



TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DE LA RECOMBINACIÓN DE
SEGMENTOS GENÓMICOS DE
BETANODAVIRUS EN LA ADAPTACIÓN
DEL VIRUS A SU HUÉSPED**

Fdo.

Sandra Souto Pereira

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
INSTITUTO DE ACUICULTURA**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015





María Isabel Bandín Matos, Profesora Contratada Doutora do Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía da Universidade de Santiago de Compostela

Como Directora da Tese de Doutoramento titulada “Efecto de la recombinación de segmentos genómicos de betanodavirus en la adaptación del virus a su huésped”

Presentada por Dna. **Sandra Souto Pereira**, alumna do Programa de Doutoramento de Acuicultura,

Autoriza a presentación da tese indicada, considerando que reúne os requisitos esixidos no artigo 34 do regulamento de Estudos de Doutoramento, e que como Director da mesma non incurre nas causas de abstención establecidas na lei 30/1992.

Asdo. Dra. María Isabel Bandín Matos





El trabajo descrito en la presente memoria ha sido financiado por los proyectos *Mejora del bienestar animal y de la supervivencia larvaria en el cultivo de lenguado y rodaballo: análisis del riesgo implicado por la transmisión vertical de ciertos virus patógenos de peces del Plan Galego de Investigación, Desenvolvemento e Innovación Tecnolóxica (Incite) (07MMA001E)* y *Estudio de la patogenicidad de betanodavirus para el rodaballo, el estudio de la interacción virus-huésped y de la influencia de factores ambientales (EM2012/005)* de la Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mi directora de tesis, la Dra. Isabel Bandín Matos, por haber confiado en mí para el desarrollo de este trabajo y por su valiosa ayuda y guía a lo largo de estos años. Me gustaría agradecerle especialmente su disponibilidad para resolver dudas, su gran compromiso en la revisión del manuscrito y su preocupación por buscar los recursos que me permitieron llegar hasta el final.

También me gustaría agradecer al Dr. Carlos Pereira Dopazo por su interés en mi investigación y su orientación durante la realización de la misma. Al Dr. Juan Luis Barja y al resto del grupo de Patología de peces de acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela. A mis compañeros del grupo de Virología del Instituto de Acuicultura: Carmen, Javi y Juanma por transmitirme su experiencia y resolver todas las dudas que iban surgiendo durante el proceso de este trabajo. A Johnny, Noelia y especialmente a Alian por su gran ayuda con los cultivos y el procesado de las muestras. A mis compañeros de doctorado Diego y María con los que compartí experiencias, muchas alegrías y también algunas frustraciones. También quiero acordarme de todos los que pasaron por el laboratorio y que han seguido por otros caminos pero que han dejado un poquito de ellos en este trabajo. A Placeres. A mis compañeros del Instituto de Acuicultura Ana, Amable, Arturo, Bea y Miguel, por ayudarme con la clonación y demás temas de bacterias. A Sol por todos los peces que sembró para mí. A John por revisar el inglés. A Susi por ayudarme con el papeleo.

Me gustaría agradecer al Dr. Michel Brémont que me permitiese realizar la estancia en su laboratorio de la que guardo muy buenos recuerdos y durante la cual aprendí muchísimo. Gracias al Dr. Stéphane Biacchesi y a Emilie Merour por su dedicación y simpatía. También a Annie y Joulie por acompañarme en todo momento en el laboratorio. Y a Angella, Lela, Khalid, Janez, Clara y Jordi por hacer que mi estancia en Jouy fuera además muy divertida.

Me gustaría agradecer el apoyo recibido por del grupo de Patologías de Especies Acuícolas Cultivadas de la Universidad de Málaga, al Dr. Juan José Borrego, a la Dra. Dolores Castro, la Dra. Mari Carmen Alonso, la Dra. Esther García-Rosado y el Dr. Benjamín López-Jimena por dedicarme su tiempo y por permitirme pasar unos días en su laboratorio, también gracias a Dani, Patricia y Fani por su hospitalidad durante mi breve estancia en Málaga.

Gracias a Ana Riaza y Stolt Sea Farm por suministrarme los peces.

A mis amigos que nunca fallan: Bea, Marta, Sharay, Silvia, Juan, María, Sanguel y Villa por cuidarme, animarme e inspirarme siempre. A Alicia y a mis amigas de facultad especialmente a Sandrita (al final lo conseguimos!). También a Ana, Moncho y mis amigos de Milladoiro siempre dispuestos a una estrella y a unas risas. A mi Reinaldito.

A Óscar por acompañarme siempre, por aguantar mis nervios y hacerme olvidar las preocupaciones. También a mi familia adquirida Vane, Charly, Moncho, Jaime, Lupe y Paco por vuestro cariño y alegría.

Y por encima de todo gracias a mi hermana Berta, a mis padres Carmen y Manuel y a mis abuelos que me han animado a avanzar, me han apoyado siempre y son los responsables de que haya llegado hasta aquí.





A mi familia







ÍNDICE





ÍNDICE

SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	9
1. Introducción	9
2. Virus de la necrosis nerviosa (NNV)	18
2.1. Antecedentes.....	18
2.2. Propiedades biofísicas de NNV.....	19
2.3. Taxonomía y filogenia.....	21
2.4. Epidemiología: breve revisión.....	25
2.5. Signos clínicos de la enfermedad.....	29
2.6. Diagnóstico de betanodavirus.....	30
3. Interacciones virus-huésped en NNV	35
3.1. Especificidad de huésped.....	35
3.2. Transmisión.....	36
3.3. Tropismo.....	37
3.4. Replicación viral.....	38
3.5. Betanodavirus y ciclo celular.....	40
3.6. Prevención y control de la enfermedad.....	42
4. La recombinación en virus	45
5. En este trabajo	47
OBJETIVOS	51
AIMS	55
CAPÍTULO 1	
Comparación de la susceptibilidad del lenguado senegalés a la cepa recombinante y genotipos parentales.	
CHAPTER 1	
<i>Comparison between the susceptibility of Senegalese sole to a reassortant strain and to the parental strains.</i>	
1. Introducción	59
2. Materiales y métodos	62
2.1 Línea celular.....	62
2.2 Cepas virales y propagación viral.....	62
2.3 Titulación viral.....	63

2.4 Aclimatación y manejo de los peces.....	63
2.5 Procesado de las muestras.....	65
2.6 Extracción del ARN viral.....	65
2.7 Transcripción inversa (RT).....	66
2.8 Amplificación por PCR.....	67
2.9 Cuantificación del genoma viral mediante PCR cuantitativa a tiempo real.....	67
2.10 Titulación de partículas víricas infectivas.....	68
2.11 Análisis de la replicación en cerebro durante los primeros días de infección.....	68
2.12 Análisis estadístico.....	70
3. Resultados	71
3.1 Análisis de mortalidad.....	71
3.2 Análisis de replicación en cerebro.....	73
3.3 Análisis de partículas infectivas en cerebro.....	74
3.4 Relación número de copias y título viral.....	75
3.5 Carga viral en distintos tejidos durante los primeros días de infección.....	77
4. Discusión	80
PAPER 1	87

CAPÍTULO 2

Caracterización de determinantes de virulencia en betanodavirus.

CHAPTER 2

Characterization of molecular determinants of virulence in betanodavirus.

1. Introducción	99
2. Materiales y métodos	103
2.1 Virus y células.....	103
2.2 Determinación de extremos.....	103
2.3 Construcción de plásmidos.....	109
2.4 Transfección en células BSRT7/5.....	113
2.5 Obtención de nuevos recombinantes.....	114
2.6 Inmunofluorescencia indirecta.....	115
2.7 Curva de crecimiento de los diferentes virus.....	116
2.8 Análisis de la virulencia de los recombinantes <i>in vivo</i>	116
2.9 Caracterización de la replicación <i>in vivo</i>	119
2.10 Análisis estadístico.....	119

3. Resultados	121
3.1 Construcción de ADNc.....	121
3.2 Recuperación de virus recombinantes.....	122
3.3 Curvas de crecimiento <i>in vitro</i> de los virus recombinantes.....	126
3.4 Comparación de la virulencia <i>in vivo</i> entre la cepa salvaje y la cepa recombinante rSs160.03.....	126
3.5 Comparación de la virulencia entre la cepa salvaje y los recombinantes con mutaciones puntuales.....	127
3.6 Carga viral en el cerebro durante los primeros días de la infección.....	129
4. Discusión	130
PAPER 2	137

CAPÍTULO 3

Susceptibilidad del rodaballo (*Scophthalmus maximus*) a betanodavirus y análisis de determinantes de especificidad de huésped y virulencia.

CHAPTER 3

*Experimental susceptibility of turbot (*Scophthalmus maximus*) to betanodavirus and analysis of host-specificity and virulence determinants.*

1. Introducción	149
2. Materiales y métodos	151
2.1 Virus y células.....	151
2.2 Infecciones experimentales.....	151
2.3 Análisis virológico.....	153
2.4 Identificación del virus.....	153
2.5 Cuantificación del genoma viral.....	154
2.6 Predicción de la estructura secundaria.....	154
3. Resultados	155
3.1 Infección experimental 1. Susceptibilidad a Ss160.03 a 18 °C y 16 °C.....	155
3.2 Infección experimental 2. Comparación entre la susceptibilidad del rodaballo a la cepa recombinante y a una de genotipo SJNNV.....	156
3.3 Infección experimental 3. Comparación entre la susceptibilidad a la cepa wSs160.03 y las cepas recombinantes derivadas I.....	157
3.4 Infección experimental 4. Comparación entre la susceptibilidad a la cepa wSs160.03 y las cepas recombinantes derivadas- II. Ensayo de mortalidad y replicación.....	160
3.5 Predicción de la estructura secundaria.....	163
4. Discusión	164

CAPÍTULO 4

Influencia de la temperatura en la infección del lenguado por betanodavirus.

CHAPTER 4*Influence of temperature on betanodavirus infection in Senegalese sole.*

1. Introducción	193
2. Materiales y métodos	197
2.1 Cepa viral y propagación.....	197
2.2 Infecciones experimentales.....	197
2.3 Procesado de las muestras y aislamiento viral.....	198
2.4 Cuantificación del genoma viral mediante PCR cuantitativa atiempo real (RT-qPCR).....	199
2.5 Análisis estadístico.....	199
3. Resultados	200
3.1 Infección 1. Infección por baño y cohabitación a 22 °C, 18 °C y 16 °C.	200
3.2 Infección 2. Infección a baja temperatura (16 °C).....	202
3.3 Infección 3. Efecto del incremento de la temperatura en la susceptibilidad del lenguado.....	203
4. Discusión	206
PAPER 4	211
GENERAL DISCUSSION	219
CONCLUSIONES	233
CONCLUSIONS	237
BIBLIOGRAPHY	241
APÉNDICE	279



SUMMARY





Nervous necrosis virus (NNV), genus *Betanodavirus*, can infect a wide range of marine farmed and wild fish species as well as some freshwater fish and invertebrates. This virus is the aetiological agent of viral nervous necrosis (VNN), also known as viral encephalopathy and retinopathy (VER). Fish affected with this pathology commonly display lesions in the central nervous system, with vacuolization and necrosis observed in the brain, retina and spinal cord, leading to a range of neurological signs such as abnormal swimming behaviour, anorexia and changes in colouration. Betanodaviruses are small non-enveloped virus and possess a two single-stranded positive-sense RNA genome. The largest segment of 3.1 kb, RNA1, encodes the RNA-dependent RNA polymerase, whereas RNA2 (1.4 kb) encodes the capsid protein (Cp). In addition, a subgenomic RNA (RNA3) is transcribed from the 3' end of RNA1.

Based on the phylogenetic analysis of a variable region within the RNA2 segment (T4 region), betanodaviruses have been clustered into four genotypes: Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus (BFNNV), Redspotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV), Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV) and Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus (TPNNV). However, the isolation of reassortant strains between RGNNV and SJNNV genotypes has been increasingly reported in recent years in the South of Europe. Most of the reassortant strains composed of RGNNV-type RNA1 and SJNNV-type RNA2 segments have been isolated from Senegalese sole (*Solea senegalensis*), an important farmed fish in our area.

To date, there has been no information about the susceptibility of Senegalese sole to different NNV genotypes and the information on the pathogenesis and host specificity of reassortant betanodavirus is scarce. This PhD dissertation entitled ***Effect of reassortment on betanodavirus host adaptation*** was conducted with the aim to better understand the involvement of reassortment in betanodavirus infection in Senegalese sole and it focuses on three main issues: pathogenicity and host specificity, putative determinants of virulence within the capsid protein sequence and the influence of temperature on viral infection. Studies regarding pathogenicity, host specificity and virulence determinants were performed also in turbot because this fish species is closely farmed to sole in our area. The thesis manuscript consists of four chapters.

In the first chapter, entitled *Comparison between the susceptibility of Senegalese sole to a reassortant strain and to the parental strains*, sole juveniles were experimentally challenged

with a reassortant RGNNV/SJNNV strain and isolates from RGNNV and SJNNV genotypes by two different ways (bath and intramuscular injection). In addition, we investigated the differences in the early stages of infection between the three isolates. In both cases, the viral RNA production and viral infectivity of the 3 betanodavirus strains was assessed. The results demonstrated that Senegalese sole is highly susceptible to all the NNV isolates tested (100% mortality was achieved in all experimental infections). However, the reassortant strain provoked the most acute symptoms, and caused mortality more quickly, especially in the bath challenge. The RGNNV/SJNNV isolate also showed less difference between the number of RNA copies and viral titre, reaching the highest titres of infective viral particles in the nervous tissue of infected animals. After the immersion challenge, both SJNNV-capsid strains were detected as early on as day 1 post-infection in the brain, even though only the Ss160.03 strain increased the viral load until the end of the experiment. The RGNNV strain was not detected in the brain until 4 d.p.i., but after 10 days this strain reached the highest viral load. However, RGNNV must experiment a reduction in its infective particle production capacity later on, because viral titers obtained from dead fish throughout the experimental infection were very low. The results obtained in this chapter suggest that the reassortant isolate is the most suited for infecting Senegalese sole.

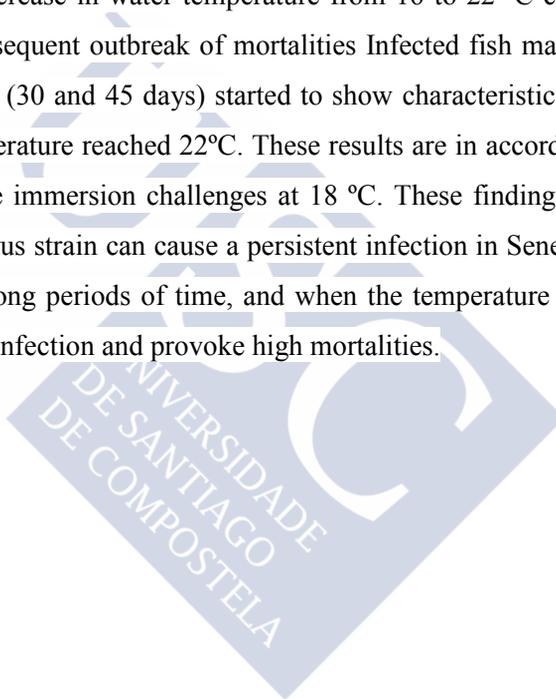
It has been previously reported that betanodavirus reassortant strains isolated from Senegalese sole exhibited a modified SJNNV capsid amino acid sequence, with two amino acid changes at positions 247 and 270. In the second chapter entitled *Characterization of molecular determinants of virulence in betanodavirus*, we investigated the possible role of these two residues as putative host and virulence determinants in betanodavirus reassortant strains. Recombinant viruses harbouring mutations in the coat protein sequence were generated by reverse genetics. The mutagenesis involved one nucleotide change per amino acid substitution: TCG to GCG leading to the substitution of serine to alanine at amino acid position 247 [S247A] and AGT to AAT resulting in a substitution of serine to asparagine at residue 270 [S270N]. The three recombinant strains, rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀, and rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ were studied in cell culture and *in vivo* experiments in the natural fish host, Senegalese sole. The three mutant viruses were shown to be infectious and able to replicate in E-11 cells, reaching final titres similar to the wild-type virus, although with somewhat slower replication kinetics. When the effect of the amino acid substitutions on virus pathogenicity was evaluated in sole, typical clinical signs of betanodavirus infection were observed in all

groups. However, fish mortality induced by all three mutant viruses was clearly affected. Roughly 40% of the fish survived in these 3 groups in contrast to the wild-type virus which killed 100% of the fish. The results obtained in this chapter demonstrated that these two residues of the capsid protein located in the C-terminal region (247 and 270) of the reassortant Ss160.03 play a major role in betanodavirus pathogenicity for sole.

In previous chapters the high susceptibility of sole to betanodavirus was demonstrated. As Betanodavirus interspecies transmission has been previously reported, the aim of the third chapter, entitled *Experimental susceptibility of turbot (*Scophthalmus maximus*) to betanodavirus and analysis of host-specificity and virulence determinants* was to assess the susceptibility of turbot to the reassortant isolate Ss160.03, originated from Senegalese sole. A SJNNV type strain was also included in the study for comparative purposes. In addition, the three recombinant Ss160.03-derived strains (rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ and rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀) obtained in chapter 3 were used in experimental infections in order to investigate the possible role of amino acids 247 and 270 in host specificity and virulence. The effect of stress on viral replication in the brain was also studied. Fish were challenged at 16 and 18°C. Moderate mortalities at 18 °C were caused by the reassortant strain Ss160.03 (up to 50%), 30% higher than that caused by SJNNV strain at 18 °C. At 16°C, low mortalities were observed in both groups. The recombinant strains which bear the mutation of each amino acid (S247A or S270N) had a slight effect on the mortality of turbot juveniles (a 10% reduction in both cases) in the experimental challenge. The Ss160.03 strain showed the highest capacity to replicate in brain tissues (it was detected from day 5 to 30 p.i. and reached the highest viral load with a peak of 10⁹ viral copies/g). The mutant rSs160.03₂₇₀ was detected from 10 d.p.i. and the mutants rSs160.03₂₄₇ and rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ were not detected in the brain until 15 d.p.i. and 20 d.p.i., respectively. In contrast with the results obtained in Senegalese sole in chapter 3, the mutation of both positions reduced mortality by more than half of that observed in fish challenged with the wild strain. In addition, two important facts were demonstrated: firstly, an important mortality decrease was observed by reducing rearing temperature in turbot and secondly stress increased the replication of betanodavirus in the nervous tissues.

Finally, it has been reported that the genetic diversity among betanodavirus strains reflects the existence of different viral phenotypes which may be adapted to infect different host species and/or to replicate at different temperatures. The aim of the fourth chapter, entitled

Influence of temperature on betanodavirus infection in Senegalese sole, was to investigate the effect of decreasing temperatures on betanodavirus infection in Senegalese sole. Sole juveniles were experimentally infected with the reassortant betanodavirus strain used in previous chapters at three different temperatures: 22 °C, 18 °C and 16 °C by bath challenge and cohabitation. The results obtained showed that virus virulence decreased by reducing the water temperature. At 22 °C mortalities reached 100%, at 18 °C they ranged from 75 to 80% and at 16 °C only 8% of the fish died. In addition, horizontal transmission was demonstrated regardless of the rearing temperature. At 16 °C, active viral replication was detected up to 66 days post-infection, but no signs of the disease were observed and only a very low level of mortality was recorded. The increase in water temperature from 16 to 22 °C caused a quick rise in the viral load and a subsequent outbreak of mortalities. Infected fish maintained at 16 °C for different periods of time (30 and 45 days) started to show characteristic clinical signs and mortalities before the temperature reached 22°C. These results are in accordance with the high mortalities obtained in the immersion challenges at 18 °C. These findings demonstrate that this reassortant betanodavirus strain can cause a persistent infection in Senegalese sole at low temperatures (16 °C) for long periods of time, and when the temperature increases, the virus is able to trigger an acute infection and provoke high mortalities.





INTRODUCCIÓN GENERAL



1. INTRODUCCIÓN

El gran aumento de la demanda de pescado como alimento saludable para el consumo humano y la sobreexplotación de los bancos pesqueros han impulsado en las últimas décadas la expansión de la acuicultura. Desde el año 2000, se ha observado un crecimiento constante de la producción mundial de pescado en cultivo, registrándose una tasa media de crecimiento anual del 6,2 %. Se calcula que en el mundo se cultivan más de 354 especies de peces, con una producción acuícola estimada de 70,5 millones de toneladas en 2013 (FAO, 2014). Los peces producidos en cultivo supusieron el 42,2 % del total de pescado consumido en el año 2012, muy por encima del 13,4 % registrado en el año 1990. En Europa la acuicultura, aunque con un nivel inferior al de otras regiones, también ha registrado una tendencia al alza, con una tasa media de crecimiento anual del 2,9 % en el período 2000-2012. China es actualmente el país con más repercusión en este sector y su producción representa el 55,2% a nivel mundial. En los próximos años se espera que la piscicultura siga esta progresión y las previsiones indican que llegará a suministrar más del 60 % del pescado para consumo humano en 2030 (FAO, 2014).

En España se registró el mayor volumen de producción en acuicultura de la UE con una producción de 264.162 t (21,0% del total de la UE) y por un valor de 395 millones (10,4% del valor obtenido en la UE) en 2012. Sin embargo, el incremento en la producción de peces en acuicultura ha disminuido en los últimos años, mientras empieza a tener un gran peso la importación de pescado procedente de otros países en los que los costos de producción son relativamente bajos. Se están haciendo grandes esfuerzos para dar un nuevo impulso a este sector aunque la acuicultura española se enfrenta a retos como la adaptación de normativas, que a menudo presenta incompatibilidades entre legislaciones autonómicas, nacionales y europeas, las trabas administrativas para la obtención de autorizaciones y permisos y las limitaciones derivadas de la gestión sanitaria en temas de uso de terapéuticos, entre otros (APROMAR, 2014).

La intensificación de la acuicultura implica grandes esfuerzos encaminados a mejorar las condiciones de cultivo de las especies producidas, asegurar la sostenibilidad de la industria, la seguridad y el respeto al medio ambiente, lo que ha llevado a los diferentes países productores a establecer normas y reglamentos que controlen estos aspectos.

Uno de los problemas más importantes a los que se enfrenta la acuicultura mundial, tanto marina como continental, es el impacto de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias, parásitos y virus. Las condiciones de cultivo en alta densidad, así como el transporte de especies debido al comercio son responsables de la fragilidad de estos sistemas frente a los agentes patógenos que presentan una alta capacidad de transmisión entre individuos en contacto.

Los virus son responsables de numerosas epizootias asociadas con altas mortalidades, así como de patologías crónicas de baja intensidad que retrasan el crecimiento de los peces o producen malformaciones externas que hacen que sean menos atractivos para el consumidor. Además, en la actualidad, los recursos para el control de estas enfermedades son muy reducidos debido a que no existen tratamientos efectivos. Por todo ello, se considera a las patologías virales como uno de los problemas con mayor impacto y repercusión en el cultivo mundial de peces.

Existe una gran diversidad de agentes virales que pueden causar epizootias en distintas especies de peces, a continuación se realiza una breve descripción de las principales familias de virus que dan lugar a patologías con relevancia clínica en peces de acuicultura, incluyendo sus características principales y su clasificación taxonómica según el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, 2014):

Familia *Alloherpesviridae*

Dentro de la familia *Alloherpesviridae*, orden *Herpesvirales*, los virus que afectan a peces se encuentran incluidos en los géneros *Cyprinivirus*, *Ictalurivirus* y *Salmonivirus*. Estos virus de genoma ADN bicatenal, de gran tamaño y morfología cuasiesférica, se relacionan con problemas clínicos serios y mortalidad, también se ha visto que en muchas ocasiones están asociados a crecimientos hiperplásicos o neoplásicos de la piel (Hedrick y Sano, 1989) y se caracterizan por producir infecciones latentes.

El primer aislamiento de virus de esta familia se produjo en pez gato *Ictalurus punctatus* (Wolf y Darlington, 1971). Posteriormente han sido aislados de numerosas especies como son: anguila, sardina, rodaballo y salmón. Sus efectos difieren mucho en función del tipo de virus, se ha descrito enfermedad hemorrágica, exoftalmia y hemorragias en la base de las aletas en pez gato (*Ictalurid herpesvirus 1*, comúnmente llamado CCV del inglés *Channel*

cat fish virus), oncogenia y ulceración de la piel en salmónidos (*Salmonid herpesvirus 2*) y enfermedad sistémica subaguda (*Salmonid herpesvirus 1*). Dentro de este grupo de virus destacan el **koi herpesvirus (KHV)**, nombre común de la especie *Cyprinid herpesvirus 3*, que se ha detectado en carpa común (*Cyprinus carpio carpio*), la carpa koi, la carpa fantasma (*Cyprinus carpio goi*) y en híbridos de esas variedades, en las que se han descrito altas mortalidades, (Hedrick y col., 2000) en los peces afectados se observa necrosis en braquias, enoftalmia, úlceras en la piel, producción excesiva de mucus y hemorragias en las aletas (Sano y col., 2011). También se han descrito brotes de patologías en anguilas cultivadas y salvajes en Asia y Europa (*Anguillid herpesvirus 1, HVA*) ocasionando apatía, hemorragias y ulceraciones en piel y mortalidades del 10% en anguila europea (Haenen y col., 2002), este virus se asocia también con patología de los filamentos branquiales (Lee y col., 1999), se ha visto además una gran prevalencia del HVA en poblaciones naturales de anguilas (Bandín y col., 2014).

Familia Paramyxoviridae

Esta familia está formada por virus que poseen un genoma formado por una única molécula de ARN monocatenal de polaridad negativa (Fernández Muñoz y Melero, 2006). Son virus envueltos, pleomórficos que presentan espículas que recubren su superficie. Dentro de la subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Aquaparamyxovirus*, el ***Paramyxovirus de salmón atlántico (ASPV)*** se ha descrito en salmones, donde produce el síndrome de branquias con inflamación proliferativa (Kvellestad y col., 2003). En Galicia se ha descrito también como agente etiológico de mortalidades en rodaballos (*Scophthalmus maximus*) procedentes de piscifactorías (Cepeda y col., 1993).

Familia Rhabdoviridae

La familia *Rhabdoviridae* es, junto con la familia *Birnaviridae*, el grupo que incluye un mayor número de aislados y tiene una mayor repercusión económica en la acuicultura. Se trata de virus envueltos con una característica forma de bala que poseen genoma de ARN de cadena sencilla no segmentado. El genoma tipo de esta familia codifica 5 proteínas estructurales que incluyen la nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), glicoproteína de superficie (G) y la polimerasa viral (L) (Tordo y col., 2005). Dentro de la familia destaca el género *Novirhabdovirus* que incluye 4 especies virales que afectan a peces

denominadas ***Virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV)***, ***Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV)***, ***Hirame rhabdovirus (HIRRV)***, y ***Snakehead rhabdovirus (SHRV)***. Los miembros de este género destacan por sintetizar una proteína no estructural, la proteína NV (“non-virion”) que se expresa en células infectadas (Purcell y col., 2012). El VHSV es endémico en Europa y se asocia principalmente a enfermedades en salmónidos, y especialmente a trucha arcoíris, aunque se ha podido aislar en numerosas especies marinas a lo largo del Hemisferio Norte (Skall y col., 2005). El virus afecta principalmente el riñón de peces infectados originando necrosis en el tejido hematopoyético (Smail y Snow, 2011). El IHNV es uno de los mayores patógenos que afecta a salmónidos cultivados., llegando a provocar un 90% de mortalidad (Bootland y Leong, 2011). En un primer momento se localizó en piscifactorías de la costa Oeste de Estados Unidos, extendiéndose más tarde por el Norte de América, Asia y Europa (OIE, 2012). Este virus, al igual que el VHSV, ha supuesto grandes pérdidas económicas debido a las medidas de control de la enfermedad tomadas por las autoridades en base a la legislación comunitaria que restringen el movimiento de peces infectados y obligan a la destrucción total de stocks afectados.

