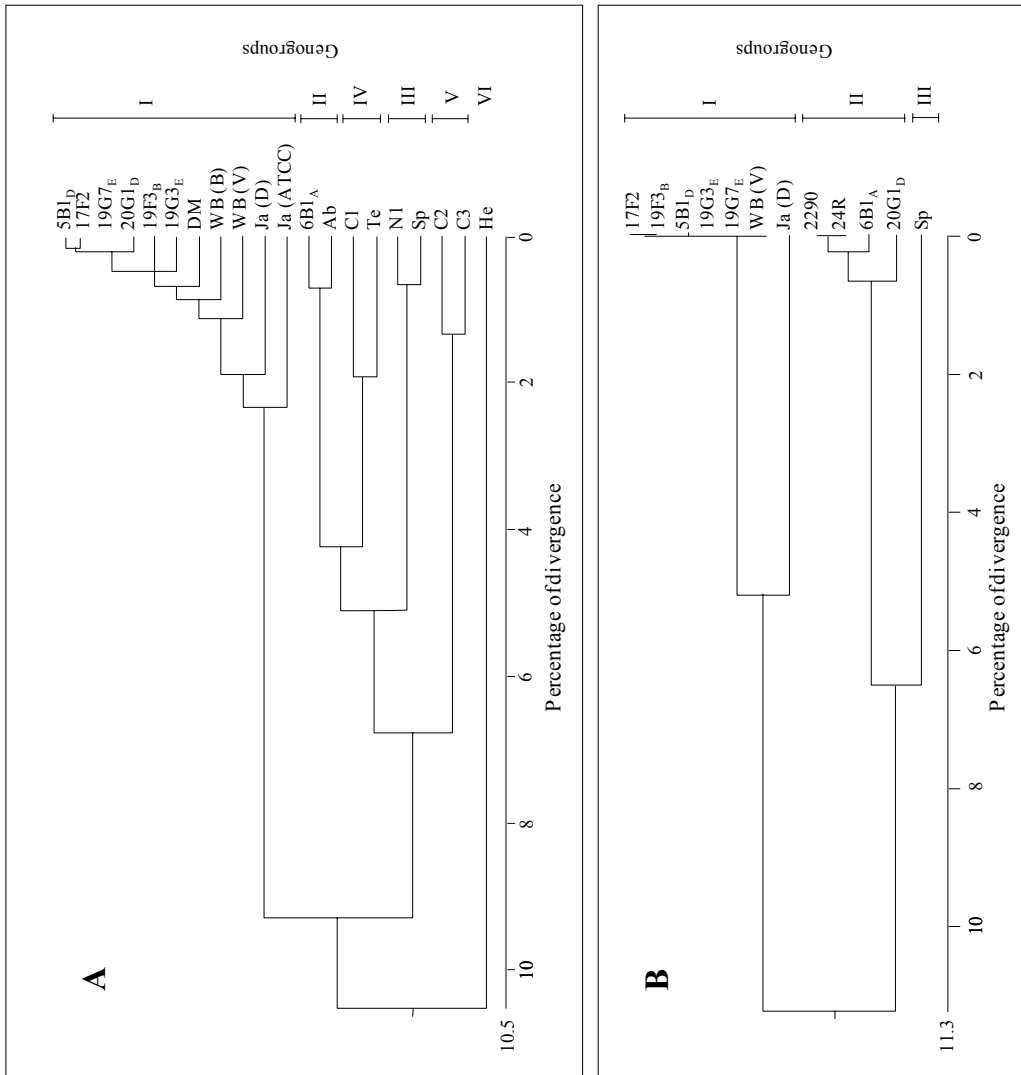


Figure 2

“... science and everyday life cannot and should not be separated. Science, for me, gives a partial explanation of life. In so far as it goes, it is based on fact, experience and experiment...
I agree that faith is essential to success in life... In my view, all that is necessary for faith is the belief that by doing our best we shall come nearer to success and that success in our aims (the improvement of the lot of mankind, present and future) is worth attaining”

Rosalind Franklin