El HIRRV fue aislado por primera vez en 1986 en falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*) (Kimura y col., 1986), este virus afecta a principalmente a esta especie de alto valor económico en Japón aunque también se ha detectado en ayu (*Pleuroglossus altivelis*) y salmónidos. El SHRV fue aislado de un brote infeccioso en cabeza de serpiente cabrío (*Channa striata*) en Tailandia (Kasornchandra y col., 1992) y se ha detectado exclusivamente en especies cultivadas en regiones del Noroeste del Pacífico.

Además hay que destacar dentro de la familia *Rhabdoviridae* el ***Virus de la viremia primaveral de la carpa (SVC)***. Esta especie, incluida recientemente en el género *Sprivivirus*, es responsable de mortalidades en varias especies de carpa, como carpa común, carpa koi y carpa dorada (*Carassius auratus*). Son virus muy contagiosos y que dan lugar a patologías severas, los signos clínicos característicos son cambios en el comportamiento, oscurecimiento de la piel, abdomen hinchado, exoftalmia, hemorragias en piel y agallas, petequias en la pared de la vejiga natatoria y en el músculo esquelético, anemia y branquias pálidas (Ahne y col., 2002). Presenta una distribución amplia que incluye Europa, Asia, Norte de América y Brasil.

Dentro de esta familia, en 2014 se ha reconocido un nuevo género denominado *Perhabdovirus* que incluye tres especies: *Rhabdovirus de perca* (PRV), la especie tipo, *Rhabdovirus de anguila* (AngRV) y *Rhabdovirus de trucha marina* (STRV), aislados principalmente de perca (*Perca fluviatilis*), anguila (*Anguilla anguilla* y *Anguilla rostrata*) y trucha (*Salmo trutta lacustris*), respectivamente.

Familia Birnaviridae

Dentro de esta familia se encuentra el género *Aquabirnavirus* que incluye a los primeros virus de peces aislados, los más diversos y unos de los más estudiados. Los *Aquabirnavirus* son virus ARN bicatenales y bisegmentados de morfología icosaédrica que carecen de envuelta lipídica. El segmento A codifica una poliproteína que por modificación post-traduccional da origen a las proteínas virales VP2, VP3 y VP4, siendo los epítomos de la proteína VP2 los responsables del serotipo y del reconocimiento de anticuerpos neutralizantes. El segmento B codifica la polimerasa viral (Dobos, 1995).

La especie tipo del género, el *Virus de la necrosis pancreática infecciosa* (IPNV) fue el primer virus aislado de un pez (Wolf y col., 1960) y es un importante patógeno de salmónidos. Los síntomas clínicos más importantes manifestados por los peces afectados son oscurecimiento de la piel, exoftalmia, hinchazón abdominal y con frecuencia natación errática. Este virus se caracteriza por su resistencia a las condiciones ambientales así como por su capacidad para permanecer en el huésped provocando una infección subclínica durante largos periodos de tiempo, lo que hace que sea muy difícil de erradicar (Kibenge y col., 2012). Los aquabirnavirus presentan una distribución prácticamente mundial y se han podido aislar de peces, moluscos y crustáceos. En Galicia se ha visto una gran presencia de este virus tanto en peces de cultivo (trucha, salmón y rodaballo) como en especies salvajes adyacentes a las plantas de cultivo que podrían actuar como reservorios (Cutrin y col., 2000). Dentro de la familia *Birnaviridae*, en el género *Blosnavirus* se incluye una única especie, el *Virus de cabeza de serpiente manchado*, en inglés *blotched snakehead virus* (BSNV) aislado en cultivo celular de células de cabeza de serpiente manchado (*Channa lucius*) (Da Costa y col., 2003).

Familia Iridoviridae

Los Iridovirus son virus con simetría icosaédrica que poseen un genoma ADN de cadena doble. Dentro de esta familia destaca el **Virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV)**, incluido en el género *Lymphocystivirus*. La linfocistis es una enfermedad crónica que se caracteriza por la aparición de nódulos en aletas y piel y que generalmente desaparece de manera espontánea. Aunque la patología no suele provocar la muerte del pez, los individuos afectados presentan habitualmente problemas de crecimiento y anemia lo que favorece la infección por otros microorganismos, y su aspecto externo imposibilita la venta (Iwamoto y col., 2002). El virus ha sido frecuentemente detectado en el cultivo de dorada (*Sparus aurata*, L) aunque también se ha detectado en una gran variedad de especies y su distribución es mundial (Alonso y col., 2007).

Dentro de esta familia se encuentra también el **Virus de la necrosis hematopoyética epizoótica (EHNV)**, virus emergente perteneciente al género *Ranavirus*. Existe una diferenciación dentro de la especie entre los virus que afectan a perca (*Perca fluviatilis*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) denominados EHNV que se relacionan con epizootias en peces de agua dulce en Australia (Whittington y col., 1996) y los iridovirus de bagre (ECV) y siluros (ESV) detectados en episodios de mortalidad en Europa. La patología se caracteriza por la necrosis del hígado, del bazo y de los tejidos hematopoyéticos del riñón. En percas se ha relacionado con la muerte súbita, con signos clínicos de oscurecimiento de la piel, letargo y eritema localizado en la región cefálica. También se han descrito hemorragias en agallas y en la base de las aletas. Por otro lado, en truchas arco iris se ha observado oscurecimiento piel, falta de apetito, letargo, distensión abdominal y pérdida del equilibrio. Se han relacionado con virus aislados de bacalao (*Gadus morhua*) y rodaballo en Dinamarca (Ariel y col., 2010).

Asimismo, en esta familia se incluye el **Virus de la necrosis infecciosa de bazo y riñón (ISKNV)**, especie tipo del género *Megalocytivirus*. Se aisló por primera vez de pez mandarín (*Siniperca chuatsi*) en 1998 (He y col., 2000) y posteriormente se ha extendido a otras especies de cultivo. Se caracteriza por la presencia de células con cuerpos de inclusión basófilos en los peces infectados. Dentro de este género se incluyen también el *Iridovirus de dorada del Japón (Pagrus major)* y el *Iridovirus del cuerpo rojizo del rodaballo (TRBIV)* detectados en Asia (Subramaniam y col., 2012).

Familia *Nodaviridae*

Sin duda dentro del conjunto de los virus que afectan a peces, uno de los que han producido mayores problemas en la acuicultura mundial en los últimos años han sido los virus causantes de la patología denominada necrosis nerviosa viral o encefalopatía y retinopatía viral y que pertenecen a la familia *Nodaviridae*, género *Betanodavirus*. Estos virus se analizarán con mayor detalle más adelante por ser objeto del presente trabajo.

Familia *Orthomyxoviridae*

En esta familia se encuentra el *Virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV)*, miembro único del género *Isavirus*. Los Isavirus son virus envueltos con morfología entre esférica y pleomórfica y con genoma ARN de cadena sencilla y polaridad negativa compuesto por 8 fragmentos que codifican al menos 10 proteínas. El ISAV afecta a salmónidos cultivados, en especial a salmón atlántico, y se caracteriza por provocar en el pez anemia grave y hemorragias en varios órganos. La anemia infecciosa de salmón se detectó por primera vez en 1984 en Noruega (Thorud y Djupvik, 1988), y posteriormente se ha descrito en Canadá, USA, Escocia, Islas Shetland, Islas Feroe y Chile (Aamelfot y col., 2014). Los aislados de los últimos años han revelado la constante evolución de este virus en poblaciones salvajes y de cultivo en Chile (Godoy y col., 2014).

Familia *Reoviridae*

La Familia *Reoviridae*, la más extensa dentro de los virus de ARN de cadena doble, incluye 15 géneros repartidos en 2 subfamilias. Dentro de la subfamilia *Spinareovirinae* se incluyen el género *Aquareovirus* en el que se recogen 7 especies de virus que infectan peces, de *Aquareovirus A* a *Aquareovirus G* (Francki y col., 1991). Se trata de virus icosaédricos, desnudos que presentan dos cubiertas proteicas. Su genoma está constituido por 11 segmentos de ARN bicatenal que codifican para 12 proteínas. Los virus de este género producen patologías tanto en peces (de agua dulce y marinos) como en moluscos y crustáceos. Se ha visto que produce hemorragias y grandes mortalidades en carpa china (*Ctenopharyngodon idella*) (Liang y col., 2014). En Galicia se han aislado a partir de rodaballo (Lupiani y col., 1989), dorada (Bandín y col., 1995) y trucha arcoíris (Dopazo y col., 1996) en episodios de baja patogenicidad y asociados a otras patologías. También dentro de la misma subfamilia se engloba el *piscine orthoreovirus (PRV)*, aunque aún no reconocido como una nueva especie

dentro de este género por la ICTV, que está asociado con el síndrome inflamatorio del músculo esquelético y cardíaco (HSMI) del salmón.

Familia *Retroviridae*

Los retrovirus son virus envueltos, con dos moléculas idénticas de ARN de cadena sencilla y nucleocápside icosaédrica, poseen de 6 a 9 proteínas estructurales entre las que se incluye la enzima transcriptasa inversa. Se han descrito 13 enfermedades proliferativas en peces asociadas con 1 o más retrovirus (Coffee y col., 2013). Actualmente la familia se divide en dos subfamilias, de las cuales los virus de peces se encuentran en la subfamilia *Orthoretrovirinae*, en el género más reciente *Epsilonretrovirus*. Dentro de este género se incluyen tres especies que afectan a lucioperca americana (*Sander vitreus*, “Walleye” en inglés), el **Virus de Sarcoma dérmico del Walleye (WDSV)**, especie tipo del género, que se caracteriza por el desarrollo y posterior desaparición de tumores en la piel de forma cíclica en relación con las estaciones del año, siendo máxima su expresión en primavera y mínima en otoño, y los **Virus de la hiperplasia dérmica del Walleye tipo 1 y tipo 2**. También se han descrito, aunque no han sido todavía asignados a ningún género, el *Virus de la leucemia del salmón (SLV)* sugerido como agente causante de la leucemia en salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Eaton y Kent, 1992), el *Virus de la hiperplasia epidérmica de perca tipo 1 y tipo 2 (PEHV 1 y 2)* asociado a lesiones hiperplásicas en perca canadiense (*Perca flavescens*), el *fibrosarcoma de salmón atlántico (SSSV)* aislado en salmón atlántico (*Salmo salar*), el *retrovirus de cabeza de serpiente cabrío (Channa striatus) (SnRV)* un virus exógeno observado en células de peces de cultivo y el *retrovirus endógeno de pez cebra (ZFERV)* (Lepa y Siwicki, 2011).

Familia *Togaviridae*

Se trata de virus envueltos de morfología esférica y simetría icosaédrica que se caracterizan por poseer un genoma compuesto de una única molécula de ARN monocatenario de cadena positiva. Dentro de la familia se encuentran dos virus de peces, el **Virus de la enfermedad pancreática del salmón (SPDV)**, altamente patógeno para salmón atlántico de cultivo, y el **Sleeping Disease Virus (SDV)** que se asocia a mortalidades en trucha arcoíris y recibe este nombre debido a que los peces afectados muestran un comportamiento anormal, apoyando el cuerpo en el fondo del tanque y dando la sensación de estar dormidos (Boucher y

Baudin-Laurencin, 1994). Los estudios realizados han demostrado que el SPDV y el SDV en realidad son distintos aislados de una única especie (Weston y col., 2002), por lo que se ha propuesto la inclusión conjunta en una nueva especie denominada *Alphavirus de salmónes* y además se ha sugerido la denominación Salmonid alphavirus 1 (SAV-1) para el primer subtipo y SAV-2, para el segundo. Estos virus han sido responsables de grandes pérdidas en el cultivo del salmón y trucha en Inglaterra, Irlanda, Escocia, Noruega, Francia, Italia y España.

Periódicamente se establece la lista de las enfermedades de animales de declaración obligatoria a nivel de la Unión Europea, que se trasponen a la normativa española. Son enfermedades de declaración obligatoria según el Real Decreto 526/2014 (que refleja la Decisión de Ejecución 2012/737/UE de la Comisión) la anemia infecciosa del salmón (ISAV), la enfermedad causada por el herpesvirus koi (HKV), la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), la necrosis hematopoyética epizootica (EHNV) y la septicemia hemorrágica viral (VHSV).



2. VIRUS DE LA NECROSIS NERVIOSA (NNV, *nervous necrosis virus*)

2.1 ANTECEDENTES

En los años 80 se empezó a estudiar la presencia de una nueva patología que afectaba a la perca loro japonesa (*Oplegnathus fasciatus*) y que provocaba pérdidas en la producción de cerca del 100% en Japón. En 1985, se observaron características similares en un brote infeccioso detectado en lubina (*Dicentrarchus labrax*) cultivada en la isla de Martinica (Bellance y Gallet de Gaint-Aurin, 1988) en el que se perdió casi toda la producción llegando a paralizar prácticamente el cultivo de esta especie.

Durante los años posteriores, se observaron numerosos casos de peces que presentaban síntomas similares en los que se apreciaba oscurecimiento de la piel, comportamiento anormal y altas mortalidades. A nivel histológico los peces presentaban vacuolización y necrosis en tejidos nerviosos. Las lesiones aparecían en retina, cerebro y médula espinal mientras que en el resto de tejidos (bazo, riñón, músculo, etc.) no se observaba ninguna alteración. Mediante el estudio con microscopía electrónica se pudo observar la existencia de partículas virales en los tejidos afectados, concluyendo que se trataba de una nueva patología de etiología viral a la que le dieron el nombre de necrosis nerviosa viral (VNN del inglés *viral nervous necrosis*) debido a los efectos que observaron en los peces afectados (Yoshikoshi y Inoue, 1990).

A lo largo de la década de los 90 se detectó la presencia de este agente viral en más de 25 especies marinas de cultivo de distintas regiones (Péducasse y col., 1999). Se observó la presencia de virus en retina y cerebro de peces en epizootias producidas en larvas y juveniles de lubina en Francia (Breuil y col., 1991), en larvas de perca gigante (*Lates calcarifer*) que presentaban natación anormal en Australia (Glazebrook y col., 1990) y Tahití (Renault y col., 1991). Se observaron partículas similares también en larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) cultivado en Noruega que presentaban falta de apetito, oscurecimiento de la piel y comportamiento anormal desencadenando mortalidades del 100% (Bloch y col., 1991), y también en mero carcelario (*Epinephelus septemfasciatus*) en Corea (Sohn y col., 1991) y mero malabar (*E. malabaricus*) en Tailandia (Boonyaratpalin y col., 1996). En 1992 Munday y col, estudiaron la aparición de grandes mortalidades en larvas y juveniles de perca gigante, y las asociaron a un agente viral que provocaba vacuolización en cerebro y retina, con características similares a las descritas por otros autores, esta nueva patología se denominó

encefalopatía y retinopatía viral (VER, del inglés *viral encephalopathy and retinopathy*), nombre oficialmente reconocido por la Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE (OIE, 2013).

En el año 1992 Mori y col. caracterizaron por primera vez el virus purificado de larvas de jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*), *striped jack* en inglés, y al que le dio el nombre de *striped jack nervous necrosis virus* (SJNNV). En este estudio se analizaron las propiedades morfológicas y biofísicas del virus de la necrosis nerviosa viral y demostraron que el agente etiológico de esta patología, también llamado virus de la encefalopatía y retinopatía (ERV), era un nuevo miembro de la familia *Nodaviridae*.

2.2 PROPIEDADES BIOFÍSICAS DEL NNV

El NNV es un virus desnudo, con morfología esférica y simetría icosaédrica (número de triangulación=3) (Figura 1). La partícula viral es de pequeño tamaño (25-34 nm) y la cápside contiene 180 copias de una única proteína estructural de 42 KDa. El virión tiene un peso molecular de 8×10^6 Da, con un coeficiente de sedimentación de 134-140 S y una densidad de flotación en CsCl de 1.31-1.36 g/cm³ (Thiéry y col., 2011). Se ha comprobado que los viriones son estables entre un pH 2 y 9, y son resistentes al calentamiento a 56 °C durante 30 minutos (Frerichs y col., 1996). Realizando la reconstrucción cristalográfica del *malabaricus grouper nervous necrosis virus* (MGNNV) se observó que presenta dos cubiertas, un externa con un radio entre 154 y 192 Å, y una interna, con un radio de entre 112 y 154 Å, a diferencia de los alphanodavirus que presentan una única cubierta. Además, se vio que mientras la capa externa presenta proyecciones, la interna era bastante uniforme (Tang y col., 2002).

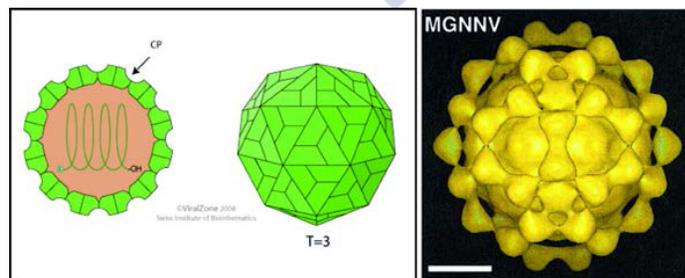


Figura 1 Reconstrucción de la estructura de betanodavirus <http://viralzone.expasy.org/> (izq.), Lin y col., 2001 (dcha.)

El NNV posee un genoma ARN de cadena sencilla y positiva que presenta dos segmentos, el ARN1 de $1,01 \times 10^6$ Da y el ARN2 de $0,49 \times 10^6$ Da. Ambos segmentos carecen de cola de poli-A en su extremo 3' (Comps y col., 1994; Mori y col., 1992). Además se ha encontrado una tercera molécula de ARN subgenómica, a la que se le denominó ARN3 de aproximadamente $0,13 \times 10^6$ Da que se sintetiza a partir del ARN1, y sólo ha sido observado en células de peces infectados (Figura 2).

El genoma completo de NNV se ha secuenciado a partir de diferentes aislados: de jurel dentón (Iwamoto y col., 2001a), de mero lutria (*E. tauvina*) (Tan y col., 2001); de fletán atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Sommerset y Nerland, 2004), de mero carcelario, SGNNV, (Iwamoto y col., 2004), de barfin flounder (*Verasper moseri*) y del pez globo tigre (*Takifugu rubripes*) (Okinaka y Nakai, 2008), a partir de un aislado de lubina en Túnez (Chérif y col., 2010) y un aislado de mero de pintas rojas (*E. akaara*) en China (Liu y col., 2012).

El ARN1 del virus tipo de NNV, *striped jack nervous necrosis virus*, está formado por 3.107 bases y presenta un marco de lectura abierta (ORF del inglés *Open Reading Frame*) entre la base 79 y la 3.030 flanqueado por dos secuencias no codificantes (UTRs, *untranslated regions*). El ORF codifica la proteína A (110 KDa), un polipéptido de 983 aminoácidos que contiene la actividad ARN polimerasa ARN dependiente viral (RdRP).

El ARN2 del SJNNV, está formado por 1.421 nucleótidos que contienen un único ORF entre la base 28 y la 1.050 que codifica 340 aminoácidos que forman la proteína α o proteína de la cápside (Cp). Existen 28 bases en posición 5' y 37 bases en posición 3' que pertenecen a secuencias no codificantes. Las bases de la región 1.416 a 1.421 son idénticas a las de la secuencia del ARN1 en su extremo 3'.

Al comparar parte de la secuencia que codifica la proteína de la cápside con el resto de los aislados de NNV se vio que existe una delección de 6 nucleótidos (posición 713-718) en aislados de "barfin flounder" y de meros. Además se encontró una región conservada (posición 83-216) que corresponde a 134 aminoácidos de la proteína con una similitud del 93% y una región variable (posición 235-315) que corresponde a 81 aminoácidos con un 62% de similitud entre los aislados (Nishizawa y col., 1995).

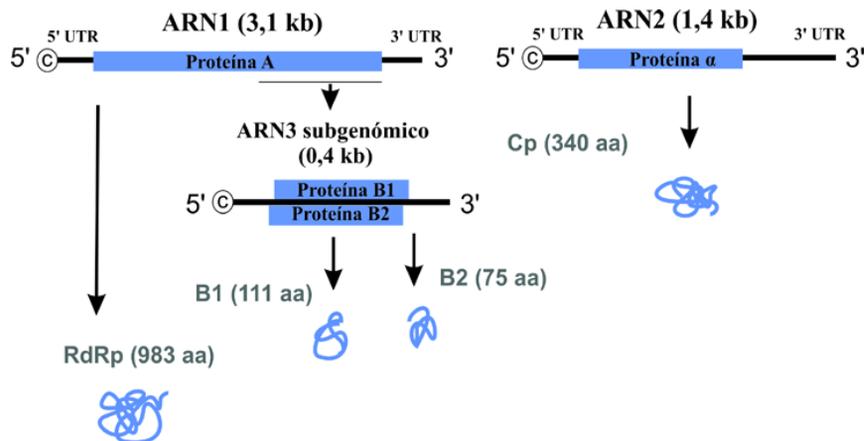


Figura 2 Esquema del genoma de betanodavirus

El ARN3 es de pequeño tamaño (0,4 Kb) y se sintetiza a partir del ARN1. Se inicia en la posición 2.737 con el dinucleótido UA (al igual que el ARN1 y el ARN2) y comparte el extremo 3' con el ARN1. Este ARN contiene dos posibles ORFs que codifican proteínas no estructurales, el primero codifica la proteína B1, de 111 aminoácidos (Liu y col., 2012), que se ha asociado con una función anti-apoptótica en la célula huésped durante la infección temprana (Chen y col., 2009). El segundo ORF, con una pauta de lectura +1 respecto al ORF1, codifica la síntesis de la proteína B2 (Iwamoto y col., 2005). Se cree que esta proteína está implicada en el bloqueo del sistema inmune del huésped a través de la represión de ARNs de silenciamiento (Fenner y col., 2006; Iwamoto y col., 2005).

2.3 TAXONOMÍA Y FILOGENIA

Los virus que causan la necrosis nerviosa viral se identificaron en un primer momento como miembros de la familia *Picornaviridae*, debido a sus características morfológicas, su condición de virus ARN y su capacidad de replicar en el citoplasma (Bloch y col., 1991; Glazebrook y col., 1990; Renault y col., 1991). Más adelante, como se mencionó anteriormente, un estudio más profundo de sus características genómicas hizo que el virus causante de la VNN/VER se situase dentro de la familia *Nodaviridae* (Mori y col., 1992) en la que existía un único género denominado *Nodavirus* y en el que se incluían virus de insectos: el virus nodamura (NOV), virus blackbeetle (BBV), virus Flock House (FHV) y el virus boolarra (BOV) (Hendry y col., 1995).

Al realizar la comparación del ARN2 de los dos grupos de virus, se vio una similitud entre las secuencias de la cápside de NNV respecto a los virus que afectan a insectos menor del 30% a nivel nucleotídico y del 10% a nivel aminoacídico (Nishizawa y col., 1995). Además se observó que una secuencia conservada compartida por todos los aislados de peces estaba ausente en los nodavirus de insectos. La gran similitud entre los virus de la necrosis nerviosa de peces y las diferencias a nivel nucleotídico con los encontrados en insectos hizo que se propusiera la formación de un nuevo género dentro de la familia *Nodaviridae* (Aspehaug y col., 1999; Grotmol y col., 2000; Nagai y Nishizawa, 1999; Nishizawa y col., 1997, 1995). Así en la 7^a revisión taxonómica viral (7th *Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*) se crean dos nuevos géneros dentro de la familia: el género *Alphanodavirus* representado por los virus que infectan insectos, y el género *Betanodavirus* que reúne a los virus que afectan a peces (Ball y col., 2000).

Los primeros estudios que se realizaron para intentar clasificar los distintos aislados de nodavirus de peces se hicieron en base a la región variable del ARN2 (que codifica la proteína de la cápside), se trata de una secuencia de unos 420 pb a la que se denomina región T4 (Nishizawa y col., 1997). De esta forma los betanodavirus se clasificaron en cuatro grandes grupos que se designaron como SJNNV (*striped jack nervous necrosis virus*), TPNNV (*tiger puffer nervous necrosis virus*), BFNNV (*barfin flounder nervous necrosis virus*) y RGNNV (*redspotted grouper nervous necrosis virus*), siendo la similitud entre cada grupo del 95% o mayor (Nishizawa y col., 1997). Esta clasificación ha sido utilizada con posterioridad por distintos autores para tipar los betanodavirus aislados de distintas zonas geográficas (Cutrín y col., 2007; Dalla Valle y col., 2001; Gagné y col., 2004; Johnson y col., 2002; Skliris y col., 2001). Nishizawa y sus colaboradores calcularon una tasa de evolución de $2,6 \times 10^{-3}$ reemplazamiento nucleotídico/lugar/año, en base a la sustitución por mutación encontrada en varios aislados japoneses de 5 años consecutivos entre 1990 y 1994. Por ello, consideraban que los cuatro grandes grupos de nodavirus de peces divergieron hace 100 a 150 años mientras que la menor divergencia entre los grupos se produjo dentro de los últimos 10 años, siendo TPNNV y SJNNV considerados grupos hermanos y los grupos más primitivos, mientras BFNNV y RGNNV serían grupos derivados, en los que está presente una delección de 6 bases en la región T4 (Nishizawa y col., 1997).

Mediante el empleo de anticuerpos policlonales de conejo y pez se realizó un análisis comparativo de los distintos aislados pertenecientes a los cuatro genotipos. Se propuso el establecimiento de tres serotipos distintos: el serotipo A que se corresponde con el genotipo SJNNV, el serotipo B que se corresponde con el TPNNV y el serotipo C que reúne a los dos genotipos restantes RGNNV y BFNNV, lo cual está relacionado con la gran similitud genética que existe entre estos dos grupos (Mori y col., 2003).

En el año 2004, Thiéry y col. propusieron una nueva clasificación basada también en la región T4 del ARN2 en la que se distinguían 4 grandes grupos o clados, algunos de los cuales se dividían en subgrupos. Así el clado I incluye aislados que corresponden al genotipo RGNNV y se divide en los subgrupos Ia y Ib. El clado II agrupa los aislados pertenecientes al genotipo BFNNV, distinguiéndose los subgrupos IIa, IIb y IIc. Finalmente, los clados III y IV se corresponden con los genotipos TPNNV y SJNNV, respectivamente. Diversos autores han utilizado esta clasificación para el análisis de las secuencias de nuevos aislados (Bigarré y col., 2009; Chérif y col., 2010; Moody y col., 2009; Olveira y col., 2009; Panzarin y col., 2012).

En 2004, Johansen y col. publicaron la detección de betanodavirus en rodaballo. Al realizar el análisis filogenético en base a una secuencia de 823 nucleótidos del ARN2 observaron que no se agrupaba en ninguno de los cuatro genotipos y además al comparar la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína de la cápside con secuencias representativas de cada genotipo observaron una similitud del 77–78%, (Johansen y col., 2004a). Por ello propusieron la formación de un quinto genotipo denominado TNNV (*turbot nervous necrosis virus*). Esta secuencia ha sido incluida en otros estudios filogenéticos con el mismo resultado aunque la ausencia de una secuencia mayor y del aislamiento del virus ha impedido un estudio más detallado.

Aunque la mayoría de los estudios se centran en el análisis del ARN2, existen también datos en base al ARN1. Toffolo y col. en 2007 realizaron un análisis filogenético empleando ambos segmentos, en el que se analizó una secuencia parcial del gen de la polimerasa viral de 929 nucleótidos (ARN1). En este estudio se incluyeron cepas aisladas en Europa, principalmente de lubina, junto con otras cepas ya analizadas anteriormente y cepas de referencia de los cuatro genotipos. Los datos obtenidos indicaron una clara separación de los aislados en los cuatro grandes grupos, y según la distancia genética que presentaban los

distintos grupos determinaron que existió una primera divergencia que separaba al genotipo RGNNV del resto, más tarde ocurriría la divergencia de SJNNV y por último TPNNV y BFNNV serían grupos hermanos con una separación más reciente (Toffolo y col., 2007). Utilizando gran parte del ARN1, el análisis realizado en 2008 por Nylund y col. mantiene la clara separación de los genotipos SJNNV, RGNNV y BFNNV, en un estudio en el que se incluyeron sobre todo cepas de bacalao procedentes de las costas de Noruega junto con cepas descritas anteriormente de todos los genotipos excepto el genotipo TPNNV.

El estudio de ambos segmentos realizado por Toffolo y col en 2007 reveló la existencia de dos aislados de lubina procedentes del mediterráneo que poseían un ARN1 de tipo SJNNV y un ARN2 perteneciente al genotipo RGNNV, demostrando la existencia de recombinación entre segmentos genómicos en betanodavirus. En 2009, en un estudio realizado en nuestro laboratorio, el análisis filogenético de 6 aislados de NNV, además de 16 secuencias obtenidas de la detección por RT-PCR, procedentes de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) y dorada, reveló que estos virus poseían un ARN1 perteneciente al genotipo RGNNV y un ARN2 de tipo SJNNV, confirmando la existencia de recombinantes en el sur de Europa y la existencia de recombinación distinta a la observada anteriormente (Olveira y col., 2009). Más recientemente, en 2012, en un amplio estudio realizado por Panzarin y col. (2012) en el sur de Europa, se describen 23 nuevos recombinantes entre los genotipos RGNNV y SJNNV de tipo RGNNV/SJNNV, aislados de lubina, lenguado común (*Solea solea*) y dos invertebrados marinos. Además, el análisis filogenético de ambos segmentos de una cepa de NNV procedente de lubina en Túnez indica que ha sufrido posiblemente recombinación entre cepas del mismo genotipo (RGNNV) (Haddad-Boubaker y col. 2013). Los resultados obtenidos en estos análisis filogenéticos demostraron la importancia de realizar un estudio de ambos fragmentos para obtener una información más precisa de la evolución de estos virus.

Oficialmente dentro del género *Betanodavirus* se han reconocido las especies *Striped jack nervous necrosis virus* (SJNNV), *Redspotted grouper nervous necrosis virus* (RGNNV), *Barfin flounder nervous necrosis virus* (BFNNV) y *Tiger puffer nervous necrosis virus* (TPNNV), y además existen además una serie de aislados que están a la espera de considerarse nuevas especies: *Atlantic cod nervous necrosis virus* (ACNNV), *Atlantic halibut nodavirus* (AHNV), *Dicentrarchus labrax encephalitis virus* (DIEV), *Dragon grouper nervous necrosis virus* (DGNNV), *Greasy grouper nervous necrosis virus* (GGNNV), *Japanese*

flounder nervous necrosis virus (JFNNV), Lates calcarifer encephalitis virus (LcEV), Malabaricus grouper nervous necrosis virus (MGNNV), Sea bass nervous necrosis virus (SBNNV), Solea senegalensis nervous necrosis virus (SSNNV) y Turbot nodavirus (TNV) (Thiéry y col., 2011).

2.4 EPIDEMIOLOGÍA: BREVE REVISIÓN

La distribución geográfica de la necrosis nerviosa viral es muy amplia, ha sido detectado en todos los continentes: regiones del sureste asiático (Mori y col., 1991; Nakai y col., 1994; Oh y col., 2002; Ransangan y Manin, 2010; Yoshikoshi e Inoue, 1990), India (Azad y col., 2005) e Irán (Zorriehzadra y col., 2005), sur de Europa y regiones del mediterráneo que incluyen España, Francia, Italia, Grecia, Chipre, Malta, Bosnia, Croacia, Argelia, Túnez e Israel (Chérif y col., 2009; Cutrín y col., 2007; Giacomello y col., 2013; Grotmol y col., 1995; Haddad-Boubaker y col., 2013; Hodneland y col., 2011; Kara y col., 2014; Le Breton y col., 1997; Panzarin y col., 2012; Skliris y col., 2001; Ucko y col., 2004), costas del Reino Unido (Starkey y col., 2001) y Mar del Norte (Bloch y col., 1991; Grotmol y col., 1995), Australia (Munday y col., 2002), Caribe (Bellance y Gallet de Saint-Aurin, 1988), Estados Unidos (Curtis y col., 2001) y Canadá (Gagné y col., 2004; Johnson y col., 2002),

Desde su descubrimiento se ha descrito la infección del virus en más de 50 especies marinas pertenecientes a 31 familias distribuidas en 15 órdenes distintos (Tabla 1). Entre las especies susceptibles se encuentran peces de gran importancia para la industria de la acuicultura como lubina (Renault y col., 1991); bacalo, *Gadus morhua* L. (Starkey y col., 2001); lenguado senegalés (Cutrín y col., 2007; Oliveira y col., 2009); dorada, *Sparus aurata* (Bitchava y col., 2007; Comps y Raymond, 1996; Dalla Valle y col., 2000; Oliveira y col., 2009), rodaballo (Johansen y col., 2004a) y anguila, *Anguilla anguilla* (Chi y col., 2003) ocasionando mortalidades y grandes pérdidas económicas. Además se ha detectado la presencia del virus en gran cantidad de especies salvajes asintomáticas (Ciulli y col., 2007; Gagné y col., 2004; Gomez y col., 2004; Nylund y col., 2008). En corvina salvaje, *Argyrosomus regius*, se ha detectado la existencia de cepas de los genotipos SJNNV y RGNNV (Lopez-Jimena y col., 2010a). También se ha detectado la presencia del virus en especies de invertebrados marinos (Gomez y col., 2008; Panzarin y col., 2012), ambos casos pueden constituir una importante fuente de infección para los peces cultivados.

Asimismo se ha diagnosticado el virus en especies de agua dulce es el caso del esturión *Acipenser gueldenstaedti* (Athanassopoulou y col., 2004), el “guppy” *Poecilia reticulata* (Hegde y col., 2003), el pez gato chino *Parasilurus asotus* (Chi y col., 2003), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Bigarré y col., 2009) y especies de acuario como el pez rojo (*Carassius auratus auratus*) y el tiburón arcoíris (*Epalzeorhynchus frenatum*) (Jithendran y col., 2011). Además se ha conseguido una infección en el pez-arroz japonés o medaka común (*Oryzias latipes*) (Furusawa y col., 2006) y en pez cebra (Lu y col., 2008; Morick y col., 2015), peces utilizados como modelo con la intención de mejorar el conocimiento de los betanodavirus.

En la península ibérica se han obtenido aislados de NNV de brotes infecciosos en tres especies distintas de cultivo: lubina, dorada y lenguado senegalés (Cutrín y col., 2007; Oliveira y col., 2009). Además se ha detectado el virus en otras especies cultivadas como pargo sémola (*Pagrus auriga*), pargo común (*Pagrus pagrus*), y sargo (*Diplodus sargus*) (García-Rosado y col., 2007), corvina (Hodneland y col., 2011) y rodaballo (Oliveira y col., 2013). Se ha detectado el NNV en un amplio rango de especies salvajes en las costas gallegas, llegando a alcanzar una prevalencia del 21% en un estudio de detección realizado durante tres años (Bandín y col., 2010), siendo detectado especialmente en besugo (*Pagellus bogaraveo*), también en corvina salvaje procedente de la región atlántica de la península (Lopez-Jimena y col., 2010a). Más recientemente se ha descrito el aislamiento de betanodavirus en poblaciones salvajes del sur de la península ibérica en aligote (*Pagellus acarne*), breca (*Pagellus erythrinus*), chopo (*Spondylisoma cantharus*), salmonete de fango (*Mullet barbatus*), sapo lusitánico (*Halobatrachus didactylus*) y begel (*Chelidonichtys lucerna*) (Moreno y col., 2014).

Tabla 1 Lista de especies de las que se ha aislado el NNV.

ORDEN Y FAMILIA	ESPECIE	ZONA GEOGRÁFICA
Orden Anguilliformes		
Familia Anguillidae	Anguila europea (<i>Anguilla anguilla</i>)	Taiwán ¹
Orden Beryciformes		
Familia Trachichthyidae	Pez reloj (<i>Hoplostethus mediterraneus</i>)	Italia ²
Orden Gadiformes		
Familia Gadidae	Granadero (<i>Hymenocephalus italicus</i>)	Italia ²
	Bacalao común (<i>Gadus morhua</i>)	Reino Unido ³ , Canadá ⁴ , USA ⁵ , Noruega ⁶
	Eglefino (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>)	Canadá ⁵
Orden Perciformes		
Familia Blenniidae	Pez fraile (<i>Salaria fluviatilis</i>)	España ⁷
Familia Centropomatidae	Barramundi (<i>Lates calcarifer</i>)	Australia ⁸ , China ⁹ , Indonesia ¹⁰ , Israel ^{9,11} , Malasia ¹⁰ , Filipinas ¹² , Singapur ¹³ , Tahiti ¹⁴ , Taiwán ¹ , Tailandia ¹⁵ , India ¹⁶
	Lubina japonesa (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	Japón ¹⁰
Familia Cichlidae	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Europa ¹⁷
Familia Percichthyidae	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Caribe ¹⁸ , Francia ¹⁹ , Grecia ²⁰ , Italia ²¹ , Malta ²² , Portugal ²² , España ²² , Israel ¹¹ , Chipre ²³ , Túnez ²⁴
Familia Serranidae	“White grouper” (<i>Epinephelus aeneus</i>)	Israel ¹¹
	Mero de pintas rojas (<i>E. akaara</i>)	Japón ¹⁰ , Taiwán ¹³
	Mero amarillo (<i>E. awoara</i>)	Taiwán ²⁵
	Mero de pintas naranjas (<i>E. coioides</i>)	Filipinas ¹² , Taiwán ¹
	Mero manchado (<i>E. fuscoguttatus</i>)	Taiwán ¹³ , Malasia ²⁶
	Mero malabar (<i>E. malabaricus</i>)	Tailandia ²⁷
	Mero moreno (<i>E. marginatus</i>)	Italia ²⁸ , Argelia ²⁹
	Mero de diente largo (<i>E. moara</i>)	Japón ³⁰
	Mero carcelario (<i>E. septemfasciatus</i>)	Japón ³¹ , Corea ¹⁰
	Mero lutria (<i>E. tauvina</i>)	Malasia ¹⁰ , Filipinas ¹⁰ , Singapur ³²
	Mero jorobado (<i>Cronileptes altivelis</i>)	Indonesia ³³ , Taiwán ¹ , Malasia ²⁶
	Falso abadejo (<i>E. costae</i>)	Grecia ²³ , Italia ³⁴ , Argelia ²⁹
	Mero con pintas (<i>Plectropomus maculatus</i>)	Tailandia ³⁵
Familia Latridae	Trompetero australiano (<i>Latris lineata</i>)	Australia ⁹
Familia Carangidae	Jurel dentón (<i>Pseudocaranx dentex</i>)	Japón ³⁶
	Serviola (<i>Seriola dumerili</i>)	Japón ³⁷
	Pámpano lunero (<i>Trachinotus blochii</i>)	Taiwán ³⁸ , Malasia ³⁹
	Pámpano palometa (<i>Trachinotus falcatus</i>)	Taiwán ¹
Familia Sparidae	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Francia ⁴⁰ , España ⁴¹ , Portugal ⁴¹ , Túnez ²⁴ , Italia ⁴² , Grecia ⁴³
	Sargo (<i>Diplodus sargus</i>)	Italia ⁴⁴
Familia Sciaenidae	Corvinón ocelado (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	Corea ⁴⁵ , Israel ¹¹
	Verrugato (<i>Umbrina cirrosa</i>)	Italia ²² , Francia ⁴⁶
	Corvina blanca (<i>Atractoscion nobilis</i>)	USA ⁴⁷
	Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	Península Ibérica ⁴⁸
Familia Oplegnathidae	“Japanese parrotfish” (<i>Oplegnathus fasciatus</i>)	Japón ⁴⁹
	“Rock porgy” (<i>Oplegnathus punctatus</i>)	Japón ³⁶
Familia Eleotridae	“Sleepy cod” (<i>Oxyeleotris lineolatus</i>)	Australia ⁹
Familia Epigonidae	Boca negra (<i>Epigonus telescopus</i>)	Italia ²
Familia Ephippidae	Dalapugán (<i>Platax orbicularis</i>)	Polinesia Francesa ⁵⁰
Familia Rachycentridae	Cobia (<i>Rachycentron canadum</i>)	Taiwán ¹

Tabla 1 Lista de especies de las que se ha aislado el NNV. Continuación.

ORDEN Y FAMILIA	ESPECIE	ZONA GEOGRÁFICA
Orden Perciformes		
Familia Mugilidae	Pardete (<i>Mugil cephalus</i>)	Israel ¹
	Galupe (<i>Liza aurata</i>)	Irán ⁵¹
	Lisa (<i>Chelon labrosus</i>)	Italia ²³
	Salmonete de roca (<i>Mullus surmuletus</i>)	Italia ²³
	Salmonete de fango (<i>Mullus barbatus</i>)	Italia ⁵²
Familia Lutjanidae	Pargo carmesí (<i>Lutjanus erythropterus</i>)	Taiwán ¹
Orden Salmoniformes		
Familia Salmonidae	Trucha común (<i>Salmo trutta trutta</i>)	Italia ²³
Orden Pleuronectiformes		
Familia Pleuronectidae	“Barfín flounder” (<i>Verasper moseri</i>)	Japón ³⁷
	Fletán del atlántico (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)	Noruega ⁵³ , Reino Unido ⁵⁴
	Solla roja (<i>Pseudopleuronectes americanus</i>)	Canadá ⁵⁵
Familia Paralichthyidae	Falso halibut del Japón (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Japón ⁵⁶
Familia Scophthalmidae	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Noruega ⁵⁷ , España ⁵⁸
Familia Soleidae	Lenguado común (<i>Solea solea</i>)	Reino Unido ³
	Lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>)	España ⁴¹ , Portugal ⁴¹
Orden Notacanthiformes		
Familia Notacanthidae	Anguila de Bonaparte (<i>Notacanthus Bonaparte</i>)	Italia ²
Orden Tetraodontiformes		
Familia Balistidae	“triggerfish” <i>Balistapus spp</i>	Italia ²³
Familia Monacanthidae	“threadsail filefish” (<i>Stephanolepis cirrhifer</i>)	Tailandia ⁵⁹
Familia Triodontidae	“tiger puffer” (<i>Takifugu rubripes</i>)	Japón ³⁰
Orden Siluriformes		
Familia Siluridae	Pez gato chino (<i>Parasilurus asotus</i>)	Taiwán ¹
Familia Plotosidae	Pez gato australiano (<i>Tandanus tandanus</i>)	Australia ⁹
Orden Cyprinodontiformes		
Familia Poeciliidae	“Guppy” (<i>Poecilia reticulata</i>)	Singapur ⁶⁰
Orden Scorpaeniformes		
Familia Sebastidae	“Oblong rockfish” (<i>Sebastes oblongus</i>)	Corea ¹⁰
Orden Acipenseriformes		
Familia Acipenseridae	Esturión (<i>Acipenser gueldenstaedti</i>)	Grecia ⁶¹
Orden Anostraca		
Familia Artemiidae	<i>Artemia salina</i>	Chipre ²³
Orden Opisthobranchia		
	<i>Opisthobranchia</i>	Italia ²³
Orden Veneroidea		
Familia Veneridae	Almeja japonesa (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	Italia ²³

(1) Chi y col. 2003, (2) Giacopello y col. 2013, (3) Starkey y col. 2001, (4) Johnson y col. 2002, (5) Gagné y col. 2004, (6) Patel y col. 2007, (7) Vendramin y col. 2012, (8) Glazebrook y Campbell, 1987, (9) Munday y col. 2002, (10) Maltese y Bovo, 2007, (11) Ucko y col. 2004, (12) Maeno y col. 2002, (13) Chi y col. 1997, (14) Renault y col. 1991, (15) Glazebrook y col. 1990, (16) Azad y col. 2005, (17) Bigarré y col. 2009, (18) Bellance y Gallet de Gaint-Aurin, 1988, (19) Breuil y col. 1991, (20) Le Breton y col. 1997, (21) Bovo y col. 1999, (22) Skliris y col. 2001, (23) Panzarin y col. 2012, (24) Chérif y col. 2009, (25) Lai y col. 2001a, (26) Ransangan y Manin, 2012, (27) Danayadol y col. 1995, (28) Marino y Azzuro, 2001, (29) Kara y col. 2014, (30) Nakai y col. 1994, (31) Fukuda y col. 1996, (32) Chua y col. 1995, (33) Zafra y col. 2000, (34) Vendramin y col. 2013, (35) Pirarat y col. 2009a, (36) Mori y col. 1992, (37) Muroga, 1995, (38) Chi y col. 2001a, (39) Ransangan y col. 2011, (40) Comps y Raymond, 1996, (41) Olveira y col. 2009, (42) Dalla Valle y col. 2000, (43) Bitchava y col. 2007, (44) Dalla Valle y col. 2005, (45) Oh y col. 2002, (46) Comps y col. 1996, (47) Curtis y col. 2001, (48) Lopez-Jimena y col. 2010a, (49) Yoshikoshi e Inoue, 1990, (50) David y col. 2010, (51) Zorriehzakra y col. 2005, (52) Toffolo y col. 2007, (53) Grotmol y col. 1995, (54) Starkey y col. 2000, (55) Barker y col. 2002, (56) Nguyen y col. 1994, (57) Bloch y col. 1991, (58) Olveira y col. 2013, (59) Pirarat y col. 2009b, (60) Hegde y col. 2003, (61) Athanassopoulou y col. 2004.

2.5 SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD

En la mayor parte de los casos se ven afectados larvas y juveniles, aunque también se han descrito infecciones en individuos adultos en fletán (Aspehaug y col., 1999), en mero carcelario (*E. septemfasciatus*) (Fukuda y col., 1996), en jurel dentón (Arimoto y col., 1992) y en lubina (Le Breton y col., 1997), entre otros. Este virus es particularmente agresivo en edad larvaria lo que puede llevar en los casos más severos a una pérdida del 100% de la producción. El signo clínico más característicos es la presencia de natación errática, que puede estar acompañado con cambios en la coloración del pez y anorexia. En algunas especies se ha observado también la vejiga natatoria hinchada.

A nivel histológico presentan lesiones en cerebro y retina, apareciendo necrosis y vacuolización en células del sistema nervioso central (Figura 3). En estas regiones se ha observado mediante microscopía electrónica la existencia de acumulaciones de partículas virales.

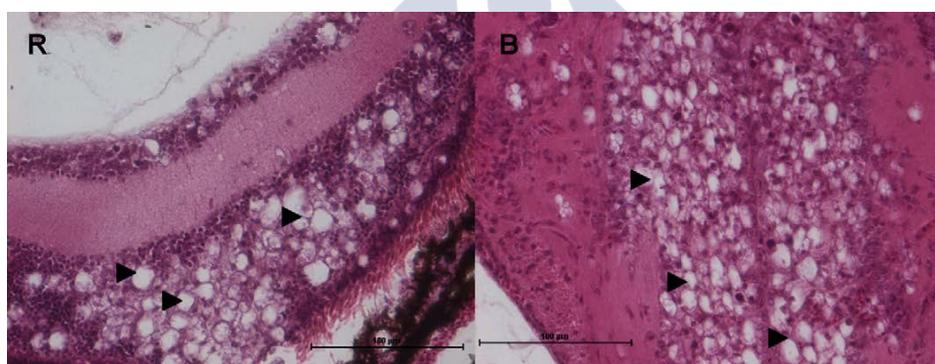


Figura 3 Corte histológico de retina y cerebro de larva de perca gigante en el que se muestra la vacuolización del tejido producida por el NNV. R: retina, B: cerebro. (Ransangan y Manin, 2010).

Parece que hay una distinta distribución en los órganos entre peces enfermos y peces considerados portadores. El virus tiene una alta capacidad de replicación en el tejido nervioso desencadenando la patología clínica, mientras que en otros tejidos presentan baja replicación por lo que se mantiene en estado de portador (Nguyen y col., 1997). Se ha descrito que en dorada el virus se mantiene como portador asintomático replicando en el sistema nervioso del pez sin producir lesiones (López-Muñoz y col., 2012). También se han observado lesiones en retina y cerebro en juveniles de fletán y bacalao adulto aparentemente sanos (Gjessing y col., 2009; Johansen y col., 2002).

2.6 DIAGNÓSTICO DE BETANODAVIRUS

En la actualidad existen distintas técnicas para el diagnóstico e identificación de los betanodavirus que se describen a continuación:

2.6.1 Histología

La observación mediante microscopía de las lesiones típicas del virus (vacuolas) en cerebro y/o retina puede llevar a un diagnóstico presuntivo. Se ha empleado esta técnica para en numerosos estudios asociada a otros métodos de detección (Bitchava y col., 2007; David y col., 2010; Lopez-Jimena y col., 2012; Patel y col., 2007). Sin embargo, el diagnóstico es difícil cuando algunos peces tienen tan solo unas pocas lesiones en los tejidos nerviosos. Actualmente es una técnica en desuso debido a la complejidad para obtener las muestras. Además no es una técnica válida para detección en peces portadores.

2.6.2 Cultivo celular

El aislamiento en cultivo celular es la herramienta principal para el diagnóstico e identificación de los virus y es la única técnica que permite conocer la capacidad infectiva del virus. Sin embargo, los betanodavirus son difíciles de aislar y mantener en cultivo celular.

En un primer momento se intentó realizar el aislamiento con las principales líneas celulares existentes utilizadas para el aislamiento de otros virus de peces como el IPNV, VHSV e IHNV; pero ninguna de estas líneas celulares era permisiva para los nodavirus. El primer aislamiento del virus en cultivo celular se realizó en 1996 a partir de una muestra de lubina en la línea celular SSN-1, derivada del pez cabeza de serpiente cabrío “striped snakehead fish”, *Channa striatus*, (Frerichs y col., 1996). Más tarde se comprobó que las células eran susceptibles y permisivas para todos los genotipos produciéndose un efecto citopático caracterizado por células refringentes y redondeadas en los primeros días y posteriormente formación de vacuolas y destrucción progresiva del tapiz celular (Figura 4).

Sin embargo, se trata de una línea celular difícil de mantener y que además está persistentemente infectada por un retrovirus, el SnRV. Debido a estos inconvenientes se intentó clonar para desarrollar una línea libre de retrovirus dando lugar a la línea E-11 (Iwamoto y col., 2000), esta nueva línea permite una replicación más eficiente de los distintos genotipos aunque se ha demostrado que el retrovirus continúa estando presente. Esto ha

llevado a algunos autores a sugerir que la presencia del retrovirus puede jugar un papel importante en el desarrollo de efecto citopático en cultivo, posiblemente favoreciendo la entrada del virus en la célula de alguna manera (Iwamoto et al., 2000; Lee et al., 2002).

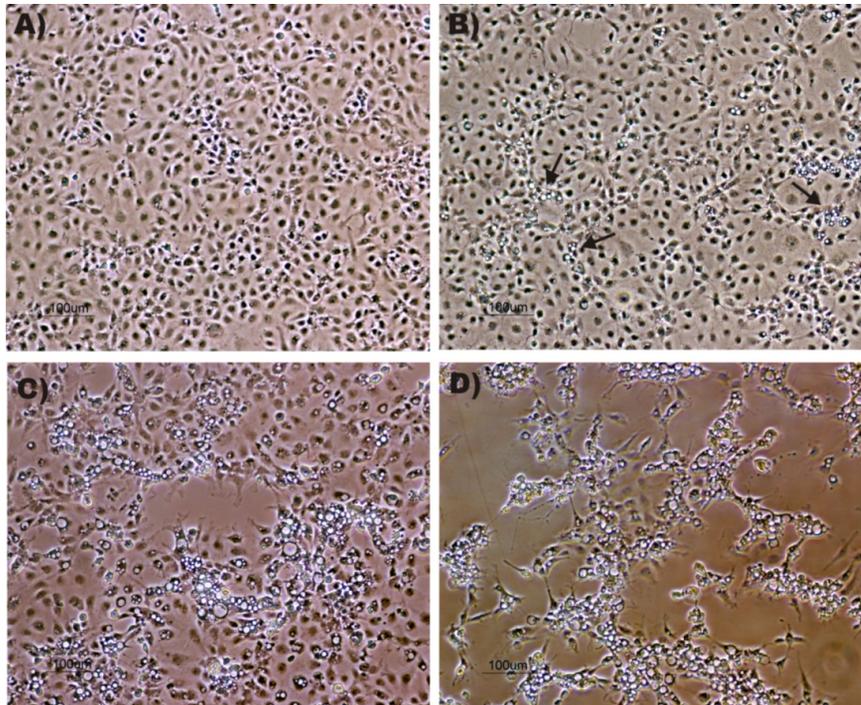


Figura 4 Desarrollo del ECP en la línea celular SSN-1 provocado por el NNV. A) Tapiz de células sin inocular. B) Cultivo a los 2 días donde se empieza a observar la formación de vacuolas. B) Efecto citopático observado a los 4 días de la inoculación. C) Efecto citopático observado a los 5 días de la inoculación.

Posteriormente se han descrito otras líneas celulares que presentan permisividad a algunas cepas. Así, se ha conseguido la propagación de un betanodavirus aislado de lubina (DIEV) en tres líneas celulares de peces: SBL, de larva de lubina, RTG-2 de gónada de trucha y BF-2, de alevín de mojarra de oreja azul (*Lepomis macrochirus*) que eran semipermisivas para este virus (Delsert y col., 1997). Las líneas celulares derivadas de mero de pintas naranjas (*E. coioide*) GF-1, de aleta, y GS, de bazo, se consideran eficaces en el aislamiento de nodavirus procedentes de mero (Chi y col. 1999a; Qin y col. 2006). También se ha estudiado la permisividad la línea celular SAF-1 (Bejar y col., 1997), derivada de dorada, *Sparus aurata* L.

que se demostró adecuada para la replicación y cuantificación de algunas cepas de betanodavirus (Bandín y col., 2006). Además en esta línea celular no se ha demostrado la presencia de retrovirus lo que podría indicar que en realidad el virus no necesita de la presencia del retrovirus para poder replicar. La línea celular de un pez tropical denominada SF se ha visto que es permisiva a una cepa de nodavirus aislada de mero (Chang y col., 2001), también dos líneas procedentes de bazo de mero de pintas naranjas (Qin y col., 2006), la línea GB obtenida de cerebro de mero amarillo (Lai y col., 2001a), la línea SB obtenida de larvas de perca gigante (Chew-lim y col., 1998), las células ASBB, procedentes de cerebro de juveniles de perca gigante (Hasoon y col., 2011) y las células Gl-av obtenidas de hígado de mero (Chen y col., 2006) también son permisivas para nodavirus del genotipo RGNNV.

Se ha descrito una baja permisibilidad en células de mamífero de las líneas celulares Cos-1 de simio y HeLa de carcinoma epiteloides humano, en las que se produce una baja producción de partículas virales (Delsert y col., 1997), sin embargo, Takizawa y col., (2008a) describen un nivel de propagación mayor en la línea celular derivada de un astrocitoma de murino (DBT).

2.6.3 Detección de los viriones, antígenos virales o genoma viral

Microscopía electrónica.- Técnica compleja especialmente en el caso de los betanodavirus cuando se encuentran en una baja concentración. En las preparaciones de individuos con patología se pueden ver los viriones libres en el citoplasma, o unidos al retículo endoplasmático de células nerviosas muy vacuolizadas, o formando agregados cristalinos (Azad y col., 2005; Bloch y col., 1991; Glazebrook y col., 1990; Nguyen y col., 1996; Renault y col., 1991) (Figura 5).

Serología.- Existen varias técnicas basadas en la unión específica antígeno-anticuerpo que se pueden utilizar para el diagnóstico de los betanodavirus. La Inmunofluorescencia (IFAT) es una técnica recomendada por la OIE en su Manual de diagnóstico de animales acuáticos (OIE, 2013) como técnica de diagnóstico. Es posible emplearla tanto para la identificación de las cepas en cultivo celular, como para la identificación directamente en cortes histológicos de tejido nervioso.

Por otro lado se ha descrito que la técnica de ELISA puede ser útil en la selección de reproductores libres de virus. Se han obtenido resultados satisfactorios en detección del virus en diferentes tejidos como son ovarios y en sangre (Arimoto y col., 1992; Breuil y Romestand, 1999; Watanabe y col., 2000). La ventaja principal de esta técnica es la posibilidad de procesar gran número de muestras de forma rápida y automatizada, no siendo requerido un observador experimentado para leer los resultados.

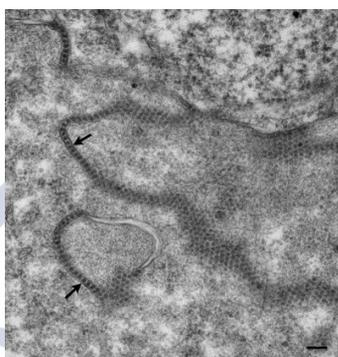


Figura 5 Electromicrografía de partículas virales de NNV en retina. Las flechas señalan los viriones asociados a la membrana del retículo endoplasmático liso. Escala 100 nm (Crane y Hyatt, 2011).

Técnicas moleculares.- Las técnicas moleculares están desbancado a las técnicas clásicas debido a sus múltiples cualidades: sensibilidad, especificidad, rapidez, y sencillez. El único inconveniente que se presenta es quizás su mayor coste y necesidad de inversión inicial en equipos más sofisticados. Aunque no es válido para el diagnóstico por sí sólo, como considera la OIE, sí es una herramienta indispensable en cualquier laboratorio de diagnóstico e investigación. En los últimos años se ha estado trabajando en la validación de sistemas de diagnóstico basado en estas técnicas mediante pruebas de eficiencia entre distintos laboratorios y pruebas de equivalencia respecto al método de referencia. La técnica molecular que permitió un mayor avance en el estudio y detección de los nodavirus fue la RT-PCR empleada para el diagnóstico desde 1994 (Nishizawa y col., 1994). La OIE recomienda para el diagnóstico de betanodavirus la pareja de cebadores (F2/R3) válida para el diagnóstico de los cuatro genotipos y que amplifican una región del ARN2 de 427 pb (región T4) (Nishizawa y col., 1997), aunque se ha visto que puede producir falsos negativos no siendo

suficientemente sensible para algún genotipo, por esta razón se han propuesto cebadores alternativos (Thiery y col., 1999). Otros autores han propuesto también otros métodos testados con cepas aisladas en el mediterráneo (Dalla Valle y col., 2000), y en aislados de aguas frías (Grotmol y col., 2000). Esta técnica se ha empleado también por muchos autores como base para el análisis filogenético de los distintos aislados encontrados. Se ha descrito una técnica de RT-PCR convencional asociada a la hibridación dot-blot que además de detectar el NNV permite discriminar entre genotipos existentes en una misma muestra y siendo adecuada para la detección en peces portadores (Lopez-Jimena y col., 2010a).

La técnica de la PCR en tiempo real se presenta en los últimos años como una técnica muy rápida, sencilla, sensible y que reduce el riesgo de contaminación en relación a otros métodos, pero sobre todo destaca frente a la PCR clásica por su capacidad de realizar una cuantificación precisa. Aparecen en la literatura diversos intentos de puesta a punto de esta técnica con variaciones en cuanto a la metodología: la Real-Time NASBA (*nucleic acid sequence based amplification*) (Starkey y col., 2004), se muestra más sensible que la RT-PCR con el inconveniente de que no detecta TPNNV, también se realizaron ensayos con SYBR Green (Ciulli y col., 2006a; Dalla Valle y col., 2005). Grove y col. (2006) desarrollaron y validaron un método de RT-PCR en tiempo real para detectar específicamente el virus de la necrosis nerviosa del fletán, aunque esta técnica se mostró ineficaz para la detección de NNV no aislados de peces de aguas frías. Hick y Whittington, (2010) optimizaron una RT-qPCR basada en TaqMan para la detección de betanodavirus, que se ha validado extensamente. La OIE recomienda el uso del método basado en TaqMan desarrollado por el Laboratorio de Referencia de la OIE, un método validado que reconoce el ARN2 de los cuatro genotipos establecidos, así como betanodavirus del bacalao del Atlántico y de fletán (Panzarin y col., 2010). Se han descrito otros sistemas de detección que se han centrado en aislados de zonas concretas o especies concretas, así Kuo y col. (2011) desarrollaron un método para la monitorización de betanodavirus aislados de las distintas especies de mero y Hodneland y col. (2011) probaron su método sólo con aislados procedentes de España. Recientemente se ha publicado un método basado en TaqMan que reconoce el ARN1 de aislados representativos de los cuatro genotipos que además tiene la ventaja de seguir un protocolo más sencillo que realiza la transcripción inversa y la PCR en tiempo real en un único paso (Baud y col., 2015).

Detección de anticuerpos específicos en el suero o fluidos corporales- Puede llegar a ser una técnica útil en estudios epidemiológicos aunque con el gran desarrollo de las técnicas moleculares parece no ser muy interesante a nivel de diagnóstico.

Actualmente la OIE recomienda el uso de RT-qPCR para la detección, el diagnóstico y especialmente la vigilancia de NNV. Además, para la detección y diagnóstico considera también apropiado el cultivo celular junto con la identificación del virus mediante IFAT o PCR y secuenciación.

3. INTERACCIONES VIRUS-HUÉSPED EN NNV

3.1 ESPECIFICIDAD DE HUÉSPED

Se ha observado una estrecha relación entre el genotipo de los aislados de NNV y la especie hospedadora. Así, el genotipo SJNNV incluye a los betanodavirus detectados en jurel dentón, que se aislaron por primera vez a partir de brotes infecciosos producidos en Japón en 1991 (Arimoto y col., 1993; Mori y col., 1992). El grupo TPNNV incluye un aislado de pez globo tigre, “tiger puffer” en inglés, (*Takifugu rubripes*) hallado en 1993 en Japón (Nakai y col., 1994). El grupo BFNNV incluye a los aislados encontrados en la zona atlántica relacionados con especies de aguas frías como “barfin flounder” (*Verasper moseri*), bacalo del Pacífico (*G. macrocephalus*), bacalao atlántico y fletán (Nylund y col., 2008; Sommerset y col., 2003). El grupo RGNNV incluye el mayor rango de hospedadores, principalmente especies de aguas templadas-cálidas como meros, lubina y aislados de falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*) (Munday y col., 2002).

La especificidad de huésped se ha estudiado en infecciones experimentales realizadas con distintas especies y diferentes aislados de NNV. Banu y col. en 2007 realizaron una infección cruzada por inyección intramuscular de una cepa RGNNV aislada en mero de diente largo (*E. moara*) y una cepa SJNNV procedente de jurel dentón. Observaron que las infecciones en los hospedadores naturales mostraban una mayor carga viral en los órganos nerviosos, mientras en las infecciones cruzadas, se obtenían cargas virales menores, sobretodo en mero infectado con la cepa SJNNV. Lo cual confirmaría que la capacidad infectiva del genotipo SJNNV está más restringida mientras que la cepa RGNNV se adapta mejor a otros hospedadores no

naturales. Totland y col. (1999) observaron una clara diferencia en la virulencia causada en fletán atlántico por una cepa SJNNV procedente de jurel dentón y una cepa BFNNV de fletán en jurel dentón. Tanaka y col. (2003) observaron diferencias en virulencia entre 7 especies infectadas con una misma cepa RGNNV incluyendo a los hospedadores naturales y no naturales. Se ha descrito que la especificidad de huésped en betanodavirus reside en el ARN2 (Iwamoto y col., 2004), y que está controlada específicamente por la región variable del ARN2 o región T4 (Ito y col., 2008).

Se sabe que los betanodavirus están en constante evolución, generando una enorme variabilidad genética que se ha asociado con la adaptación a nuevos huéspedes. La aparición de cepas recombinantes de betanodavirus se ha relacionado con la colonización de nuevas especies como el lenguado senegalés y la dorada (Oliveira y col., 2009). El análisis filogenético de aislados de distintas zonas geográficas reveló que el genoma de betanodavirus posiblemente evolucionó adaptándose a las distintas condiciones ambientales de los peces hospedadores (Panzarin y col., 2012), siendo la temperatura uno de los principales factores que influye en esta adaptación. Se ha descrito que la sensibilidad a la temperatura reside en la proteína A o polimerasa viral (Hata y col. 2010), y en betanodavirus se ha visto que la polimerasa viral tiene una tasa de evolución superior a la de la cápside (Panzarin y col., 2012). Esto también se ha podido comprobar en un análisis realizado por nuestro laboratorio en el que se observó que en cepas recombinantes RGNNV/SJNNV presentaban un ARN1 con 19 a 22 sustituciones en la proteína A respecto a la secuencia tipo de RGNNV, siendo la divergencia de la RpRd del 1,9% frente al 0,9% registrado en la proteína de la cápside (Oliveira y col., 2009).

3.2 TRANSMISIÓN

El NNV tiene una gran capacidad de transmitirse entre individuos (Glazebrook y col., 1990). Se ha descrito transmisión horizontal en numerosos estudios de infección experimental en larvas y juveniles. Se ha podido observar en barramundi *Lates calcarifer* (Glazebrook y col., 1990), jurel dentón (Arimoto y col., 1993; Totland y col., 1999), mero de pintas rojas, falso halibut del Japón y fletán (Mori y col., 1991; Arimoto y col., 1993; Nguyen y col., 1994) y lubina (Thiery y col., 1997; Peducasse y col., 1999). También se ha demostrado la existencia de transmisión vertical en jurel dentón (Nguyen y col., 1997), lubina (Breuil y col., 2002), fletán (Johansen y col., 2002) y barramundi (Azad y col., 2006). Algunos autores

opinan que existen otras rutas de infección posible a través de ciertos organismos que forman parte del alimento de los peces como es el caso de *artemia* (Skliris & Richards., 1998; Chi y col., 2003). La alimentación de los peces de cultivo a base de pescado crudo podría ser otra posible vía de infección (Mori y col., 2005). En ocasiones los peces adultos pueden actuar como portadores asintomáticos del virus constituyendo una fuente importante de mantenimiento y diseminación de la infección (Castric y col. 2001; Johansen y col. 2002).

3.3 TROPISMO

La unión de un virus a la célula huésped depende del reconocimiento específico de receptores en la superficie de la célula, la interacción virus-receptor desencadena posteriormente la penetración del virus dentro de la célula generalmente por medio de un mecanismo de endocitosis empleado por la célula huésped.

Los betanodavirus se consideran virus con un tropismo muy restringido (Comps y col., 1996; Iwamoto y col., 2004) Las lesiones que se observan en peces infectados por el NNV demuestran claramente un neurotropismo marcado, es decir, el virus infecta preferentemente células nerviosas, especialmente del sistema nervioso central y retina. Existe poca información acerca de las rutas de entrada del NNV. Se ha propuesto que el virus llega en primer lugar a la medula espinal, penetrando posiblemente por la piel a través de terminaciones nerviosas periféricas (Nguyen y col., 1996) o por el epitelio estratificado del intestino, al que llegarían gracias a la ingesta de agua a través de la única branquia de las larvas (Grotmol y col., 1999; Munday y col., 1992), y después a través del nervio vago se desplazarían al cerebro y finalmente a la retina (Banu y col., 2007; Nguyen y col., 1996). En mero carcelario se ha visto que la entrada del virus se produce probablemente por vía nasal (Banu y col., 2004), esta vía ha sido también propuesta en lubina después de detectar la presencia del antígenos del virus en los lóbulos olfatorios (Mladineo, 2003).

Una vez dentro del hospedador se cree que el virus se transmite a través de las conexiones sinápticas y no por el torrente sanguíneo (Ikenaga y col., 2002). Aunque la dispersión del virus por el torrente sanguíneo se considera poco probable (Banu y col., 2007), se ha detectado la presencia del virus en sangre en diferentes estudios (Chi y col., 2001b; Mazelet y col., 2011; Olveira y col., 2008), también se ha relacionado el NNV con lesiones en el endocardio de fletán del atlántico que presentaban patología aguda, lo que podría indicar que

después de la replicación inicial en los órganos diana, se produce una viremia dando lugar a una infección secundaria más generalizada (Grotmol y col., 1997). Por el contrario, Korsnes y col. (2009) sugieren la existencia de una viremia previa a la infección de tejidos nerviosos en una infección experimental de bacalao atlántico. Se cree que el NNV replica preferentemente en células nerviosas con capacidad para dividirse, lo que explicaría el hecho de que el virus sea especialmente virulento en peces que se encuentran en las fases tempranas del desarrollo (larvas y juveniles). Los peces adultos conservan esta capacidad en algunas regiones y se ha observado la existencia de NNV en agregados celulares que se corresponderían con estas zonas de proliferación (Johansen y col., 2002). Por otro lado, se cree que el virus puede adquirir un diferente tropismo en peces asintomáticos en los que se ha observado replicación en órganos no nerviosos, concretamente en gónadas, intestino, estómago, riñón e hígado (Nguyen y col., 1997).

En ensayos realizados *in vitro* mediante neutralización con anticuerpos específicos y mediante bloqueo de receptores con VLPs (*virus-like particles* o partículas virales sintetizadas que no contienen genoma) se ha demostrado que la unión del virus a la célula se produce a través de receptores específicos (Lai y col., 2001b; Lu y col., 2003; Mori y col., 2003).

3.4 REPLICACIÓN VIRAL

Los betanodavirus penetran en la célula hospedadora mediante endocitosis del virus en vacuolas intracelulares (Liu y col., 2005), y tras desprenderse de la cápside el genoma (ARN) es liberado en el citoplasma donde actúa como ARN mensajero para la síntesis de las proteínas virales, como molde para la síntesis de ARN de polaridad negativa y la replicación viral.

Actualmente existe poca información acerca de la replicación del NNV, sin embargo, sí se han realizado extensos estudios de otros virus que infectan a insectos pertenecientes a la familia *Nodaviridae*, como el virus *Flock House* (FHV) y el virus *Black beetle* (BBV), que han servido de modelo teniendo en cuenta que las distintas familias de virus de ARN de cadena positiva comparten características de replicación comunes.

La expresión génica y la replicación del NNV se produce en dos fases temporales: una primera fase de “replicación temprana” en la que se producen las proteínas no estructurales, incluida la polimerasa viral, y una fase de replicación “tardía” en la que se sintetizan las

proteínas estructurales. La replicación de los virus ARN(+) se produce generalmente en las membranas intracelulares de las células del huésped, en el retículo endoplasmático, aunque se ha visto también asociación con lisosomas, mitocondria, peroxisomas y otras membranas (Ahlquist y col., 2003). La replicación del virus FHV se produce asociada a la membrana externa de la mitocondria (Miller y Ahlquist, 2002). En NNV la polimerasa viral se asocia posiblemente también con la membrana mitocondrial (Guo y col., 2004; Mézeth y col., 2007). Inmediatamente después de la liberación del genoma en el citoplasma (infección temprana) se produce la traducción del ARN1 para sintetizar la proteína A, subunidad catalítica de la replicasa viral. A partir de ese momento comienza la replicación del ARN1 y se produce la síntesis de cadenas negativas que servirán de molde para la futura replicación del genoma viral, que será empaquetado dentro de la cápside para formar los viriones. Además, durante esta etapa temprana también se realiza la síntesis del ARN subgenómico, el ARN3, y se sintetizan las proteínas no estructurales B1 y B2. En FHV la proteína B2, aunque no es esencial, favorece la replicación (Ball, 1997). En el caso de NNV se ha observado gran acumulación de la proteína B2 durante la infección temprana en fletán atlántico (Sommerset y Nerland, 2004), y parece ejercer de antagonista de los ARN interferentes de la célula, actuando como supresor de las defensas del huésped y facilitando la acumulación intracelular de ARN viral (Fenner y col., 2006; Iwamoto y col., 2005). Más tarde, en la infección tardía, se inicia la replicación del ARN2, en este momento se suprime la replicación del ARN3 (Zhong y Rueckert, 1993), y se inicia además la síntesis de las proteínas necesarias para el ensamblaje de los nuevos viriones. En FHV se ha visto que existe una regulación de la síntesis del ARN2 por parte del ARN1, destinada a coordinar la producción de ambos segmentos genómicos de modo que no se empiece a sintetizar el segmento 2 hasta que se alcance una concentración del ARN1 suficiente (Eckerle y Ball, 2002), además se han identificado elementos reguladores en cis en los extremos 5' y 3' del ARN1 y ARN2 que intervienen en la regulación de la replicación (Venter y Schneemann, 2008), aunque también existen otros elementos en la secuencia interna de ambos segmentos (Liu y col., 2009). Finalmente, se produce el ensamblaje de las 180 copias que forman la proteína Cp, en FHV las proteínas ensambladas en el provirión sufren una modificación autocatalítica para dar lugar al virus maduro infeccioso (Ball, 1997), este proceso no ha sido observado en NNV.

3.5 BETANODAVIRUS Y CICLO CELULAR

La mayoría de los virus, durante alguna fase de la infección, sintetizan proteínas que son capaces de interferir en los mecanismos celulares modificando procesos implicados en la defensa y supervivencia celular. Uno de los métodos de defensa de las células del huésped frente a la infección viral es la inducción de la apoptosis o muerte celular programada, por ello, algunos virus sintetizan moléculas que interfirieren en las rutas que desencadenan la muerte celular como estrategia para retrasar este mecanismo y disponer del tiempo necesario para multiplicarse. En otros casos, son los propios virus los que al final del ciclo infeccioso desencadenan rutas de inducción de la apoptosis, lo que ayuda a la progenie viral a dispersarse y a evadir las defensas del huésped. Habitualmente, los productos virales controlan la supervivencia celular durante la infección creando un equilibrio entre la inhibición y la inducción de la muerte celular según sus necesidades (Roulston y col., 1999).

Se ha comprobado que los betanodavirus poseen mecanismos que modulan la apoptosis celular y desencadenan necrosis y muerte de las células infectadas. En células GL-av de hígado de mero se ha observado el proceso de necrosis originado en la infección de un betanodavirus RGNNV. A las 12h de la infección se produce una apoptosis inicial en la que se observa la exposición de fosfatidilserina en la superficie de la membrana celular, que actúa como un marcador de los estados iniciales de la apoptosis para que la célula sea reconocida y eliminada por los fagocitos, mientras que entre las 12 y 24h se observaron los cambios propios de la apoptosis media: pérdida del potencial de membrana en la mitocondria y alteraciones en el ADN y membrana plasmática. Entre las 24 y 48h se observó la condensación alterada de la cromatina y la ruptura de la membrana plasmática correspondientes a la post-apoptosis necrótica (Chen y col., 2006). Además, se ha observado que la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial desencadena la liberación del citocromo c a partir de las 24 h de la infección hasta las 48 h que actúa como señal para la necrosis celular (Chen y col., 2007).

Se han estudiado los mecanismos por los cuales los betanodavirus modulan la apoptosis en las células y se ha visto que la sobreexpresión de la proteína B1 produce una protección de la muerte celular en células infectadas con RGNNV; mientras que cuando se realiza el bloqueo de la expresión de esta proteína el número de células apoptóticas se incrementa (Chen y col., 2009). Por el contrario, en una infección en células GL-av se ha observado que la proteína B2

favorece la apoptosis mediante la inducción de la expresión del gen pro-apoptótico Bax (Su y col., 2009). En células GF-1 y embriones de pez cebra se ha visto que esta proteína reconoce específicamente la mitocondria donde bloquea el Complejo II, asociado a la membrana mitocondrial, que da lugar a la pérdida de potencial de membrana y a la inhibición de la síntesis de ATP, y finalmente a la necrosis y muerte celular (Su y Hong, 2010). Además, la proteína de la cápside estaría implicada en este proceso bloqueando la proteína ZfBcl-xL, de la familia de las Bcl-2, una proteína antiapoptótica, dando lugar a la necrosis secundaria (Wu y col., 2008). En células GF-1 también se ha observado que la infección de un virus RGNNV desencadena la respuesta al estrés del retículo endoplasmático (Su y col., 2011) y la inducción de la producción de especies reactivas del oxígeno durante las fases iniciales de la infección (Chang y col., 2011). Por otro lado, se ha podido comprobar que el virus RGNNV interviene en la regulación de las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 durante la fase intermedia de la apoptosis, 48 h después de la infección de células GF-1. (Su y col., 2011).

Los mecanismos de inducción de la necrosis parecen variar en función de la línea celular. Guo y col. en 2003, observaron que en la inducción de la necrosis celular de GGNNV en células SB de lubina interviene la cascada de las caspasas, lo que también se ha observado en la línea celular de aleta de mero GF-1 (Wu y col., 2008). Sin embargo, en la infección de RGNNV en células GL-av procedente de hígado de mero el proceso de inducción de la apoptosis sigue una ruta caspasa-independiente (Chen y col., 2006).

En base a los resultados obtenidos *in vitro* parece que la expresión de las proteínas virales de betanodavirus (Cp, B1 y B2) coordina la supervivencia de las células huésped durante el proceso de infección. Así, la proteína B1, que se sintetiza durante la infección temprana, actuaría como anti-apoptótica, durante la fase de multiplicación del virus, mientras que la proteína B2 y Cp actuarían como pro-apoptóticas durante las fases finales de la infección, promoviendo la muerte celular y facilitando la liberación y propagación del virus (Sepulcre y col., 2010).

3.6 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD

La estrategia actual para el control de la necrosis nerviosa viral pasa por tres puntos clave: medidas de higiene estrictas, acciones profilácticas directas y diagnóstico periódico de portadores, haciendo hincapié en la selección de stocks de reproductores y en la introducción de peces salvajes libres del virus. Hasta el momento no existe ningún tratamiento totalmente efectivo contra el virus, si bien se ha probado el efecto de diferentes compuestos contra el virus, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se ha analizado el efecto del tratamiento con yodo y cloro, que se muestran bastante efectivos a bajas concentraciones consiguiendo la inactivación de SJNNV (Arimoto y col., 1996). Peores resultados se han obtenido en tratamiento con formol en ensayos de inactivación de betanodavirus de lubina (Frerichs y col., 2000). La desinfección de huevos con ozono se muestra particularmente efectiva y capaz de neutralizar el virus adherido a su superficie reduciendo de este modo la transmisión de la enfermedad a la progenie (Grotmol & Totland, 2000, Buchan y col., 2006). También se ha descrito la importancia de tratar el agua con ozono para reducir la presencia viral (Munday y col., 2002) o con radiación UV (Arimoto y col., 1996; Frerichs y col., 2000).

Otra tipo de compuestos son los de origen natural con actividad antiviral. En betanodavirus, se han realizado estudios *in vitro* con distintos compuestos que producen la reducción de la replicación viral y el aumento de la supervivencia celular. Se observó un efecto antiviral de 3 péptidos antimicrobianos (AMPs) originados en mero, tilapia y camarón (Chia y col., 2010; Wang y col., 2010) y del metil-2-furancarboxilato obtenido de una actinobacteria (Suthindhiran y col., 2011). Asimismo, se ha observado un efecto antiviral en diversos compuestos de origen vegetal como el oligonol, un polifenol derivado de la fruta lichi (Ichinose y col., 2013), y de compuestos extraídos de la hojas de la planta *Eclipta prostrata* (Krishnan y col., 2010), y de la planta *Gymnema sylvestre* (Gopiesh Khanna y col., 2011).

Sin duda el mejor control viene dado por la aplicación de una vacuna efectiva, y aunque actualmente no hay ninguna disponible comercialmente, se han hechos varios estudios al respecto. Se ha conseguido inmunización a través de la inyección intramuscular de una proteína recombinante de la cápside de SJNNV en rodaballo y fletán (Húsagağ y col., 2001).

Resultados similares se obtuvieron en mero carcelario, *E. septemfasciatus*, mediante la inyección intramuscular de la proteína de la cápside recombinante de RGNNV expresada en *E. coli* (Tanaka y col., 2001). También se probó la eficacia de una vacuna basada en un proteína de la cápside recombinante de SJNNV administrada en juveniles de rodaballo mediante inyección intraperitoneal (Somerset y col., 2003) y en estudios posteriores se utilizaron dos métodos distintos basados en la cápside de AHNV: por un lado emplearon una proteína recombinante, y por otro lado una vacuna de ADN con el gen de la proteína. Los resultados fueron satisfactorios en el primer caso pero no fue así con la vacuna de ADN (Somerset y col., 2005). Se ha probado también la inmunización en mero jorobado, *Cromileptes altivelis* inyectado con una proteína de la cápside recombinante (Yuasa y col., 2002). Se obtuvieron unos resultados muy prometedores basados en la inyección intramuscular en lubina de una vacuna formada por partículas virales que se forman a través del ensamblaje espontáneo de proteínas de la cápside (VLPs) expresadas en baculovirus recombinante (Thiéry y col., 2006). También se obtuvo una buena estimulación de anticuerpos mediante inyección intramuscular de VLPs producidos en *E. coli* en mero lanceolado que proporcionaba una inmunización frente a betanodavirus de hasta 5 meses (Liu y col., 2006) y en mero de pintas naranjas (Lai y col., 2014). Recientemente, se ha obtenido una protección del 100% en mero carcelario frente a RGNNV tras la inyección intraperitoneal de VLPs obtenidas de la levadura de la cerveza *Saccharomyces cerevisiae* (Wi y col., 2015).

Por otro lado, se realizaron estudios en los que se emplearon virus atenuados. Se ha visto que la administración de vacunas con virus atenuados por inyección intramuscular en reproductores de mero patata, *E. tukula*, confiere protección frente a betanodavirus en la progenie, reduciendo así la transmisión vertical del virus (Kai y col., 2010). También se ha probado la administración intraperitoneal de una vacuna de virus atenuados con formalina en juveniles de mero carcelario, consiguiendo reducción importante de la mortalidad (Yamashita y col., 2005). En esta misma especie se ha realizado un estudio con virus atenuados para evaluar el efecto de la temperatura y la transmisión horizontal del virus después de la vacunación obteniendo altas tasas de supervivencia (Oh y col., 2013). Yamashita y col. en 2009 propusieron la utilización de un aquabirnavirus como inmunomodulador, un estudio realizado en mero carcelario observaron que la administración de un aquabirnavirus avirulento suprimía la infección secundaria de betanodavirus.

Se han ensayado sistemas de vacunación alternativos a la inyección, Kai y Chi (2008) testaron la inmunización mediante baño con virus inactivados en larvas de mero de pintas naranjas. Se ha ensayado también la administración oral de una vacuna mediante el uso de *Artemia* como vector (Lin y col., 2007), siendo además una técnica que presenta la ventaja de ser menos estresante para el pez. Más recientemente, se ha investigado una vacuna formada por *Vibrio anguillarum*, que expresaba una proteína recombinante de la cápside de betanodavirus como antígeno, inactivado y encapsulado en *Artemia* para su administración oral. Mediante este sistema se obtuvo reducción de la mortalidad en alevines de mero de pintas naranjas y una alta estimulación del sistema inmune con un menor tiempo de incubación (Chen y col., 2011). Se realizó un ensayo con VLPs administradas oralmente en mero lanceolado pero con resultados de protección mucho más bajos que con la inyección intraperitoneal: 57% de supervivencia frente a un 100%, respectivamente (Wi y col., 2015).

La inmunización con virus en combinación con el ácido poliinosínico-policitídico (poli I:C), un ARN sintético de doble cadena, se ha visto que confieren protección en mero carcelario frente a un betanodavirus del genotipo RGNNV (Nishizawa y col. 2009). En esta misma especie Oh y col. (2012), en un estudio de campo, observaron que la administración de poli I:C intramuscularmente 20 días después de un brote infeccioso producía protección frente a betanodavirus y aumentaba la tasa de supervivencia.

Se han realizado muchos estudios sobre la inmunización de peces frente a betanodavirus, sin embargo, la vacunación frente a estos virus presenta la dificultad de tener que inmunizar a los peces en edades muy tempranas ya que el NNV afecta especialmente a larvas y juveniles. En estas fases del desarrollo los peces son demasiado pequeños por lo que los sistemas de vacunación mediante inyección son poco recomendables, siendo más efectivos los sistemas de vacunación masiva como la vacunación por baño. Además, en estos estados, los peces poseen un sistema inmune inmaduro lo que dificulta la protección a largo plazo. Por todo ello, se ha sugerido que la mejor estrategia para hacer frente a los betanodavirus sería administrar inmunoestimulantes en larvas y juveniles, y una vez que el sistema inmune del pez está desarrollado proceder a la vacunación (Patel y Nerland, 2014).

4. LA RECOMBINACIÓN EN VIRUS

Los virus, y en especial los virus ARN, poseen una gran capacidad para diversificarse y evolucionar. La generación de mutaciones y el intercambio de material genético por recombinación son los dos procesos que dan lugar a su gran variabilidad genética. La recombinación consiste en la interacción física entre genomas víricos durante una superinfección, que da origen a una combinación de genes no presente en ninguno de los genomas parentales (Cann, 2009). La recombinación es un fenómeno muy extendido en virus y juega un papel clave en su evolución, se ha asociado con la modificación del tropismo y de la transmisión, la evasión del sistema inmune del huésped, la resistencia a los antivirales, la emergencia de nuevos virus, el incremento de la virulencia y la patogénesis, y la expansión del rango de hospedadores (Simon-Loriere y Holmes, 2011).

Existen tres mecanismos por los cuales se produce este fenómeno dependiendo de la organización del genoma vírico: la recombinación intramolecular homóloga, intramolecular heteróloga y el reordenamiento o intercambio de segmentos genómicos. Se produce una recombinación homóloga cuando se intercambia material genético en el mismo sitio de las cadenas en ambos virus parentales, mientras que la recombinación no homóloga o ilegítima se produce en diferentes sitios de la cadena nucleotídica y frecuentemente da lugar a estructuras aberrantes. El reordenamiento o recombinación de segmentos genómicos conocida como *reassortment*, es un tipo de recombinación que se produce en virus con genomas segmentados, los cuales pueden intercambiar segmentos completos dando lugar a nuevas combinaciones. Es el sistema de diversificación genética con más relevancia en virus debido a la posibilidad de crear rápidamente diferentes variantes de virus con distintos fenotipos. El intercambio genómico se produce cuando dos o más virus co-infectan una única célula huésped y en el momento del empaquetamiento incorporan segmentos de diferentes orígenes en la progenie viral. Este intercambio no suele ser recíproco, por lo que el virus que recibe la nueva porción genómica no suele actuar como donante para reemplazar la porción en el virus de origen (Pérez-Losada y col., 2015). La frecuencia de recombinación de segmentos genómicos varía en las distintas especies de virus segmentados, se ha visto que virus como los Hantavirus, Lassa virus y Tenuivirus, exhiben unos niveles relativamente bajos de intercambio de segmentos, mientras que otros como el virus de Influenza A, Rotavirus A y Cystovirus muestran altas tasas de este evento (Simon-Loriere y Holmes, 2011). En un estudio en el que

se analizaron muestras de campo durante varios años del virus La Crosse, género *Bunyavirus*, se observó que el 25% de las muestras analizadas contenían virus recombinantes demostrando la alta frecuencia de este fenómeno en la naturaleza (Reese y col., 2008).

Uno de los mejores ejemplos de este tipo de recombinación es la cepa altamente virulenta H5N1, que dio lugar a la llamada gripe aviar. Este virus se originó como resultado de varios intercambios de segmentos genómicos entre una cepa de ave H9N2 con un segmento 4 codificante de la hemaglutinina (HA) procedente de la cepa H5N1 de ganso y con el segmento 6 que codifica la neuraminidasa (NA) de una cepa de pato H6N1 (Guan y col., 2002).

Se han propuesto dos sistemas de adquisición de segmentos exógenos, por un lado el empaquetamiento aleatorio que asume que el virus no reconoce entre segmentos propios y ajenos, y por otro lado se ha propuesto la existencia de un sistema selectivo en el que estarían involucradas señales específicas de empaquetamiento (McDonald y Patton, 2011). Los estudios de análisis de bases de datos y diversos experimentos realizados *in vitro* han demostrado en los últimos años que el intercambio genético no es un proceso al azar, sino que existen mecanismos por los cuales algunos intercambios se ven favorecidos sobre otros (Escriu y col., 2007). En reovirus se ha visto que la incorporación de segmentos heterólogos no es al azar sino que se trata de un mecanismo más complejo en el que son necesarias unas mutaciones para que el virus acepte estos segmentos (Joklik y col., 1995), y que la incorporación un ARN de cadena simple genéticamente manipulado depende de una secuencia específica de la región no codificante 5' (Roner y col., 2004). En el virus Influenza las interacciones específicas entre segmentos de ARN intervendrían en la incorporación selectiva de segmentos durante el ensamblaje limitando la recombinación entre virus divergentes (Essere y col., 2013). En el virus de la enfermedad hemorrágica epizoótica (EHDV), virus del género *Orbivirus*, se ha observado una diferente frecuencia de recombinación de tres proteínas estructurales, las cepas cuyos virus parentales eran del serotipo 1 y 2 requerían un empaquetamiento de segmentos homólogos de la VP2, VP5 y VP7, mientras que los virus resultantes de la co-infección entre serotipo 2 y 6 presentaba VP2 y VP5 del serotipo 6, pero habían aceptado la VP7 correspondiente al tipo 2 (Anbalagan y col., 2014). En un estudio *in vitro* de co-infección realizado con Hantavirus se vio que todos los virus originados presentaban segmentos S y L homólogos, mientras que el segmento M era el único que se intercambiaba (Kirsanovs y col., 2010). Se han realizado diversos estudios

aunque poco se sabe de los factores que afectan a la frecuencia de generación de las nuevas poblaciones virales por este mecanismo.

Conocer el fenotipo de las distintas combinaciones es una herramienta muy útil a la hora de conocer los mecanismos que regula cada segmento y sus implicaciones en la virulencia y colonización de nuevos huéspedes. Comparando 2 cepas de Influenza aisladas de una población de cerdos (un genotipo similar al H3N2 humano y un doble recombinante derivado de H3N2 y el aviar H5) se ha comprobado que la cepa recombinante presentaba mayor afinidad por un receptor celular humano, además de presentar mayor replicación en cultivo celular y mayor virulencia en ratones que la cepa no recombinante (Cong y col., 2014). Asimismo, los recombinantes entre cepas atenuadas y cepas virulentas del virus de la lengua azul poseen una mayor virulencia *in vitro* que las cepas parentales (Coetzee y col., 2014). El intercambio de segmentos genómicos es un fenómeno que hay que tener en cuenta en el desarrollo de vacunas formadas por virus atenuados. Actualmente se busca cuantificar la tendencia de los distintos virus a formar determinadas combinaciones para intentar predecir la aparición de cepas virales que presenten un riesgo potencial para la salud y el medioambiente (Greenbaum y col., 2012)

La existencia de recombinación de segmentos genómicos ha sido descrita en virus de peces, en IPNV (Romero-Brey y col., 2009), ISAV (Devold y col., 2006), y betanodavirus tal y como se ha descrito anteriormente y se abordará con más detenimiento a lo largo de este trabajo.

5. EN ESTE TRABAJO

En 2009, un estudio realizado por nuestro laboratorio describió el aislamiento de betanodavirus procedentes de lenguado y de dorada, cultivados en diferentes instalaciones acuícolas de España y Portugal, que presentaban sintomatología típica de la necrosis nerviosa viral (Oliveira et al., 2009). El análisis filogenético en base a los dos segmentos genómicos de estos aislados reveló que se trataban de cepas recombinantes que poseían un ARN1 de tipo RGNNV (con una homología del 97,1%) y un ARN2 de tipo SJNNV (homología del 98,3%). Además, la comparación de las secuencias de la polimerasa y de la proteína de la cápside con sus respectivos genotipos parentales mostró la existencia de diferencias tanto a nivel genómico como proteómico. En la proteína de la cápside se observaron hasta un máximo de

5-6 sustituciones aminoacídicas (3 compartidas por todos los aislados) y en la polimerasa 20-22, lo que suponen un 0,9 y 1,9% de sus respectivas secuencias. De las sustituciones observadas en la cápside, 2 residuos compartidos por todas las cepas (posiciones 247 [Alanina→Serina] y 270 [Asparagina→Serina]) se encontraban en el extremo carboxilo-terminal, una región implicada en la especificidad de huésped en el NNV (Iwamoto y col., 2004; Ito y col., 2008), por lo que cabe esperar que estos cambios estén directamente relacionados con la infección de lenguado y dorada por parte de estas cepas recombinantes

En este trabajo se pretende analizar la implicación de la recombinación de segmentos genómicos en la adaptación de los betanodavirus a nuevas especies. Para ello se utilizará una de las cepas recombinantes aislada de lenguado, y como animales de experimentación, el lenguado, su huésped natural, y el rodaballo, debido a que las dos especies se cultivan en áreas próximas y tienen gran importancia para la industria de la acuicultura en Galicia.





OBJETIVOS





OBJETIVOS

El principal objetivo del presente trabajo es investigar el efecto que la recombinación de segmentos genómicos tiene en la adaptación de betanodavirus a nuevos hospedadores como el lenguado senegalés, y rodaballo, la especie de cultivo más importante de la acuicultura en Galicia.

Los objetivos específicos se resumen en los siguientes puntos:

1. Comparar la susceptibilidad del lenguado a una cepa recombinante RGNNV/SJNNV y a las cepas de tipo parental (RGNNV and SJNNV) usando dos rutas distintas de infección.
2. Investigar el papel de los aminoácidos 247 y 270 localizados en el extremo C-terminal de la proteína de la cápside como posibles determinantes de virulencia en las cepas recombinantes de betanodavirus.
3. Evaluar la susceptibilidad del rodaballo a un aislado recombinante procedente de lenguado senegalés e investigar el papel de los aminoácidos 247 y 270 en la especificidad de huésped.
4. Investigar el efecto de la temperatura en la infección de betanodavirus y la transmisión horizontal en lenguado senegalés.





AIMS



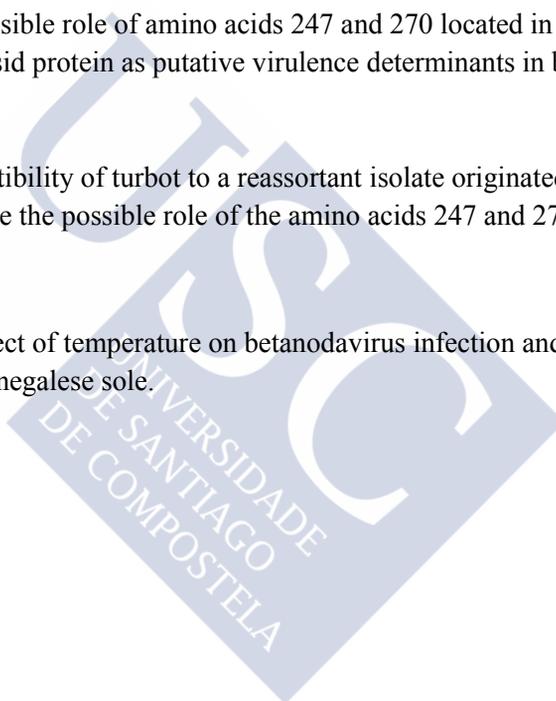


AIMS

The main objective of the present study was to investigate the effect of reassortment on the adaptation of betanodavirus to new host species as Senegalese sole, and turbot, the most important farmed fish species in Galician aquaculture.

The specific aims could be summarized as follows:

1. Compare the susceptibility of sole to a reassortant RGNNV/SJNNV strain and to the two parental strains (RGNNV and SJNNV) using two different routes of infection.
2. Investigate the possible role of amino acids 247 and 270 located in the C-terminal domain of the capsid protein as putative virulence determinants in betanodavirus reassortant strains.
3. Assess the susceptibility of turbot to a reassortant isolate originated from Senegalese sole and investigate the possible role of the amino acids 247 and 270 in host specificity.
4. Investigate the effect of temperature on betanodavirus infection and horizontal transmission in Senegalese sole.





CAPÍTULO 1:

COMPARACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LENGUADO SENEGALÉS A LA CEPA RECOMBINANTE Y GENOTIPOS PARENTALES.

**Experimental susceptibility of European sea bass and
Senegalese sole to different betanodavirus isolates.**

Vet. Microbiol. **177**, 53–61 (2015).



1. INTRODUCCIÓN

La creciente saturación en el mercado de especies cultivadas, como la lubina o la dorada, ha llevado en los últimos años a la expansión de la acuicultura hacia el cultivo de especies alternativas. Destaca entre ellas el lenguado senegalés, *Solea senegalensis*, una especie apreciada por los consumidores, con una alta demanda en los mercados y elevado precio. Por ello, y tras muchos años de investigación, se ha convertido en una de las especies con mayor potencial para el cultivo en Europa (Bjørndal & Guillen, 2014).

Sin embargo, la producción a escala industrial se ve fuertemente afectada por la dependencia de los stocks procedentes del medio natural, debido a la dificultad de esta especie para reproducirse en cautividad en la primera generación (F1). Actualmente, aunque todavía no se dispone de un sistema de puestas viables al alcance de todas las empresas productoras, se han conseguido importantes avances en este campo (Cañavate, 2013).

El otro gran problema que afecta al cultivo de esta especie es la aparición de procesos patológicos, fundamentalmente de carácter infeccioso. Las condiciones derivadas del cultivo intensivo, principalmente la alta densidad de peces, el estrés generado por el manejo y el escaso conocimiento de las necesidades fisiológicas de esta especie favorecen la aparición de brotes infecciosos (Cañavate, 2005). Además, en este caso, el control de este tipo de enfermedades es especialmente importante porque como ya se ha indicado es necesario introducir en las explotaciones ejemplares que provienen de ambientes naturales y que pueden introducir nuevos agentes infecciosos.

Hasta el momento, el cultivo del lenguado se ha visto afectado principalmente por patologías de origen bacteriano. En este sentido cabe destacar la fotobacteriosis ocasionada por *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* (Zorrilla y col., 1999), tenacibaculosis o flexibacteriosis ocasionada por *Tenacibaculum maritimum* (Cepeda y Santos, 2002), vibriosis causadas fundamentalmente por *Vibrio anguillarum* (Toranzo y col., 2003), y en menor medida por *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* (Zorrilla y col., 2003). Más recientemente, se ha descrito la existencia de furunculosis originada por *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* (Magariños y col., 2011) y edwardsielosis, una patología emergente, causada por *Edwardsiella tarda* (Castro y col., 2012a). Para intentar frenar el impacto que estos patógenos tienen sobre el cultivo, se han desarrollado diferentes vacunas (Barja y col., 2009; Gudding y

Van Muiswinkel, 2013). Recientemente se ha descrito la aparición de problemas de origen parasitario, es el caso de la amebiasis sistémica, patología producida por amebas (Constenla y col., 2014).

Por otro lado, se han producido aislamientos de diferentes virus en esta especie causantes de patología; es el caso del aquabirnavirus del lenguado (Rodríguez y col., 1997) y el virus de la linfocistis (Alonso y col., 2005). También se ha demostrado la susceptibilidad del lenguado al virus de la septicemia hemorrágica viral (López-Vázquez y col., 2011).

En la última década el lenguado senegalés ha engrosado la larga lista de especies susceptibles a la infección por betanodavirus, el virus objeto de este estudio, con la aparición de diferentes brotes epidémicos de encefalopatía y retinopatía viral (VER) en explotaciones comerciales del sur de la Península Ibérica.

En 2004 Thiéry y col. describieron el primer aislamiento de betanodavirus en lenguado senegalés procedente de una piscifactoría española. El genotipado de este aislado, realizado en base al análisis de la región T4 del ARN2, indicó que se trataba de un virus tipo SJNNV, un genotipo hasta ese momento restringido a aguas de Japón. En 2007, nuestro laboratorio publicó el análisis filogenético, basado también en la región T4, de un numeroso grupo de aislados y secuencias de betanodavirus obtenidos de lenguados procedentes de piscifactorías de la Península Ibérica (Cutrín y col., 2007) y demostró que todos pertenecían al genotipo SJNNV.

En el año 2009, nuestro grupo, a través del análisis completo de ambos segmentos genómicos, demostró que las cepas aisladas de lenguado en la Península Ibérica hasta ese momento eran, en realidad, recombinantes que poseían un ARN2, codificante de la cápside, perteneciente al genotipo SJNNV y un ARN1, codificante de la polimerasa viral, de tipo RGNNV (Oliveira y col., 2009). La existencia de intercambio de segmentos genómicos entre betanodavirus en la naturaleza había sido descrita dos años antes (Toffolo y col., 2007) en un estudio en el que 2 cepas de un grupo de 27 betanodavirus presentaban un ARN1 de tipo SJNNV y un ARN2 perteneciente al genotipo RGNNV. Estas cepas se obtuvieron de lubinas que presentaban signos clínicos. Más recientemente, Panzarin y col. (2012), han descrito el aislamiento de cepas recombinantes del mismo tipo (RGNNV/SJNNV) a partir de lenguados cultivados en Italia, así como de lubina y lenguado común e incluso invertebrados marinos. Hasta el momento, sólo se han descrito mortalidades por VER en lenguados infectados con

cepas recombinantes en condiciones de cultivo (Oliveira y col., 2009) y no existen datos de la susceptibilidad del lenguado senegalés frente a otras cepas de betanodavirus.

OBJETIVO

En el presente capítulo se analizará la susceptibilidad del lenguado senegalés a tres cepas de betanodavirus: un aislado procedente de lenguado y con genoma recombinante RGNNV/SJNNV, y dos cepas pertenecientes a los genotipos parentales: RGNNV y SJNNV. Asimismo, se comparará la capacidad de replicación de las tres cepas en el cerebro y otros órganos/tejidos de peces infectados mediante cuantificación de copias genómicas y recuperación de partículas infectivas.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LÍNEA CELULAR

Los aislados virales de betanodavirus se propagaron en la línea celular de morfología fibroblástica E-11 (Iwamoto y col., 2000), un subclón de la línea celular SSN-1 derivada de alevines de cabeza de serpiente cabrío, en inglés “snakehead”, (*Channa striatus*) (Frerichs y col., 1991). Esta línea celular se sabe que está infectada persistentemente por un retrovirus (*snakehead retrovirus*, SnRV).

Para el crecimiento celular se utilizó el medio L-15 de Leibovitz suplementado con un 5% de suero fetal bovino (FBS) y los antibióticos penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) y se incubó a una temperatura de 25°C hasta alcanzar la semiconfluencia (crecimiento de 75-80% aproximadamente). El mantenimiento de las monocapas se realizó con medio de cultivo L-15 suplementado con un 2% de suero fetal de ternera (FBS), y a la misma temperatura de incubación.

Para el subcultivo de las monocapas celulares se aplicó un ratio 1:3, y se utilizó tripsina al 0,25% en tampón diluyente (NaCl 0,14 M; KH₂PO₄ 1,47 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; Na EDTA 0,54 mM; rojo fenol 0,1%; pH 7,0), siguiendo el procedimiento estándar descrito por Kuchler (1997).

2.2 CEPAS VIRALES Y PROPAGACIÓN VIRAL

Para el análisis de susceptibilidad del lenguado se utilizaron tres cepas de betanodavirus, cuyas características se detallan a continuación: la cepa SpSs-IAusc160.03 (Ss160.03 para mayor brevedad), aislada en nuestro laboratorio a partir de ejemplares de lenguado senegalés que presentaban sintomatología típica de VER y que es un recombinante con genotipo RGNNV/SJNNV (Oliveira y col., 2009), como representantes de los genotipos parentales se eligió la cepa ERV378/102-5/04 (para acortar ERV378), perteneciente al genotipo RGNNV, amablemente cedida por el Dr. G. Bovo (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italia), y la cepa de referencia SJNag93, perteneciente al genotipo SJNNV.

La propagación de los aislados en cultivo celular se realizó mediante adsorción en frascos de 75 cm². Se retiró el medio de cultivo, se añadieron 100 µl de suspensión viral a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1-1 virus/célula y el frasco se mantuvo en agitación a

25°C durante una hora. Posteriormente se retiró el inóculo, y se cambió por medio L-15 suplementado con antibióticos y con un 2% de FBS, y se incubó a 25° C hasta un máximo de 10 días. Tras la observación de un efecto citopático (ECP) avanzado se recogió el sobrenadante en un tubo (virus crudo) y se centrifugó a $3.000 \times g$ durante 15 minutos a 4 °C para eliminar los restos celulares. Finalmente, se almacenó a -80° C hasta el momento de su utilización.

2.3 TITULACIÓN VIRAL

Para proceder a la titulación viral se realizaron diluciones seriadas del virus problema, preparadas en tampón Earle's suplementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) que se inocularon por triplicado en placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían monocapas semiconfluentes de E-11. La visualización del ECP se llevó a cabo transcurridos 7 días de incubación, los títulos se calcularon siguiendo el método descrito por Reed y Muench (1938) y se expresaron como la dilución del virus que produjo ECP en el 50% de los pocillos inoculados (TCID₅₀/ ml).

2.4 ACLIMATACIÓN Y MANEJO DE LOS PECES

Se utilizaron lenguados (*Solea senegalensis*) de dos tamaños distintos, 2 y 5 g de peso medio. Los peces, suministrados por una piscifactoría comercial, se mantuvieron en las instalaciones del acuario de la Universidad de Santiago de Compostela.

Se realizó un período de aclimatación de 15 días a 16°C (temperatura de las instalaciones) con aireación continua y un sistema de agua cerrado. Los peces se alimentaron diariamente *ad libitum* con pienso suministrado por la piscifactoría de origen. Los tanques se limpiaron cada día, eliminando restos de comida y heces, y el agua se renovó parcialmente una vez por semana.

Durante este período se realizó un examen virológico y bacteriológico de 10 peces para asegurar la ausencia de agentes infecciosos. El análisis virológico incluyó el diagnóstico mediante cultivo celular y RT-PCR de betanodavirus, Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV), y el Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV). El análisis bacteriológico se llevó a cabo en la sección de bacteriología de la Unidad de Ictiopatología del Instituto de Acuicultura. La

detección de betanodavirus se realizó usando una combinación de RT-PCR e hibridación dot-blot, siguiendo las indicaciones de Lopez-Jimena y col. (2010a). Para el diagnóstico de IPNV, VHSV, e IHNV se realizó una RT-PCR seguida de nested-PCR siguiendo los procedimientos descritos por Lopez-Jimena y col. (2010b), López-Vázquez y col. (2006) y Dopazo y col (2002), respectivamente.

Después de la aclimatación inicial se inició el proceso de aclimatación a 22°C (temperatura de experimentación), la temperatura del agua se incrementó a razón de 1°C/día durante 6 días empleando calentadores.

Durante el desarrollo de los experimentos se siguieron las directrices marcadas por la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) para minimizar el sufrimiento de los animales. Además, los protocolos experimentales se llevaron a cabo con la aprobación de los Comités de bioética y de experimentación animal de la Universidad de Santiago de Compostela, así como de la Xunta de Galicia (Id Permiso. 15004AE/12/INV392MED02/ANIMAL[05]/IBM4 y Permiso Id. 15004/13/002).

Los peces se mantuvieron inicialmente en tanques de almacenamiento de 300 L. Posteriormente se distribuyeron de acuerdo con las necesidades experimentales, en tanques de 100 L o 50 L. Antes de iniciar la infección experimental los peces se sometieron a un período de 24 h de ayuno.

2.4.1 Infección por baño

Los lenguados de menor tamaño (peso medio 2 g) se distribuyeron en 4 tanques de 50 L (100 peces/tanque). La infección con cada una de las cepas se realizó a 22 °C mediante inmersión en un baño con una concentración viral de 10^5 TCID₅₀/ml, con fuerte aireación durante 3 h. Transcurrido ese período se redujo la aireación a niveles moderados y se añadió agua hasta completar el tanque. Los peces se mantuvieron a la misma temperatura durante 30 días, durante los cuales se vigilaron los tanques para detectar individuos con signos clínicos y retirar las bajas. Los peces control se sumergieron en un baño con medio L-15 bajo las mismas condiciones que los grupos infectados. Al final del experimento los peces supervivientes se sacrificaron empleando una sobredosis de metasulfonato de triclaína (MS-222, Sigma).

2.4.2 Infección por inyección intramuscular

Los lenguados de mayor tamaño (peso medio 5 g), previamente distribuidos en tanques de 100 L (60 peces/tanque), se inocularon por inyección intramuscular con 0,1 ml de virus a una dosis de 10^5 TCID₅₀/pez para cada una de las cepas. Los peces se mantuvieron a 22°C durante 41 días. A los peces control se les inyectó 0,1 ml de medio L-15. Los tanques se supervisaron diariamente para anotar la aparición de signos clínicos y retirar los peces muertos. Los peces supervivientes se sacrificaron como se describe en el apartado anterior.

2.5 PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Los peces muertos se recogieron diariamente y se guardaron hasta su análisis a -80 °C. Para confirmar la presencia de betanodavirus en los peces inoculados, a los ejemplares de mayor tamaño (5 g) se les extrajo el cerebro en condiciones asépticas, mientras que a los peces de 1 g, debido a su pequeño tamaño, se les extrajo la parte anterior de la cabeza incluyendo los ojos. Los diferentes órganos/tejidos se analizaron en lotes correspondientes a 5 individuos y cada lote se consideró una muestra. Para ello, cada muestra se introdujo en una bolsa estéril de *Stomacher*, se pesó, y se trituró mediante rodillo manual. A continuación se realizó una dilución 1:10 p/v con tampón Earle's suplementado con antibióticos (1000 UI/ml de penicilina, 1000 µg/ml de estreptomina, 500 µg/ml de gentamicina y 10-20 µg/ml de fungizona), y se volvió a triturar hasta obtener una mezcla lo más homogénea posible. Seguidamente la suspensión se centrifugó a baja velocidad ($1.500 \times g$) durante 20 min a 4° C, para precipitar los restos celulares. El sobrenadante, previa separación de una alícuota para la extracción del ácido nucleico, se transfirió a un tubo estéril y se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas, para permitir la actuación de los antibióticos, y eliminar la posible contaminación bacteriana y fúngica. Transcurrido ese tiempo se conservó a -80° C.

2.6 EXTRACCIÓN DEL ARN VIRAL

La extracción del ARN total se realizó con el kit comercial *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial, con ligeras modificaciones. A 150 µl de muestra se le añadieron 350 µl de tampón de lisis RLT, suplementado con β-mercaptoetanol (a una concentración final de 0,14 M), y se homogenizó pipeteando. A continuación se añadieron 350 µl de etanol al 70%, la mezcla se transfirió a la columna *RNeasy Spin* (suministrada por la casa comercial) y se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 15

segundos. Tras descartar el filtrado, se añadieron 700 µl de tampón RW1 seguido de una nueva centrifugación. Se cambió el tubo colector, se añadieron 500 µl de tampón RPE y se repitió de nuevo la centrifugación. Se descartó el filtrado, nuevamente se añadieron 500 µl de tampón RPE y se centrifugó 2 minutos a $12.000 \times g$. Finalmente, se cambió el tubo colector, se añadieron 50 µl de H₂O libre de nucleasas, se incubó 30 segundos a temperatura ambiente, y se centrifugó un minuto para eluir el ARN, que se conservó a -20°C hasta su uso.

La concentración del ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) de 1 µl de producto de extracción en un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies). Como blanco se usó agua libre de nucleasas (previamente usada para disolver el ARN) y para calcular la cantidad de ARN se tuvo en cuenta que la absorbancia $A_{260}=1$ indica una concentración de 40 µg/ml.

Además se verificó la pureza del extraído en base a la ratio A_{260}/A_{280} , para estimar la presencia de contaminantes en la muestra como proteínas o disolventes orgánicos que absorben en el espectro UV, se consideró que una ratio de 1,9 a 2,1 era indicativa de pureza del ARN (Ausubel y col., 1995).

2.7 TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT)

Para la síntesis de ADNc a partir del ARN viral se empleó el kit *SuperScriptTM III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en un termociclador *MyCyclerTM* (Bio-Rad). Para ello, 1 µg de ARN se desnaturalizó a 95°C durante 5 minutos en presencia de hexámeros de nucleótidos al azar, y rápidamente, se transfirió a 4°C durante 2-3 minutos. Finalizada esta incubación, se añadieron el resto de los componentes de reacción: tampón 1× [250 mM Tris-HCl (pH 8,3 a temperatura ambiente), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 0,05 mM de cada nucleótido trifosfato (dTTP, dATP, dCTP, dGTP), 0,05 M de ditrioteitol (DTT), 0,2 µl de enzima reverso transcriptasa *SuperScript[®] III Reverse Transcriptase* (200 U/µl), y H₂O hasta un volumen final de 20 µl. Se incubó a 25°C durante 10 minutos seguido de 50 minutos a 50°C . Finalmente se incubó a 85°C durante 5 minutos para inactivar la reverso transcriptasa antes de la amplificación.

2.8 AMPLIFICACIÓN POR PCR

La amplificación del ADNc se realizó transfiriendo 3 µl de ADNc a una solución que contenía 1,25 U de ADN polimerasa *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega), y 0,5 µM de los cebadores específicos en cada caso, 1× de tampón *GoTaq®*, 2,5 mM de solución de MgCl₂, y 0,2 mM de cada dNTP. A continuación se añadió agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 µl. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador *MyCycler™* (Bio-Rad) comenzando con una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida por 40 ciclos de amplificación en los cuales se incluyó desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, hibridación de los cebadores durante 30 segundos a 58°C, y elongación de las cadenas durante 30 segundos a 72°C. Por último se realizó una extensión final de 10 minutos a 72°C. Para su visualización los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2 % en tampón Tris 1× (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA-Na 2 mM) junto con el estándar de pesos moleculares *SimplyLoad™ 100 bp DNA ladder* (Lonza) durante 1 a 1,5 horas a 120 V. Seguidamente los geles se tiñeron con *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution*, y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

2.9 CUANTIFICACIÓN DEL GENOMA VIRAL MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

La cuantificación del genoma se realizó mediante la técnica de cuantificación absoluta por PCR a tiempo real realizada durante una estancia en la Universidad de Málaga. Por separado, se prepararon mezclas de reacción para la detección del ARN2 de RGNNV y SJNNV. El ARN2 de RGNNV se cuantificó siguiendo el método descrito por Lopez-Jimena y col. (2011). Se emplearon los cebadores RG-ARN2-F2 (5'-CGTCCGCTGTCCATTGACTA-3', nucleótidos 624-643) y RG-ARN2-R2 (5'-CTGCAGGTGTGCCAGCATT-3', nucleótidos 723-705) de acuerdo con la secuencia del aislado RG-TO91 (GenBank Acc. No. D38636), que amplifican una región de 100 pb. Mientras que para la cuantificación del ARN2 de SJNNV se utilizaron los siguientes cebadores: SJ-ARN2-F (5'-GACACCACCGC TCCAATTACTAC-3', nucleótidos 665-687) y SJ-ARN2-R (5'-ACGAAATCCAGTG TAACCGTTGT-3', nucleótidos 739-717, según la secuencia del aislado SJ-G91, GenBank Acc. No. D30814). Estos cebadores amplifican una región de 75 pb dentro de la región T4. Para la realización de la técnica de PCR a tiempo real basada en la tecnología SYBR se

emplearon las condiciones previamente descritas por Lopez-Jimena y col. (2011). Se realizaron mezclas de reacción con volumen final de 25 μ l. Las mezclas estaban compuestas por 12,5 μ l de 2 \times Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1,5 μ l de cada cebador (concentración del stock, 15 pmol/ μ l), y 75 ng de ADNc. Para la obtención de la curva estándar se utilizó como molde diluciones seriadas del ADNc obtenidas a partir de ARN transcrito *in vitro* proporcionado por el Dr. Lopez-Jimena. Las muestras se analizaron por triplicado. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems), en placas de 96 pocillos, siguiendo el protocolo siguiente: un primer paso de activación a 50 °C durante 2 min, seguido de 95°C durante 10 min, una amplificación de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s, seguidos de hibridación y elongación a 60 °C durante 1 min. Finalmente, la temperatura de fusión (T_m) de los amplicones generados se determinó analizando las curvas de disociación usando el siguiente protocolo: 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C, con 15s de paso de 60 a 95°C cada 0,5 °C y finalmente enfriamiento de las muestras hasta 4 °C.

2.10 TITULACIÓN DE PARTÍCULAS VÍRICAS INFECTIVAS

Para el análisis de recuperación de partículas infectivas se seleccionaron lotes de peces en tres puntos diferentes de las curvas de mortalidad: fase inicial, fase de estabilización, y fase final como aparece reflejado en la Figura 6. Tras el procesado de las muestras la titulación se realizó según el método anteriormente descrito de TCID₅₀, y se expresó por gramo de tejido (TCID₅₀/g).

2.11 ANÁLISIS DE LA REPLICACIÓN EN CEREBRO DURANTE LOS PRIMEROS DÍAS DE INFECCIÓN

En este experimento se infectaron un total de 100 lenguados (peso medio 1 g) con cada cepa: ERV378, Ss160.03 y SJNag93 mediante inmersión tal y como se describió anteriormente. Para analizar la replicación viral se retiraron diariamente 10 peces a partir del día 1 post infección (p.i.) y hasta el día 10 pi, que se sacrificaron con una sobredosis de anestésico como se ha descrito previamente. De cada pez se extrajo asépticamente, por separado: parte anterior de la cabeza (cerebro y ojos), branquias, una sección de piel, previamente desinfectada con alcohol, de aproximadamente 0,5 cm² situada entre la línea lateral y la aleta caudal, y órganos internos (hígado, intestino, bazo y riñón). Los tejidos

extraídos se procesaron en lotes de 5 peces, de manera que se obtuvieron 2 réplicas por día de muestreo y cepa. El procesado, titulación, extracción de ARN total y síntesis del ADNc se realizaron como se describió anteriormente.

2.11.1 Detección del número de copias en cerebro

La detección del número de copias en los distintos tejidos se realizó mediante PCR cuantitativa. Para la realización de la PCR se realizaron mezclas de reacción con volumen final de 20 μ l compuestas por 10 μ l de 2 \times *iQ*TM *SYBR*[®]*Green Supermix* (Bio-Rad), 0,5 μ l de cada uno de los cebadores (concentración del stock, 200 nM), y 2 μ l de ADNc. Se emplearon los cebadores SnodR1 F/R (5'-TCCAAAAGAAAGAAGCATC -3'/5'-TGGCATGTACCAC GGAAC-3') descritos por Olveira y col. (2013). Estos cebadores hibridan con una región del ARN1 comprendida entre las posiciones 1619 y 1758 tanto con RGNNV como con SJNNV ya que se encuentran en una región homóloga. Para la realización de la recta estándar se emplearon diluciones seriadas de orden 20 de un plásmido purificado que contenía el segmento completo del ARN1 de betanodavirus. Las reacciones se llevaron a cabo en un *CFX96*TM *Real-time PCR detection system* (BioRad) en placas de 96 pocillos siguiendo el protocolo siguiente: un primer paso de desnaturalización/activación a 95 °C durante 15 min, seguido de una amplificación de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s, seguidos de hibridación y elongación a 60 °C durante 15 s. La generación de productos de PCR se monitorizó después de cada hibridación midiendo la fluorescencia emitida por la doble cadena de ADN unida al fluoróforo SYBR green. Finalmente, para el análisis de las curvas de disociación y la obtención de la temperatura de fusión (T_m) se siguió el siguiente protocolo: 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C, 10 s de paso de 55°C a 95 °C cada 0,2 °C. Las muestras se analizaron por triplicado, y las curvas sigmoidales obtenidas tras la amplificación se analizaron utilizando el programa *Bio-Rad CFX Manager*.

Para realizar un control del proceso de extracción de ARN y de la síntesis de ADNc se realizó, para cada muestra, una amplificación empleando cebadores que hibridan con una región del ARN ribosómico 18S. Debido a que el ARN ribosómico se expresa constitutivamente en las células, se debería obtener un valor constante en todas las muestras.

2.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de números de copias se expresaron como media±desviación estándar. Se analizó la correlación entre el número de copias de ARN2 obtenidas en qPCR y el título viral de los lotes analizados, empleando el test estadístico de correlación de Spearman. Se utilizó el programa informático *Statgraphics Centurion XVI*. Este coeficiente varía de -1,0 (correlación negativa perfecta) a +1,0 (correlación positiva perfecta) y se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.



3. RESULTADOS

El análisis virológico y bacteriológico confirmó que los peces estaban libres de patógenos incluyendo betanodavirus. No se registró mortalidad en los peces control y tampoco se observaron signos clínicos externos o internos de enfermedad. Al final del ensayo estos peces se sacrificaron, no habiéndose detectado presencia de betanodavirus en ninguno de los individuos mediante RT-PCR seguida de nested-PCR. Tampoco se observó efecto citopático tras la inoculación en células E-11.

3.1 ANÁLISIS DE MORTALIDAD

Las curvas de mortalidad acumulada se representan en la Figura 6. Se observaron signos característicos de VER en todos los grupos de peces infectados, independientemente de la ruta de infección. Tales síntomas consistieron en pérdida de apetito, inicialmente hiperactividad y posteriormente natación errática. Se observaron de una manera más severa en el grupo infectado con la cepa recombinante. En este grupo se observó una mayor proporción de peces con signos clínicos de la patología además de observarse peces afectados durante todo el experimento. El virus se detectó por RT-PCR y se aisló en cultivo celular en todos los lotes de peces muertos.

3.1.1 Infección por baño

Los tres aislados provocan una mortalidad acumulada del 100% (Figura 6.A), pero con claras diferencias en el ritmo de mortalidad. Así, aunque los primeros días las curvas de mortalidad acumulada de las tres cepas mostraron una cinética muy parecida, las primeras mortalidades se registraron 5 d.p.i., en los grupos infectados con la cepas Ss160.03 y ERV378 (RGNNV) y 7 d.p.i. en el grupo infectado con SJNag93 (SJNNV), después de los 11 días la curva de la cepa Ss160.03 se situó claramente por delante de la de las otras cepas. La máxima mortalidad se alcanzó a los 18 d.p.i. en el grupo infectado por la cepa Ss160.03, seguido por el grupo de peces infectados con la cepa SJNNV (25 d.p.i.), y finalmente en el grupo infectado con la cepa RGNNV (31 d.p.i.).

3.1.2 Infección intramuscular

La mortalidad acumulada alcanzó también el 100% en todos los grupos infectados (Figura 6.B), pero en un período de tiempo más dilatado que en la infección por baño (de 36 a 41 d.p.i.). Los signos típicos de la VER se manifestaron a partir del día 8 post infección (p.i.) y el inicio de la mortalidad se produjo 10 d.p.i. en el grupo infectado con la cepa SJNag93 (SJNNV), y 13 d.p.i. en los grupos infectados con las cepas Ss160.03 (recombinante) y ERV378 (RGNNV). Al analizar detenidamente la curva de mortalidad se observa que la cepa RGNNV provoca el 50% de la mortalidad a día 17 p.i., mucho antes que los grupos infectados con la cepa SJNNV y la cepa recombinante (a 31 y 32 d.p.i., respectivamente). Sin embargo, en este grupo, tras la fase inicial con una alta incidencia de mortalidad, se produce una estabilización y se alcanza el 100% de mortalidad más tarde (41 d.p.i.) que en los grupos infectados con las otras cepas (Ss 160.03 día 36 p.i., SJNag 38 p.i.).

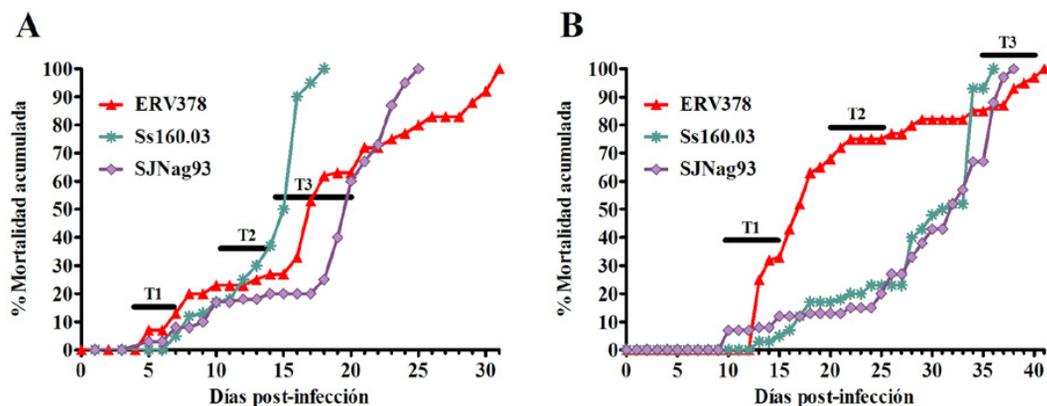


Figura 6 Curva de mortalidad acumulada a 22 °C en peces infectados con los aislados de betanodavirus ERV378 (RGNNV, triángulo rojo), Ss160.03 (RGNNV/SJNNV, asterisco verde) o SJNag93 (SJNNV, rombo violeta), mediante baño (peces de 2 g) a una concentración viral de 10^5 TCID₅₀/ml (A) y mediante inyección intramuscular (peces de 5 g) de 100µl de virus a una concentración de 10^5 TCID₅₀/pez (B). T1, T2 y T3 muestran los distintos puntos elegidos para el análisis mediante qRT-PCR y titulación viral.

3.2 ANÁLISIS DE REPLICACIÓN EN CEREBRO

Para llevar a cabo la cuantificación del ARN2 mediante PCR en tiempo real se eligieron 3 lotes de peces que coinciden con tres fases distintas de las curvas de mortalidad (Figura 6): (i) T1, que coincide con la fase inicial de la mortalidad (4-7 y 10-15 d.p.i. en baño e inyección intramuscular, respectivamente); T2, fase de estabilización de la mortalidad (10-14 y 20-25 d.p.i. en baño e inyección intramuscular, respectivamente); y (iii) T3, mortalidad de la fase final del experimento (15-21 y 35-40 d.p.i. en baño e inyección intramuscular, respectivamente). Todas las muestras analizadas pertenecen a peces muertos ya que ningún pez infectado sobrevivió a la infección.

3.2.1 Infección por baño

El número de copias del ARN2 en todos los lotes analizados alcanzó valores de entre 10^9 y 10^{10} copias de ARN2/g de tejido. El valor más alto se alcanzó en los peces infectados con la cepa tipo RGNNV, en la que se observó un incremento de más de 1 logaritmo desde la fase inicial de la curva de mortalidad (T1, $2,2 \times 10^9$ copias/g) hasta la fase de estabilización (T2), momento en el que alcanzó su valor máximo ($4,6 \times 10^{10}$ copias de ARN2/g) (Figura 7.A). La carga viral de los lotes infectados con la cepa recombinante apenas registró cambios entre las distintas fases de la curva de mortalidad con valores de $2,3-3,1 \times 10^9$ copias/g. En cuanto a la cepa SJNNV, se observó un ligero incremento (menor de un logaritmo) entre el número de copias de la fase inicial y la fase final (de $3,8 \times 10^9$ a $1,7 \times 10^{10}$). El genoma viral no se detectó en los grupos control.

3.2.2 Infección intramuscular

Los valores de replicación obtenidos por inyección intramuscular fueron, en general, menores que los registrados en la infección por baño. El valor máximo se alcanzó, al igual que en el experimento anterior, en peces infectados con la cepa RGNNV. La carga viral en esta cepa se incrementó entre la fase inicial y la fase de estabilización pasando de $4,6 \times 10^8$ copias/g en T1 a $4,6 \times 10^9$ copias/g en T2 (Figura 7.B). Mientras que en la fase final de la curva de mortalidad desciende ligeramente a $1,4 \times 10^9$ copias/g. En los peces infectados con las cepas de cápside SJNNV se observó una evolución en el número de copias similar, ambas alcanzaron su valor máximo en la fase inicial de la infección ($6,4 \times 10^8$ copias/g en peces infectados con la cepa Ss160.03 y $4,7 \times 10^8$ con la cepa SJNag93) para luego decrecer en las

siguientes fases. Así, la carga viral en los lotes de la fase final de la curva de mortalidad descendió del orden de 1 logaritmo en relación a T1 (con valores de $1, 4 \times 10^7$ copia/g con la cepa recombinante y $1,6 \times 10^7$ de la cepa de tipo SJNNV). En este experimento, como en el caso anterior, tampoco se detectó la presencia del genoma viral en los lotes de peces control.

3.3 ANÁLISIS DE PARTÍCULAS INFECTIVAS EN CEREBRO

La determinación del título viral se realizó en tres lotes de peces infectados con cada cepa en los mismos tiempos analizados por PCR en tiempo real (T1, T2 y T3, Figura 6). Los valores más altos se obtuvieron con la cepa recombinante tanto en baño como en inyección intramuscular.

3.3.1 Infección por baño

En baño, el patrón de evolución de los títulos virales fue distinto para cada cepa (Figura 7.C). Los títulos más altos se registraron con la cepa Ss160.03. En los lotes de peces infectados con esta cepa se observó un aumento del título desde el comienzo de la infección, T1 ($1,3 \times 10^5$ TCID₅₀/g), hasta la fase de estabilización, T2 ($6,9 \times 10^5$ TCID₅₀/g), mientras que en la fase final, T3, volvió a los valores iniciales. La cepa SJNag93 (SJNNV) mostró valores intermedios entre la cepa recombinante y la ERV378 (RGNNV), alcanzando valores más altos en T1 y T3 ($6,9$ y $7,4 \times 10^4$ TCID₅₀/g) frente a T2 ($1,7 \times 10^4$ TCID₅₀/g). En cuanto a la cepa ERV presentó el título máximo en T1 ($3,9 \times 10^4$ TCID₅₀/g), decreciendo ligeramente en T2 y T3 ($1,3 \times 10^4$ TCID₅₀/g).

3.3.2 Infección intramuscular

En cuanto a los resultados en inyección intramuscular, las tres cepas presentaron los valores máximos de título viral en T1 y decrecieron en T2 y T3 (Figura 7.D). El número de partículas virales viables fue muy superior en la cepa recombinante, alcanzando un título de $1,2 \times 10^9$ TCID₅₀/g en T1 frente a $2,2 \times 10^5$ TCID₅₀/g (ERV378) y $3,6 \times 10^7$ TCID₅₀/g (SJ93Nag). Tanto en la cepa recombinante como en la cepa SJNag93 se observa una gran diferencia entre el número de partículas infectivas en T1 y T3, reduciéndose en 4 y 3 logaritmos, respectivamente.

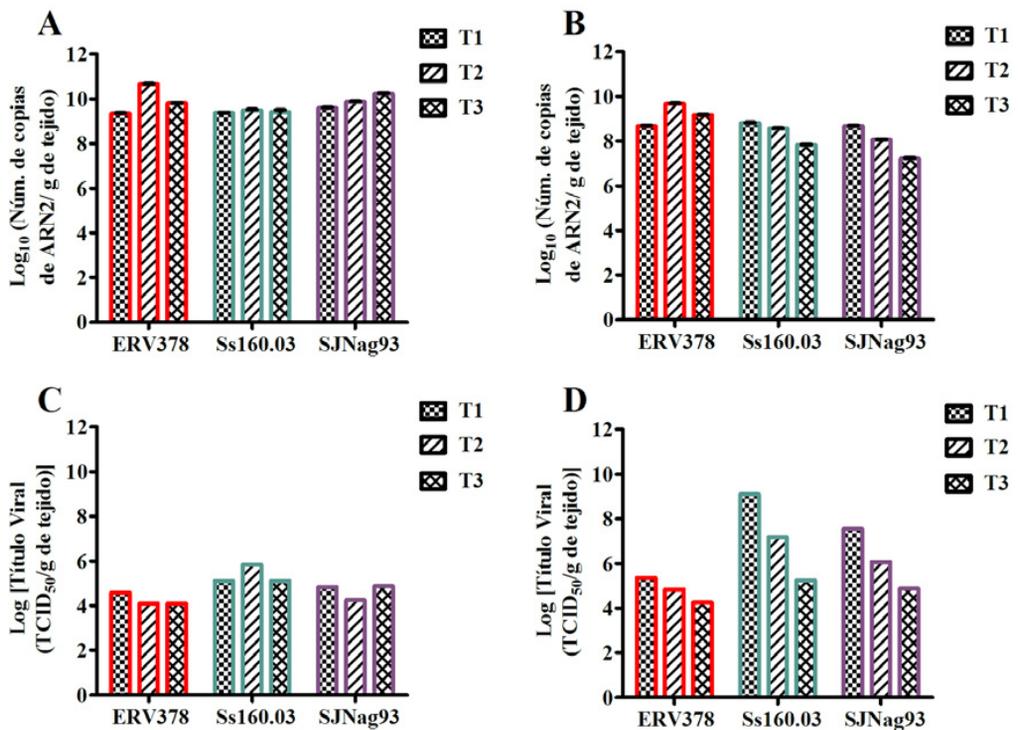


Figura 7 Carga viral detectada en los lotes de peces muertos infectados con las cepas de betanodavirus ERV378 (RGNNV, rojo), Ss160.03 (RGNNV/SJNNV, verde) o SJNag93 (SJNNV, violeta). Replicación del virus en cerebro y ojos detectada por RT-qPCR (\log_{10} copias de ARN2/g) de peces infectados por baño (A) e inyección i.m. (B) y título viral (\log_{10} TCID₅₀/g) detectado en baño (C) e i.m. (D) en tres fases la infección (T1, T2 y T3). Los datos de copias representan la media+DS de tres réplicas.

3.4 RELACIÓN NÚMERO DE COPIAS Y TÍTULO VIRAL

En todos los lotes de peces analizados el número de copias fue superior al número de partículas infectivas, excepto en la fase inicial de la infección (T1) en los peces infectados con la cepa Ss160.03 por inyección intramuscular (Figura 8). Destacan las grandes diferencias existentes en los lotes de peces infectados por baño (Figura 8.A), siendo de media 5 logaritmos mayor el número de copias que el de partículas infectivas. En peces infectados por inyección intramuscular la diferencia media entre el número de copias y el título viral fue de 2,5 logaritmos (Figura 8.B). La cepa de tipo RGNNV (ERV378) presentó las mayores diferencias en las dos vías de infección. En la infección por baño el número de copias de ARN2 por gramo llegó a ser 7 logaritmos mayor que el número de partículas infectivas en T2. En la

infección intramuscular las diferencias variaron entre los 3,3 logaritmos en T1 y los 4,9 logaritmos en T3. A pesar de estas diferencias, existe correlación entre número de copias y títulos en todos los lotes analizados (test de Spearman $p=0,0102$).

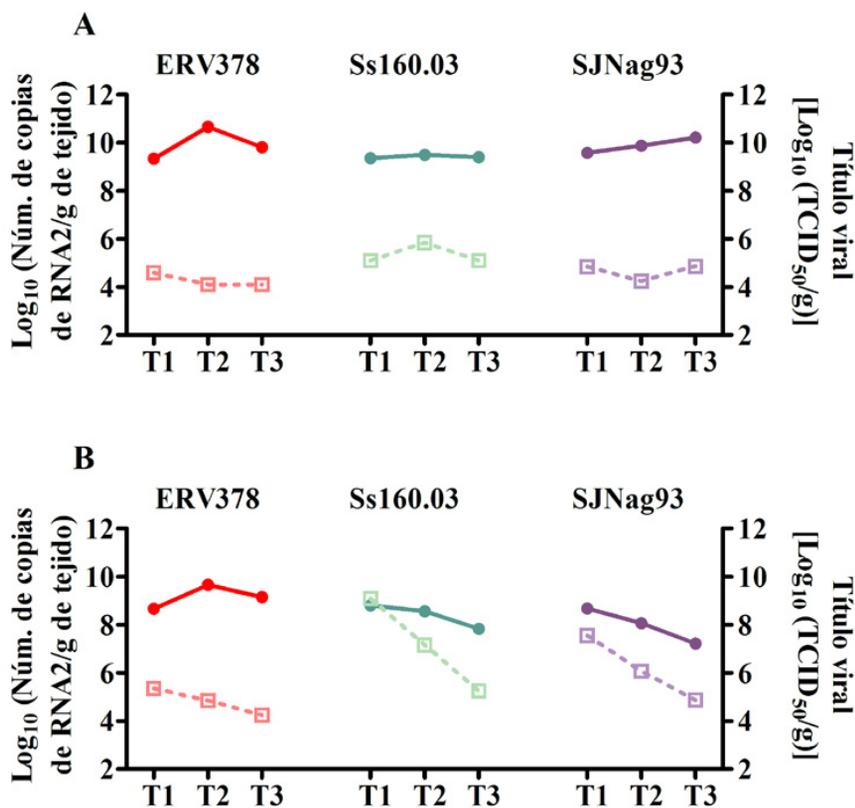


Figura 8 Relación entre la carga viral detectada en los lotes de peces muertos infectados con las cepas de betanodavirus ERV378 (RGNNV, rojo), Ss160.03 (RGNNV/SJNNV, verde) o SJNag93 (SJNNV, violeta) por RT-qPCR (log_{10} copias de ARN2/g, línea continua) y título viral (log_{10} TCID₅₀/g, línea discontinua) detectado en baño (A) e i.m. (B) en tres fases de la infección (T1, T2 y T3).

3.5 CARGA VIRAL EN DISTINTOS TEJIDOS DURANTE LOS PRIMEROS DÍAS DE INFECCIÓN

Los resultados de número de copias y título viral para cada cepa y día post-infección se muestran en la Tabla 2. Al analizar los datos de replicación en cerebro y ojos se observó que tras la infección por inmersión las cepas de cápside SJNNV (Ss160.03 y SJNag93) se detectan en estos tejidos desde las primeras 24h, mientras que en los peces infectados con la cepa ERV378 (RGNNV) el virus no se detecta hasta el día 4 p.i. Además, se recuperaron partículas virales infectivas de SJNag93 desde las 24h y en los peces infectados con la cepa recombinante desde las 48h. Los títulos virales de estas dos cepas fueron muy similares durante los 9 primeros días, pero a día 10 p.i. la replicación de la cepa Ss160.03 experimentó un incremento considerable alcanzando un título de $3,2 \times 10^7$ TCID₅₀/g (2 logaritmos más alto que el detectado en la cepa SJNag93). La producción de copias de ARN1 viral durante los primeros 5 días fue también muy similar en las dos cepas, con una media de $8,2 \times 10^5$ copias/g de la cepa Ss160.03 y $5,5 \times 10^5$ copias/g de la cepa SJNag93. Sin embargo, a partir del día 6 p.i., mientras en la cepa Ss160.03 el número de copias siguió un ascenso constante hasta $1,5 \times 10^9$ copias/g a día 10 p.i., el virus SJNNV sufrió un estancamiento, manteniéndose en torno a las 10^6 copias/g tejido. En cuanto a la cepa RGNNV, aunque se observó baja replicación inicial ($6,5 \times 10^4$ valor medio de copias 4-7 d.p.i.), a partir del día 8 p.i. se detectó una gran producción de genoma viral, llegando a alcanzar la mayor producción viral de las tres cepas, tanto en número de copias detectadas como en título viral alcanzado (a 10 d.p.i. $8,2 \times 10^{10}$ copias de ARN1/g tejido y un título de $5,6 \times 10^8$ TCID₅₀/g).

En cuanto a los niveles de replicación en los demás órganos se observa una constante presencia de virus de las tres cepas en órganos internos, branquia y piel (Tabla 2), si bien la concentración es menor a la detectada en cerebro. La cepa ERV378, a diferencia de los resultados en cerebro, se detectó desde el primer día en órganos internos, branquias y piel, alcanzando $6,7 \times 10^5$, $5,1 \times 10^5$ y $5,9 \times 10^4$ copias/g tejido, respectivamente, a las 24h. Además se recuperaron partículas infectivas a día 1 p.i. en branquia y piel ($3,2 \times 10^3$ TCID₅₀/g). En órganos internos, durante los 7 primeros días el virus se mantuvo en valores de detección de 10^4 - 10^5 copias/g, observándose un pico de detección a día 8 p.i. (un día después de que se disparara la replicación en cerebro) con un valor de $1,9 \times 10^7$ copias/g, después la detección se redujo a valores de $2,0 \times 10^6$ copias/g. En los días 8, 9 y 10 p.i. se recuperó virus infectivo con valores en torno a 10^3 TCID₅₀/g. El virus ERV378 se detectó y aisló en cultivo

celular en branquias los dos primeros días tras la infección, en los días posteriores (hasta 9 d.p.i.) el número de copias detectado se mantuvo entre 10^4 - 10^5 copias/g y a día 10 p.i. se observó una gran carga viral, alcanzando las 10^8 copias/g, aunque no se recuperó virus infectivo en estos lotes. Por último, la detección en piel se mantuvo con una carga viral muy similar a los demás tejidos, con una media de $1,4 \times 10^5$ copias/g de 1-7 d.p.i. Se aisló el virus los días 1 a 3 (título $3,2$ y $1,8 \times 10^3$ TCID₅₀/g, respectivamente). En los últimos 3 días (8-10 d.p.i.) se observó un incremento de la carga viral de $5,8 \times 10^5$ a $1,3 \times 10^8$ copias/g, y además, en estos lotes se recuperó virus infectivo con títulos de $1,8$ - $3,2 \times 10^3$ TCID₅₀/g.

Se detectó la presencia de genoma viral de la cepa Ss160.03 en órganos internos, piel y branquias durante toda la infección con ligeras oscilaciones. En órganos internos se detectó durante los primeros días (con valores en torno a 10^4 copias/g, aunque no se recuperó virus infectivo) alcanzando el máximo número de copias a día 9 p.i. ($5,8 \times 10^6$ copias/g); se re-aisló el virus con un título de $5,6 \times 10^3$ TCID₅₀/g. A día 10 p.i. el número de copias desciende más de 1 logaritmo ($1,8 \times 10^5$ copias/g) pero se recuperó también virus infectivo en cultivo ($3,2 \times 10^3$ TCID₅₀/g). En branquias se recuperaron partículas infectivas únicamente a los 3 d.p.i., mientras que los valores máximos de número de copias se observaron a los días 9 p.i. ($4,6 \times 10^6$ copias/g) y 10 p.i. ($2,6 \times 10^6$ copias/g). En piel el número de copias varió entre $2,1 \times 10^4$ copias/g detectadas a día 3 p.i. y $1,3 \times 10^6$ a día 5 p.i. y se recuperó virus infectivo al inicio y al final de la infección (días 1-2 p.i. y 8-10 p.i.), con un título de $3,2 \times 10^3$ TCID₅₀/g.

En cuanto a la cepa de tipo SJNNV la mayor detección en órganos internos se registró a las 24 horas post-infección (h.p.i.) ($3,0 \times 10^6$ copias/g), en los siguientes días la carga viral se mantuvo en valores de 10^4 - 10^5 copias. Se recuperó virus infectivo a las 24 y 48 h.p.i., a día 6 p.i. y a día 10 p.i. (títulos de $1,8$ - $3,2 \times 10^3$ TCID₅₀/g). En branquias el valor máximo se registró a las 48 horas ($5,1 \times 10^6$ copias/g de tejido), y después la carga viral se mantuvo en torno a las 10^5 copias. En este tejido se recuperaron partículas infectivas únicamente al inicio del experimento, desde las 24 hasta las 72h, con títulos de $3,2 \times 10^3$ TCID₅₀/g. El valor máximo de detección en piel se registró a las 24 horas ($9,3 \times 10^5$ copias/g), además en este lote se recuperó el virus en cultivo celular. A partir del día 2 p.i. hasta el día 10 p.i. la detección se mantuvo en $9,4 \times 10^4$ copias/g (media de copias), detectándose valores especialmente bajos a día 5 y 6 p.i. (10^3 copias/g). Finalmente, a los días 8, 9 y 10 p.i. se volvieron a recuperar partículas infectivas con títulos de $1,8$ - $3,2 \times 10^3$ TCID₅₀/g.

Tabla 2 Carga viral detectada en peces infectados con las cepas de betanodavirus ERV378 (RGNNV), Ss160.03 (RGNNV/SJNNV) y SJNag93 (SJNNV). Replicación del virus y número de partículas infectivas en cerebro (A), órganos (B), branquia (C) y piel (D) detectada por RT-qPCR (expresado como copias de ARN1/g) y titulación viral (expresado en TCID₅₀/g) de peces infectados por baño a una concentración de 10⁵ TCID₅₀/ml. Se muestrearon peces diariamente desde el día 1 p.i. hasta el día 10 p.i. Los datos representan la media de dos lotes de 5 peces.

ERV378				Ss160.03				SJNag93			
Cerebro y ojos											
Día p.i.	C.C.	Copias/g	Título TCID ₅₀ /g	Día p.i.	C.C.	Copias/g	Título TCID ₅₀ /g	Día p.i.	C.C.	Copias/g	Título TCID ₅₀ /g
1	-	Neg.	NA	1	-	1,3×10 ⁵	NA	1	+	3,1×10 ⁵	1,8×10 ³
2	-	Neg.	NA	2	+	6,1×10 ⁵	1,8×10 ³	2	+	3,0×10 ⁵	1,8×10 ³
3	-	Neg.	NA	3	+	1,7×10 ⁵	1,8×10 ³	3	+	3,4×10 ⁵	3,2×10 ³
4	+	1,2×10 ⁵	1,0×10 ³	4	+	1,3×10 ⁶	3,2×10 ³	4	+	5,8×10 ⁵	5,6×10 ⁴
5	+	7,3×10 ⁴	1,0×10 ³	5	+	1,9×10 ⁶	3,2×10 ³	5	+	1,2×10 ⁶	3,6×10 ⁴
6	+	1,2×10 ⁴	3,2×10 ³	6	+	1,4×10 ⁷	3,2×10 ³	6	+	2,4×10 ⁶	3,2×10 ³
7	+	5,7×10 ⁴	3,2×10 ³	7	+	5,0×10 ⁷	3,2×10 ³	7	+	4,3×10 ⁵	3,2×10 ³
8	+	8,8×10 ⁷	5,6×10 ⁵	8	+	1,9×10 ⁸	3,2×10 ³	8	+	3,7×10 ⁶	3,2×10 ⁵
9	+	1,1×10 ⁹	1,8×10 ⁶	9	+	8,2×10 ⁸	3,2×10 ⁵	9	+	1,2×10 ⁶	3,2×10 ⁵
10	+	8,2×10 ¹⁰	5,6×10 ⁸	10	+	1,5×10 ⁹	3,2×10 ⁷	10	+	7,1×10 ⁵	1,8×10 ⁵
Órganos											
Día p.i.	C.C.	Copias/g	Título TCID ₅₀ /g	Día p.i.	C.C.	Copias/g	Título TCID ₅₀ /g	Día p.i.	C.C.	Copias/g	Título TCID ₅₀ /g
1	-	6,7×10 ⁵	NA	1	-	1,8×10 ⁵	NA	1	+	3,0×10 ⁶	3,2×10 ³
2	-	1,7×10 ⁵	NA	2	-	7,3×10 ⁴	NA	2	+	4,7×10 ⁵	1,8×10 ³
3	-	1,7×10 ⁵	NA	3	-	8,2×10 ⁴	NA	3	-	1,0×10 ⁵	NA
4	-	2,3×10 ⁴	NA	4	-	1,8×10 ⁴	NA	4	-	3,0×10 ⁴	NA
5	-	5,8×10 ⁴	NA	5	-	2,3×10 ⁴	NA	5	-	4,6×10 ⁴	NA
6	-	2,5×10 ⁵	NA	6	-	9,5×10 ⁴	NA	6	+	3,0×10 ⁵	3,2×10 ³
7	-	3,1×10 ⁴	NA	7	-	1,1×10 ⁴	NA	7	-	4,0×10 ⁴	NA
8	+	1,9×10 ⁷	1,8×10 ³	8	-	6,7×10 ⁴	NA	8	-	6,8×10 ⁴	NA
9	+	2,1×10 ⁶	1,8×10 ³	9	+	5,8×10 ⁶	5,6×10 ³	9	-	2,2×10 ⁵	NA
10	+	2,0×10 ⁶	3,2×10 ³	10	+	1,8×10 ⁵	3,2×10 ³	10	+	1,1×10 ⁵	3,2×10 ³
Branquia											
Día p.i.	C.C.	Copias/g	Título TCID ₅₀ /g	Día p.i.	C.C.	Copias/g	Título TCID ₅₀ /g	Día p.i.	C.C.	Copias/g	Título TCID ₅₀ /g
1	+	5,1×10 ⁵	3,2×10 ³	1	-	2,1×10 ⁵	NA	1	+	4,6×10 ⁵	3,2×10 ³
2	+	7,7×10 ⁴	1,8×10 ³	2	-	1,0×10 ⁵	NA	2	+	5,1×10 ⁶	3,2×10 ³
3	-	1,7×10 ⁵	NA	3	+	3,8×10 ⁴	3,2×10 ³	3	+	6,9×10 ⁴	3,2×10 ³
4	-	3,1×10 ⁴	NA	4	-	1,2×10 ⁵	NA	4	-	1,8×10 ⁵	NA
5	-	2,1×10 ⁴	NA	5	-	1,3×10 ⁵	NA	5	-	1,8×10 ⁵	NA
6	-	1,6×10 ⁵	NA	6	-	4,1×10 ⁴	NA	6	-	1,3×10 ⁵	NA
7	-	2,7×10 ⁵	NA	7	-	1,1×10 ⁵	NA	7	-	6,0×10 ⁵	NA
8	-	4,5×10 ⁵	NA	8	-	4,9×10 ⁴	NA	8	-	2,8×10 ⁵	NA
9	-	5,2×10 ⁵	NA	9	-	4,6×10 ⁶	NA	9	-	1,5×10 ⁵	NA
10	-	2,0×10 ⁸	NA	10	-	2,6×10 ⁶	NA	10	-	2,3×10 ⁴	NA
Piel											
Día p.i.	C.C.	Copias/g	Título TCID ₅₀ /g	Día p.i.	C.C.	Copias/g	Título TCID ₅₀ /g	Día p.i.	C.C.	Copias/g	Título TCID ₅₀ /g
1	+	5,9×10 ⁴	3,2×10 ³	1	+	2,6×10 ⁵	3,2×10 ³	1	+	9,3×10 ⁵	3,2×10 ³
2	+	6,5×10 ⁴	1,8×10 ³	2	+	8,9×10 ⁴	3,2×10 ³	2	-	1,7×10 ⁵	NA
3	+	1,3×10 ⁴	1,8×10 ³	3	-	2,1×10 ⁴	NA	3	-	2,2×10 ⁴	NA
4	-	1,7×10 ⁴	NA	4	-	3,1×10 ⁴	NA	4	-	4,6×10 ⁴	NA
5	-	1,4×10 ⁵	NA	5	-	1,3×10 ⁶	NA	5	-	4,9×10 ³	NA
6	-	4,8×10 ⁴	NA	6	-	4,4×10 ⁴	NA	6	-	3,3×10 ³	NA
7	-	2,0×10 ⁵	NA	7	-	7,1×10 ⁴	NA	7	-	2,0×10 ⁵	NA
8	+	5,8×10 ⁵	1,8×10 ³	8	+	2,7×10 ⁵	3,2×10 ³	8	+	2,5×10 ⁵	1,8×10 ³
9	+	7,7×10 ⁶	1,8×10 ³	9	+	5,1×10 ⁵	3,2×10 ³	9	+	1,9×10 ⁴	1,8×10 ³
10	+	1,3×10 ⁸	3,2×10 ³	10	+	3,9×10 ⁵	3,2×10 ³	10	+	1,4×10 ⁵	3,2×10 ³

C.C. aislamiento en cultivo celular: +, aislado. -, no aislado. NA, no aplica. Neg., no detectado en RT-qPCR

4. DISCUSIÓN

Es este capítulo se ha estudiado la susceptibilidad del lenguado senegalés a la infección por tres cepas de betanodavirus: una cepa recombinante RGNNV/SJNNV (aislado Ss160.03) y dos cepas representantes de los genotipos parentales, SJNNV (SJNag93) y RGNNV (ERV378). Además se han utilizado dos rutas de infección distintas: exposición mediante baño, que es la que mejor refleja la infección en condiciones naturales, e inyección intramuscular, que asegura la administración de una dosis viral estandarizada.

Los resultados obtenidos demostraron que el lenguado es muy susceptible a la infección por betanodavirus, ya que las tres cepas utilizadas causaron mortalidades del 100%. Sin embargo, en la infección por baño se observaron claras diferencias en las curvas de mortalidad acumulada en función de la cepa causante de la infección. Así, en los peces infectados con el aislado recombinante el pico de mortalidad se alcanzó mucho más rápidamente (a los 18 d.p.i.) que en los grupos infectados con las cepas de los genotipos RGNNV y SJNNV (a los 25 y 31 d.p.i., respectivamente). Por el contrario, en la infección intramuscular los resultados apenas mostraron diferencias entre los distintos aislados (36 d.p.i. en el grupo de peces infectados con la cepa recombinante frente a 38-41 d.p.i. en los otros grupos), lo que sugiere que las barreras externas del lenguado podrían ser un factor importante para controlar la infección por parte de cepas del genotipo RGNNV, al menos en los estados iniciales de la infección.

Independientemente de la ruta de infección utilizada, la cepa recombinante Ss160.03 causó los signos clínicos más severos: fue capaz de causar mortalidad en el menor tiempo y presentó la menor diferencia entre el número de copias genómicas y el título viral. La comparación del número de copias de ARN2 en cerebro y el título viral obtenido a partir de lotes de peces muertos en distintos tiempos de la infección experimental (T1, T2 y T3), permitió observar la existencia de correlación entre el número de copias y el título viral ($p < 0,05$), si bien se observaron grandes diferencias entre número de copias y título. Estas diferencias han sido descritas anteriormente por otros autores en virus humanos (Falsey y col., 2003; Garcia y col., 2001), en virus de peces (Hope y col., 2010; Purcell y col., 2006) y en virus de vertebrados superiores (Achenbach y col., 2004). En lubinas infectadas con betanodavirus se describieron diferencias de 1 a 4 logaritmos (Souto y col., 2015), y resultados similares se obtuvieron con

virus respiratorio sincitial bovino (BRSV, *Bovine Respiratory Syncytial Virus*) (Achenbach y col., 2004), el virus de la fiebre del valle de Rift (RVFV, *Rift Valley Fever Virus*) (Garcia y col., 2001) y virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) (Purcell y col., 2006). Los resultados obtenidos en lenguado muestran diferencias del orden de 5-6 logaritmos, especialmente en los lotes de peces que se infectaron por baño e infectados con las cepas RGNNV y SJNNV. Existen diversas razones que pueden explicar este fenómeno. La desviación entre el número de copias y el título en el virus de la gripe aviar H5N1 (Dovas y col., 2010) se ha asociado a la inactivación del virus bajo las condiciones ambientales del agua. En el caso de los betanodavirus se sabe que tienen una gran capacidad de sobrevivir y permanecer infectivos durante largos periodos de tiempo bajo un amplio rango de condiciones ambientales (Frerichs y col., 2000), por lo tanto es improbable que el bajo número de partículas infectivas recuperadas respecto al número de copias detectado sea por inactivación del virus durante el proceso de análisis. Otra posibilidad es la pérdida de infectividad del virus en los tejidos de individuos muertos (Rosenbergova y col., 2009). Se sabe que los peces inmediatamente después de morir sufren una rápida autólisis de los tejidos, en concreto el cerebro es uno de los tejidos que antes sufre degradación. En esta infección experimental se realizó una recogida diaria de los peces muertos, por lo que el efecto sobre el virus de la degradación en los tejidos de los ejemplares muertos durante la noche o en momentos posteriores a su recogida puede ser un factor importante que no es posible evaluar. Esta degradación es más acusada en los peces infectados por baño debido a su menor tamaño. Alternativamente, la gran diferencia encontrada podría deberse a una gran producción de partículas defectivas o a una sobreexpresión del ARN2 como se ha descrito en RVFV para el segmento S (Garcia y col., 2001) y en BRSV con el ARN F (Achenbach y col., 2004). En base a los resultados obtenidos la posible sobreexpresión del segmento ARN2 o la generación de partículas defectivas ocurrirían principalmente en los tejidos de peces infectados con las cepas RGNNV y SJNNV. Esto podría indicar una falta de eficacia en la producción de virus debido a una peor adaptación a la especie hospedadora.

Para estudiar más en profundidad las posibles diferencias en el proceso de replicación entre las tres cepas, se llevó a cabo un análisis de replicación viral durante los diez primeros días de infección en diferentes órganos y tejidos del lenguado, incluyendo cerebro, piel, branquias y órganos internos. Se sabe que los betanodavirus son virus neurotrópicos (Munday y col., 2002) que replican preferentemente en cerebro y retina (Nguyen y col., 1996; Skliris y

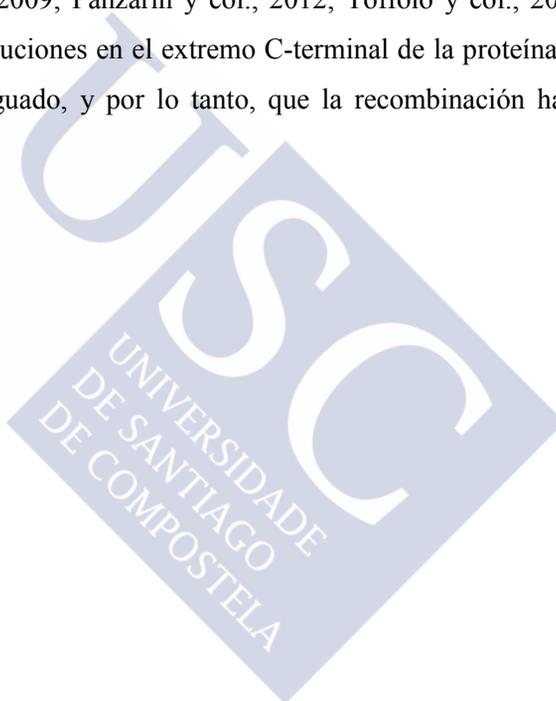
Richards, 1999), y que invaden el sistema nervioso a través de las conexiones sinápticas (Ikenaga y col., 2002). Nuestro análisis reveló que las cepas con cápside SJNNV alcanzaron el cerebro a las 24h (datos de detección del genoma viral por RT-qPCR) mientras que el virus RGNNV no se detectó hasta el día 4 p.i., lo que confirmaría la hipótesis de que la cepa RGNNV debe de encontrar algún tipo de barrera que le impida llegar al cerebro con la misma facilidad que las cepas con cápside SJNNV. Además, también se recuperaron partículas infectivas en cultivo celular a las 24 horas de infección en peces infectados con la cepa SJNNV, y a las 48h con la cepa recombinante. Ambas cepas mostraron una carga viral similar durante los primeros días de infección; sin embargo, mientras la producción de la cepa SJNNV se mantuvo constante durante los 10 días de infección, la cepa recombinante Ss160.03 incrementó su carga viral hasta superar las 10^9 copias/g a día 10 p.i. y $3,2 \times 10^7$ TCID₅₀ g/pez. Es interesante señalar que aunque la cepa RGNNV fue la que tardó más tiempo en detectarse en el cerebro, una vez iniciada la replicación fue la que alcanzó el mayor número de copias y partículas infectivas transcurridos los 10 días de infección (aproximadamente 2 log más que la cepa recombinante). Estos resultados contrastan con los bajos títulos virales obtenidos a partir de los peces muertos infectados con esta cepa, especialmente a partir de la mitad de la curva de mortalidad. Aunque los datos en un caso se han obtenido de peces sacrificados (*Análisis de la replicación en cerebro durante los primeros días de la infección*) y en el otro de peces muertos (*Análisis de mortalidad*), de la comparación de ambos podría deducirse que la alta replicación inicial de la cepa tipo RGNNV decae a medida que avanza la infección, lo que explicaría que tarde más que la recombinante en causar el 100% de mortalidad.

También observamos la replicación viral de las tres cepas en órganos internos, branquias y piel durante los 10 días de infección, en general, se obtuvieron valores entre 10^4 y 10^6 copias de ARN1/g de tejido. Sin embargo, la detección de partículas infectivas fue más limitada. En las branquias se observó una mayor presencia de virus infectivo al inicio de la infección en las cepas ERV378 y SJNag93, en las que se recuperó el virus a las 24 y hasta las 48h, respectivamente, lo que sugiere una posible vía de entrada del virus. La presencia de betanodavirus en piel, aleta y branquias ha sido detectada previamente (Azad y col., 2006; Chi y col., 2001; Lopez-Jimena y col., 2011; Nguyen y col., 1997) y algunos autores han propuesto que las branquias y/o la piel podrían representar la vía de entrada en la infección horizontal en peces (Grotmol y col., 1997; Mézeth y col., 2007). No se recuperó virus

infectivo en branquias en los lotes de peces infectados con la cepa Ss160.03 durante las 24-48h, y se obtuvo un único re-aislamiento a día 3 p.i., por lo que la cepa recombinante no parece utilizar esta vía. En las muestras de piel sí se observó la presencia del virus infectivo en las tres cepas al inicio de la infección, 24 h (SJNNV), 24-48 h (recombinante) y los 3 primeros días (RGNNV). La presencia de virus replicante en piel ha sido previamente observada y se ha propuesto que el virus podría llegar a la médula a través de los nervios aferentes conectados a la piel para después distribuirse por el sistema nervioso (Nguyen y col., 1996), del mismo modo que se ha sugerido que el virus IPNV podría penetrar en el rodamallo a través de los poros sensoriales del sistema de la línea lateral (Novoa y col., 1995). La diferencias entre las tres cepas a nivel de la piel podrían deberse a que mientras que la cepa recombinante parece penetrar sólo a través de la piel, las cepas SJNNV y RGNNV también lo hacen a través de las branquias, por lo que no deberían necesitar un alto nivel de replicación en la piel (por eso la cepa SJNNV sólo se recupera el primer día). Sin embargo, la cepa RGNNV replica en la piel hasta el tercer día p.i., lo que podría deberse a que los viriones se encuentran con algún tipo de dificultad para penetrar a través de esta vía, lo que confirmaría nuestra hipótesis inicial. Por otro lado, se observó producción viral en piel en los tres grupos de peces infectados cuando la infección ya estaba establecida en el cerebro, a los 8, 9 y 10 d.p.i. Esta observación concuerda con un estudio realizado por Azad y col. (2006) en el que localizaron partículas virales en regiones de la musculatura en la base de las escamas, lo que identifican como una posible ruta de salida del virus al exterior. En órganos internos se recuperaron partículas infectivas de los tres genotipos en los últimos días de la infección, la cepa SJNNV mostró una mayor presencia en estos tejidos ya que la recuperación del virus infectivo se extendió a las 48 h.p.i. y al día 6 p.i. La presencia de partículas infectivas en órganos internos se podría explicar como resultado del secuestro de virus por parte de los mecanismos de defensa del pez (Húsagğ y col., 2001). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores que detectaron el virus replicando a baja concentración en vísceras y gónadas (Azad y col., 2006; Banu y col., 2007; Lopez-Jimena y col., 2011; Nguyen y col., 1997)

En conclusión, los datos obtenidos demuestran que la cepa recombinante Ss160.03 es la cepa más eficaz infectando lenguados ya que llega al cerebro con celeridad, alcanzando unos altos niveles de replicación, y es la que causa signos clínicos más acusados y mortalidad más rápidamente tras una infección por baño, la ruta más parecida a la infección natural.

Asimismo, es la más efectiva en la producción de partículas infectivas a lo largo de todo el proceso infeccioso, como lo demuestran los títulos virales obtenidos de peces muertos en cultivo celular, y también es la que presenta menor diferencia entre partículas infectivas recuperadas y número de copias de RNA2 detectadas en el cerebro. La cepa Ss160.03 presenta una cápside tipo SJNNV pero que contiene dos sustituciones aminoacídicas en la región C-terminal con respecto a la cepa SJNag93 (Oliveira y col., 2009). Se sabe que un pequeño número de sustituciones aminoacídicas en la proteína de la cápside pueden tener efectos dramáticos en la especificidad de huésped de diferentes virus animales (Baranowski, 2001). La recombinación se ha asociado a la colonización de nuevas especies por betanodavirus (Oliveira y col., 2009; Panzarin y col., 2012; Toffolo y col., 2007). Nuestros resultados apoyan que las sustituciones en el extremo C-terminal de la proteína de la cápside favorecen la infección del lenguado, y por lo tanto, que la recombinación ha facilitado la colonización de esta especie.





PAPER 1



1. Souto, S., Lopez-Jimena, B., Alonso, M. C., García-Rosado, E. & Bandín, I. **Experimental susceptibility of European sea bass and Senegalese sole to different betanodavirus isolates.** *Vet. Microbiol.* **177**, 53–61 (2015).
Doi: [10.1016/j.vetmic.2015.02.030](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.030)





CAPÍTULO 2:
**CARACTERIZACIÓN DE DETERMINANTES DE
VIRULENCIA EN BETANODAVIRUS.**

***In vitro* and *in vivo* characterization of molecular determinants
of virulence in reassortant betanodavirus.
J. Gen. Virol. **96**, 1287–1296 (2015).**



1. INTRODUCCIÓN

La patogenicidad se define como la capacidad de un virus de producir enfermedad en un huésped. La virulencia, o grado de patogenicidad de una cepa, depende de una variedad de factores entre los que destaca la cantidad de viriones necesaria para la infección, la vía de penetración de los mismos en el organismo, el tropismo por un órgano o tejido determinados, la habilidad para evadir el sistema inmune del huésped, y la velocidad de multiplicación. Pero además, en el desarrollo de la enfermedad intervienen factores relacionados con el huésped: como las defensas (barreras físicas y respuesta inmunológica), la edad, el estado nutricional y hormonal, la especie, y el medio ambiente.

La virulencia de un virus está determinada por múltiples factores genéticos, por lo que las alteraciones de los determinantes de virulencia se pueden manifestar a través de gran variedad de mecanismos. Por ejemplo, se sabe que en el virus Influenza los cambios en la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina tienen la capacidad de modificar la preferencia de unión a un determinado huésped o modificar el tropismo, dado que dominios específicos de esta glicoproteína son responsables de la unión a células humanas o a células de aves (Schrauwen y col., 2014). En otros casos, como coronavirus, rotavirus y paramixovirus la escisión de glicoproteínas de fusión precursoras es determinante para la entrada del virus en la célula (Böttcher-Friebertshäuser y col., 2014; Gilbert y Greenberg, 1998; Millet y Whittaker, 2014). En el virus de la enfermedad de Newcastle determinados residuos en la región amino terminal (N-terminal) de la proteína de fusión (F) se han asociado a aislados muy virulentos (Dortmans y col., 2011). En virus de peces, en el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) se ha comprobado que los residuos 217 y 221 de la proteína VP2 son determinantes de virulencia en las cepas del serotipo Sp (Song y col., 2005), y en el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) se ha sugerido que la mutación de único aminoácido podría alterar la escisión de la proteína de fusión y tener un efecto directo sobre la virulencia (Markussen y col., 2008).

En betanodavirus se ha descrito que la capacidad de infectar diferentes especies de peces reside en la proteína de la cápside, en concreto en los dominios aminoacídicos que se corresponden con las protuberancias del extremo carboxilo-terminal (C-terminal) de la proteína (Iwamoto y col., 2004). La secuencia nucleotídica del ARN2 (codificante de la proteína capsidal), comprendida entre las posiciones 695 y 765, ha sido señalada como una secuencia determinante de huésped por Ito y col. (2008). Por otro lado, Nishizawa y col.

(1999) localizaron un posible determinante antigénico de células-B en dicha proteína, entre los residuos 254–256, en un aislado de jurel dentón; mientras que Costa y col. (2007) encontraron una gran actividad antigénica en los residuos 181-212, en un estudio realizado con muestras de suero obtenidas de lubinas infectadas con betanodavirus.

Uno de los mecanismos de evolución de los virus con gran implicación en la virulencia es la recombinación intragénica e intergénica. La posibilidad de intercambio de segmentos genómicos en betanodavirus o *reassortment* se describió por primera vez en un estudio realizado por Iwamoto y col. (2004) en el que describen la obtención de cepas quiméricas en laboratorio de tipo SJNNV/RGNNV y RGNNV/SJNNV, demostrando así la viabilidad de este fenómeno. Además, se ha observado el intercambio de segmentos genómicos en la naturaleza, con el aislamiento de recombinantes de tipo SJNNV/RGNNV (Toffolo y col., 2007) a partir de lubina y de tipo RGNNV/SJNNV (Olveira y col., 2009; Panzarin y col., 2012) a partir de dorada, diferentes especies de lenguado (*Solea solea* y *S. senegalensis*) y lubina. Es importante resaltar que hasta el momento sólo se ha descrito este intercambio entre cepas de los genotipos RGNNV y SJNNV. Además, parece existir una relación entre el tipo de *reassortment* y la virulencia para una determinada especie hospedadora; así, las cepas recombinantes SJNNV/RGNNV se aislaron únicamente de lubina con sintomatología de VER (Toffolo y col., 2007) mientras que los betanodavirus RGNNV/SJNNV se han detectado principalmente en lenguado y dorada que presentaban también síntomas de la patología (Olveira y col., 2009; Panzarin y col., 2012), aunque también de lubinas e invertebrados marinos sin síntomas. En este sentido es interesante señalar que las cepas RGNNV/SJNNV aisladas de lubina (Panzarin y col., 2012) causaron una baja mortalidad en infecciones experimentales en esta especie (Vendramin y col., 2014), lo que parece confirmar que sólo los recombinantes SJNNV/RGNNV serían patógenos para esta especie. El análisis de 6 cepas RGNNV/SJNNV procedentes de lenguado y dorada reveló que presentaban una proteína de la cápside de tipo SJNNV con ligeras modificaciones, con una diferencia de 3 aminoácidos en todas las cepas que podía llegar hasta 6 en algunos casos (Olveira y col., 2009). Uno de estos cambios, que se observó en posición 247, estaba codificado por el triplete 737-739, incluido en la secuencia 695 a la 765 descrita previamente por Ito y col. (2008) como una secuencia determinante de huésped. Otro cambio en la secuencia aminoacídica fue observada en el residuo situado en la posición 270, que se

encuentra en el extremo carboxilo de la proteína de la cápside; como ya se ha indicado, esta región se considera responsable de la especificidad de huésped (Iwamoto y col., 2004).

Dentro de las técnicas de ingeniería del ADN disponibles hasta el momento, la genética inversa es una de las más útiles a la hora de conocer los ciclos de vida de los virus y los procesos biológicos implicados en la infección del huésped. La técnica de genética inversa se basa en la producción de virus a partir del ADN copia del genoma viral. Desde que en 1981 se generó por primera vez un poliovirus empleando esta técnica (Racaniello y Baltimore, 1981) se han desarrollado sistemas para una amplia variedad de virus pertenecientes a prácticamente todas las familias virales, tanto de virus ADN como virus ARN de cadena positiva, cadena negativa y ARN de doble cadena. Se ha empleado para numerosos estudios de virus humanos (Stobart y Moore, 2014) y también se ha desarrollado para un gran número de virus de peces entre lo que se encuentran virus de los géneros *Alphavirus*, *Novirhabdovirus*, *Aquabirnavirus* y *Betanodavirus* (Biacchesi, 2011).

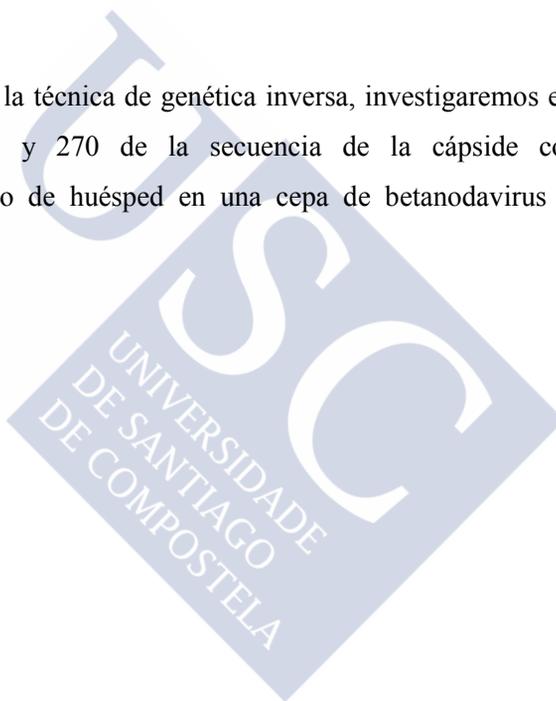
La importancia de esta técnica reside en la posibilidad de obtener “virus a la carta”, es decir, el ADN copia del genoma viral puede ser modificado de manera que se pueden generar virus con deleciones, inserciones de genes heterólogos o mutaciones. Esto hace que sea una herramienta perfecta para el estudio de determinantes de virulencia y patogenicidad, además de ser una técnica clave para el desarrollo de nuevas vacunas.

La técnica de genética inversa se ha utilizado para el estudio de los alfanodavirus, y gracias a esta técnica se ha podido reconstruir el ciclo de vida de estos virus además de profundizar en procesos vitales como los mecanismos implicados en la replicación, expresión de genes, la regulación, empaquetamiento y encapsidación. También se ha empleado para la obtención de vectores para la presentación de antígenos en el desarrollo de vacunas (Ball y Johnson, 1999). En betanodavirus, Iwamoto y col. (2001b) realizaron un primer ensayo en el que mediante la transfección en células E-11 de ARN viral purificado consiguieron recuperar virus con capacidad de infectar células *in vitro* y de inducir la patología en el pez hospedador. En ese mismo año Iwamoto y col., (2001a) publicaron el primer sistema de producción de betanodavirus a partir del ADN copia. Para ello secuenciaron completamente una cepa de tipo SJNNV y generaron el ADN copia de los segmentos completos añadiendo al extremo 5' la secuencia del promotor de T7. Insertaron cada segmento en un plásmido para realizar la transcripción *in vitro* y realizaron la transfección en células E-11, obteniendo un virus que se

demonstró virulento en larvas de jurel dentón. Sin embargo, se ha visto que la generación de virus recombinantes mediante transfección directa de ARNs sintéticos en células de peces presenta problemas para la obtención de partículas infectivas, lo que puede deberse en parte a la inestabilidad del RNA obtenido *in vitro* y su posible degradación, así como la adición de nucleótidos no virales en 3' que afectan a la replicación (Iwamoto y col. 2004). Más tarde Fenner y col. (2006) y Takizawa y col. (2008b) utilizaron un sistema de generación de virus de genotipo RGNNV a partir del ADNc transfectado en las células BSRT7/5, células que expresan constitutivamente la polimerasa T7, y previamente utilizadas en alfanodavirus (Johnson y Ball, 2001).

OBJETIVO

En este capítulo, empleando la técnica de genética inversa, investigaremos el papel de las posiciones aminoacídicas 247 y 270 de la secuencia de la cápside como posibles determinantes de virulencia y/o de huésped en una cepa de betanodavirus recombinante natural RGNNV/SJNNV.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 VIRUS Y CÉLULAS

La cepa empleada en este capítulo es la cepa recombinante Ss160.03 descrita en los capítulos anteriores, a la que denominaremos wSs160.03 de *wild strain*, cepa salvaje, para diferenciarla claramente de las cepas recombinantes derivadas obtenidas mediante genética inversa. El virus se propagó en la línea celular E-11 siguiendo el protocolo previamente descrito (Capítulo 1, sección 2.1).

La línea celular BSRT7/5, cedida amablemente por el Dr. KK Conzelmann (Instituto Max von Pettenkofer y Gene Center, Universidad Ludwig-Maximilians, Múnich, Alemania) (Buchholz y col., 1999), deriva de la línea BHK- 21 de fibroblastos de riñón de hámster (Stoker y Macpherson, 1964) y está formada por células que expresan constitutivamente la ARN polimerasa de T7. Para el cultivo se utilizó medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con L-glutamina al 2 mM, penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 mg/ml) y 10% de suero bovino fetal. Las células se incubaron a 37° C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 98% de humedad y, cada dos pases, se incubaron con geneticina (G418) a una concentración de 1 mg/ml.

2.2 DETERMINACIÓN DE EXTREMOS

Para conseguir la secuencia completa de la cepa SpSs-IAusc160.03 se realizó la secuenciación de las regiones no codificantes de los extremos, ya que la mayor parte de ambos segmentos, incluyendo la región codificante, había sido previamente secuenciada (Oliveira y col., 2009).

2.2.1 Amplificación de los extremos

Para determinar la secuencia completa de los extremos 5' y 3' virales se empleó la técnica de rápida amplificación de extremos de ADNc, mediada por ARN ligasa (RLM-RACE, Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, para la determinación del extremo 5', el ARN viral se trató con una fosfatasa alcalina (CIP) para eliminar los fosfatos libres del extremo 5' de las moléculas de ARN incompletas. Seguidamente se eliminó, utilizando la pirofosfatasa ácida del tabaco (TAP), el capuchón 5' de aquellas moléculas en

las que el extremo 5' estaba íntegro, liberando un 5' monofosfato y se unió un oligonucleótido adaptador, empleando la ligasa T4. Posteriormente se realizó la transcripción inversa empleando cebadores aleatorios. En el caso del extremo 3', ambos ARNs fueron poliadenilados empleando una poli(A) polimerasa (Invitrogen). El ADNc se sintetizó empleando un oligonucleótido que contenía un adaptador y una cola de timinas como cebador de la transcripción inversa. En todos los casos la síntesis del ADNc de los extremos se realizó con la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV) según las indicaciones de la casa comercial (Tabla 3).

La amplificación de cada extremo se llevó a cabo en hielo: en un volumen final de 50 µl se añadieron 5 µl de tampón I 10×, 1 µl del ADNc sintetizado, 0,2 µl de enzima *Accuprime™ taq DNA polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific), y 1 µl de cada cebador a una concentración de 10 µM. La amplificación de los fragmentos 5' se realizó empleando un cebador proporcionado por la casa comercial, en el caso del cebador directo, y cebadores específicos de nuestra secuencia como reverso. El extremo 3' se amplificó empleando un cebador proporcionado por la casa comercial (reverso) y un cebador específico del ARN viral (directo). Los cebadores específicos empleados son los 5'FchR1 y 3'FchR1 para el ARN1 y los 5'FchR2 y 3'FchR2 para el ARN2 (Tabla 4). Finalmente se realizó el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y extensión a 68 °C 30 s. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,2 % teñido con RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution.

Tabla 3 Reacción de transcripción inversa para generar el ADN copia (ADNc) a partir de los segmento ARN virales empleando la enzima M-MLV y protocolo de incubación.

RLM-RACE (Síntesis de ADNc)		
Cantidad	Reactivos	
	extremo 5'	extremo 3'
1 µg	RNA con adaptador 5'	RNA poliadenilado
4 µl	dNTPs	dNTPs
2 µl	Cebadores aleatorios	Adaptador 3'RACE
2 µl	Tampón de RT 10×	
1 µl	M-MLV transcriptasa inversa	
1 µl	Inhibidor nucleasas	
Hasta 20 µl	Agua libre de nucleasas	
Incubación a 42 °C durante 1 hora		

Para la extracción y purificación de los fragmentos de PCR a partir del gel de agarosa se empleó el kit comercial *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel). Las bandas extraídas se incubaron con el tampón NT1 (200 μ l de tampón por cada 100 mg de agarosa) en agitación a 50 °C durante 10 min para disolver completamente la agarosa. Una vez incubada la muestra se purificó por centrifugación a través de una columna suministrada por el fabricante (11.000 \times g durante 30 s). Posteriormente se realizaron 2 lavados con 700 μ l de tampón NT3 (previamente suplementado con etanol) seguidos de una centrifugación a 11.000 \times g y descartando el eluido. En el segundo lavado se realizó una centrifugación durante 2 min para eliminar completamente los residuos de etanol. Finalmente se realizó la elución con 30 μ l de agua libre de nucleasas. La concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 como se ha descrito previamente (capítulo 1, sección 2.4.4) y la especificidad de la banda extraída se analizó en un gel de agarosa al 1% utilizando el marcador *GeneRuler™ 1 Kb ladder* (Thermo Scientific).

2.2.2 Clonación de los extremos

Los fragmentos de PCR obtenidos para cada extremo se insertaron en el plásmido pGEM®-T Easy Vector según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se introdujo cada plásmido de clonación en células *E. coli* DH5a realizando una transformación por electroporación (Sambrook y Russell, 2001) (Ver apéndice A). Se seleccionaron 10 clones de cada extremo para secuenciar. Se sembró una colonia de cada clon en 2 ml de medio LB con ampicilina y se incubó en agitación durante un máximo de 16 horas. Posteriormente se realizó una extracción del plásmido empleando el kit comercial *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific): en primer lugar se realizó una centrifugación a 6.800 \times g durante 2 min, se vació el medio completamente y se resuspendieron las células en el primer tampón. Posteriormente se añadió el tampón de lisis, invirtiendo el tubo de 4-5 veces para homogeneizar la muestra y se incubó un máximo de 5 minutos. Se añadieron 350 μ l de tampón de neutralización para detener la lisis y se mezcló por inversión hasta conseguir una muestra de aspecto lechoso. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 12.000 \times g durante 5 min para separar los restos celulares de la muestra. Se recogió el sobrenadante con cuidado para no arrastrar la fase blanquecina, se cargó en una columna de purificación suministrada por el fabricante y se centrifugó. Se realizaron 2 lavados añadiendo 500 μ l de tampón de lavado seguido de una centrifugación a 12.000 \times g. La última

centrifugación se realizó durante 2 min para secar completamente la membrana. El plásmido purificado se eluyó con 50 µl de agua libre de nucleasas.

Tabla 4 Relación de cebadores empleados en el sistema de genética inversa

Cebador	Secuencia (5'→3')	Posición	
Cebadores RACE		RNA1#	RNA2*
5'FchR1	GGTGTTATGTGCTCGCGGCTCTTT	1448-1425	
3'FchR1	GCAAAGAGCCGCGAGCACATAACACC	1423-1448	
5'FchR2	GGCGACGACTGCACCACGAG		458-477
3'FchR2	TTGAGACACCTGAGGACACCACCGCT		662-687
Cebadores para la amplificación completa de los segmentos virales			
5T7R1	GGATCCCCGCGGTAATACGACTCACTATAGGTAACATCACCTTCTTGCTCTG		5'RNA1
5T7R2	GGATCCCCGCGGTAATACGACTCACTATAGGTAATCTAACACCGCTTTGCAAG		5'RNA2
3NaeR1	<u>G</u> CCGGCCGAAGCGTAAGACAGCATAAAGC		3'RNA1
3NaeR2	<u>G</u> CCGGCCGAGTATTGTAGCGATCAGCGGCC		3'RNA2
Cebadores para la eliminación de dianas de NaeI		RNA1#	RNA2*
MutNaeR1	CATTTGGTGCCGATTGCGGGCACTGGCCGTCCC	1483-1515	-
MutNae1R2	GCGATTGACGTCACCTGGCCGCTGGTACTCCTGTGTG	-	552-589
MutNae2R2	CCACGGCAAATCTTGCTGCCGCTGGCAGCTCTCACCC	-	991-1030
Cebadores para revertir cambios en el extremo 3'			
3RevR1	CATTTGGTGCCGATTGCGGGCACTGGCCGTCCC		3'RNA1
3RevR2	GCGATTGACGTCACCTGGCCGCTGGTACTCCTGTGTG		3'RNA2
Posición respecto a la secuencia de la cepa SpSs-IAusc160.03 con número de acceso en GenBank #FJ803911 y *FJ803923			

2.2.3 Secuenciación de los extremos.

Antes de proceder a la secuenciación de los fragmentos se realizó una estimación de la concentración de ADN plasmídico en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Ver capítulo 1, sección 2.4.4). En la reacción de secuenciación se utilizaron de 0,5 a 10 µl de muestra en función de la concentración de partida, teniendo en cuenta que la ratio cebador y ADN debe ser mayor o igual que 40:1 y que para ADN plasmídico la cantidad de ADN molde debe estar entre 50-100 fmol. Se utilizó 1 µl de cebador a una concentración de 0,05 µM (Tabla 5), 2 µl de *DTCS Quick Start Master Mix* (Beckman Coulter), y 1,5 µl de tampón de secuenciación (GenomeLab™), por último se añadió agua destilada hasta ajustar un volumen final de 20 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *MyCycler*™ (Bio-Rad), se realizó un primer paso de desnaturalización a 95° C durante 1 minuto seguido de 30 ciclos de amplificación que incluían 20 segundos a 96° C, una hibridación a 50° C durante 20 segundos y una fase de elongación durante 4 minutos a 60° C. Finalmente se mantuvo a 4° C. El producto de la amplificación se purificó mediante precipitación con etanol. En primer lugar a los 20 µl de

reacción se le añadieron 5 μ l de una solución formada por: 2 μ l de acetato de sodio 3 M, 2 μ l de Na₂-EDTA 100 mM (pH 8.0) y 1 μ l de 20 mg/ml de glicógeno. Se mezcló y se añadió a un vial de 1,5 ml junto con 60 μ l de etanol al 95% a -20 °C, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 16.000 \times g a 4° C durante 15 minutos. Posteriormente se retiró todo el sobrenadante y se realizaron dos lavados del ADN precipitado con 200 μ l de etanol al 70% a -20 °C. En cada lavado se centrifugó a 16.000 \times g a 4 °C durante 2 minutos. Después de centrifugar se retiró cuidadosamente todo el sobrenadante. Para eliminar los restos de etanol se introdujo en una bomba de vacío *Speed Vac* (Savant) hasta que la muestra se secó completamente. Por último, se resuspendió en 40 μ l de solución de carga SLS (Beckman Coulter). Después de incubar las muestras durante 1 minuto a 92° C se transfirieron a una placa de secuenciación y se añadió una gota de aceite mineral a cada pocillo. La secuenciación de los fragmentos se llevó a cabo usando *CEQTM 8000 Genetic Analysis System* (Beckman Coulter). La reacción de secuenciación se realizó en ambos sentidos y por duplicado. Para el ensamblaje y análisis de las secuencias se usaron los programas *SeqMan II* y *EditSeq*, incluidos en el paquete *DNASTAR Lasergene v.7.2*. El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el programa *MegAlign*.

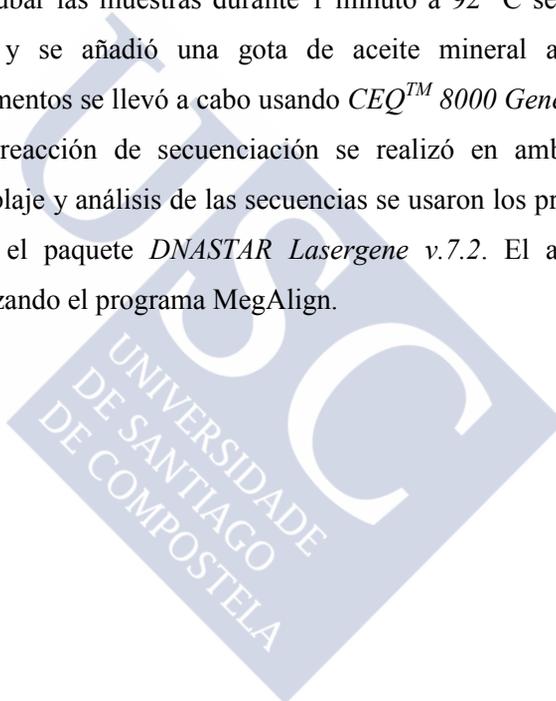


Tabla 5 Relación de cebadores empleados para la detección y secuenciación de la cepa wSs160.30 y los virus recombinantes derivados (rSs160.03).

Cebador	Secuencia (5'→3')	Posición RNA 1 [#]	Posición RNA2*	Fragmento (pb)
Cebadores para secuenciación completa del ARN1				
Nod1BR1F	CGCAAGGTTACCGTTTAGC	37-55		669
Nod1BR1R	CATGGTATCCTGGTTGATGTTCC	683-705		
Nod1BR2F	CAAGTACTGTGTCCGGAGAGGTTA	581-604		669
Nod1BR2R	GAGCAAGATCGCCAGGTTTATG	1228-1249		
Nod1BR3F	AACATCCGCACTGCATACGAACTG	1090-1113		651
Nod1BR3R	ATGCTGGAGAACACTGGCTTTGAA	1717-1740		
Nod1BR4F	AATGCCCAAATTATCCAGGAAC	1639-1662		800
Nod1BR4R	GCCCGGCACCAATGACCAATAAAA	2415-2438		
Nod1BR5F	CGACATTGGCTGGGCTAAGACACA	2361-2384		744
Nod1BR5R	GCCGAAGCGTAAGACAGCATAAAG	3081-3104		
Cebadores para secuenciación completa del ARN2 (Olveira y col. 2009)				
NNVs2_1f	AAGTCAAATGGTACGCAAAGGTG		20-43	527
NNVs2_1r	CTTCCCGGTTGAGGTCCAGAGA		525-546	
NNVs2_2f	GCTTCCTGCCTGATCCAACCTGA		404-425	568
NNVs2_2r	GGCGCCCCAACTGTGAATGTCT		950-971	
NNVs2_3f	CGTTACTACTGGATTTTCGTTC		732-752	655
NNVs2_3r	ACATGGCGGTGGTGCTC		1370-1386	
Cebadores específicos del plásmido pGEM-T				
M13F	GTTTTCCAGTCACGAC			
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC			
Cebadores específicos para la identificación del virus				
F7 ^a	ATATCACGATGAGTTCTACTA	1584-1603		642
R7 ^a	CGATTCATATTTTCAAGTC	2206-2225		
F2 ^b	CGTGTCAGTCATGTGTCGCT		615-634	427
R3 ^b	CGAGTCAACACGGGTGAAGA		1022-1041	
Posición respecto a la secuencia de la cepa SpSs-1Ausc160.03 con número de acceso en GenBank #FJ803911 y *FJ803923. ^a Névarez y col. (2005); ^b Nishizawa y col. (1994)				

2.3 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

2.3.1 Amplificación de segmentos virales completos

En base a la secuencia completa de los extremos de la cepa Ss160.03 se diseñaron cebadores que hibridaran los con extremos 5' y 3' de los segmentos ARN1 y ARN2. A partir de virus semipurificado (Ver apéndice B) se obtuvo el ADNc de ambos segmentos virales (ARN1 y ARN2) empleando el kit *SuperScriptTM III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Posteriormente se realizó una amplificación de los segmentos virales completos empleando la enzima Platinum® *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen), una polimerasa de alta fidelidad de copia. Se preparó en hielo la siguiente mezcla de reacción: 5 µl de tampón *pfx* 10×, 1,5 µl de mezcla de dNTPs, 1 µl de MgSO₄, 1,5 µl de mezcla de cebadores (10 µM cada uno), 2 µl de ADNc y 0,4 µl de enzima Platinum *pfx*, añadiendo agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 µl. La amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y extensión a 68 °C 30 s.

Como cebadores 5' se diseñaron unos oligonucleótidos que contenían una diana para la enzima *SacII* seguida de la secuencia del promotor T7 fusionada con el extremo 5' de los segmentos virales (cebadores T7R1 y T7R2), (Tabla 4). Además se añadieron 2 guaninas entre el promotor T7 y el extremo 5' que se ha visto que favorecen la transcripción (Takizawa y col., 2008b). Los cebadores del extremo 3' (*3NaeR1* y *3NaeR2*) se diseñaron incluyendo las secuencias del extremos 3' con un nucleótido modificado que permitió la introducción de una diana de restricción *NaeI*, enzima que proporciona extremos romos. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,2 % teñido con *RedSafeTM Nucleic Acid Staining Solution*. Las bandas obtenidas se purificaron a partir del gel (apartado 2.2.1.) y se insertaron en el vector de clonación de extremos romos pJET1.2 empleando para ello el kit *CloneJET PCR Cloning* (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante, dando lugar a los plásmidos denominados pJetRNA1 y pJetRNA2. Se realizó la secuenciación completa de los segmentos virales insertados en los vectores de clonación para comprobar que la secuencia era fiel a la original (depositada en el *GenBank*) empleando la batería de cebadores descritos en la Tabla 5. Se realizó un cultivo en medio LB con ampicilina y posterior purificación de los plásmidos, que se conservaron a -80 °C hasta su uso.

2.3.2 Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida se realizó empleando el kit comercial QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). Con la intención de eliminar las dianas de restricción para NaeI presentes en el interior de las secuencias (1 en ARN1 y 2 en ARN2 se emplearon los cebadores (MutNaeR1, MutNae1R2 y MutNae2R2, Tabla 4) que contiene un nucleótido sustituido que introducen mutaciones silenciosas puntuales de manera que se eliminan la diana de restricción sin alterar la secuencia codificante. Estas mutaciones se reversionaron al final de la construcción del plásmido de expresión empleando los cebadores 3RevR1 y 3RevR2 (Tabla 4).

Las reacciones de mutagénesis se realizaron utilizando como molde los plásmidos purificados pJetRNA1 y pJetRNA2. La síntesis de los plásmidos mutados se realiza en una reacción de PCR empleando la enzima *PfuTurbo* (Tabla 6).

Tabla 6. Procedimiento de mutagénesis dirigida empleando el kit comercial Multi Site-Directed Mutagenesis.

Mutagénesis dirigida		
Reactivo	pJetRNA1 (>5Kb)	pJetRNA2(<5Kb)
10× Tampón QuikChange	2,5 µl	2,5 µl
Plásmido	100 ng	50 ng
Cebadores mutagénicos#	100 ng	100 ng
Mezcla de dNTPs	1 µl	1 µl
Enzima <i>PfuTurbo</i>		1 µl
Agua libre de nucleasas		Hasta 25 µl

Protocolo: Desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y extensión a 65 °C 2 min/Kb del plásmido. #Cebadores MutNaeR1, MutNae1R2 y MutNae2R2 (Tabla 4).

Una vez realizada la PCR se incubó el producto con la enzima de restricción *Dpn I* durante 1 hora a 37 °C. Esta enzima de restricción tiene la diana para la secuencia 5'-Gm⁶ATC-3', y por tanto digiere específicamente las cadenas que contienen metilaciones. El ADN producido en *E. coli* generalmente contiene estas secuencias por lo que se producirá la digestión de las cadenas parentales metiladas o de las cadenas hemimetiladas, que se corresponden con las

cadena que no contienen las mutaciones o mezcla de cadenas con y sin mutaciones, respectivamente; mientras que las cadenas que contienen las mutaciones, sintetizadas por la *PfuTurbo* DNA polimerasa suministrada en el kit, permanecerán intactas.

Posteriormente, empleando 1,5 µl de cada plásmido mutado (pJetR1MutNae y pJetR2MutNae) se realizó la transformación de células *E. coli* por electroporación (ver apartado 2.2.2. y apéndice A). Una vez obtenidos los clones se secuenciaron para comprobar la existencia de las mutaciones deseadas. Finalmente se realizó un nuevo cultivo y purificación de los plásmidos que se conservaron a -80 °C hasta su uso.

2.3.3 Construcción de pBS160R1 y pBS160R2

El plásmido de expresión pBSδRiboT7t, cedido por el Dr. Brémont (Biacchesi y col., 2000), se utilizó para la expresión de los dos segmentos genómicos de la cepa SpSs-IAusc160.03. Este plásmido contiene una secuencia antígenómica de una ribozima derivada del virus de la hepatitis δ (HDV) que permite cortar los segmentos de ARN obtenidos en el momento de la transcripción inmediatamente en el extremo 3' viral, es decir, no se producirán segmentos con nucleótidos adicionales en 3'. La secuencia de la ribozima se encuentra flanqueada en su extremo 5' por una diana de restricción de *SmaI* y a continuación de su extremo 3' la secuencia de T7 terminadora (Figura 9).

2.3.3.1 Linearización del pBSδRiboT7t

Para la linearización del plásmido se realizó una digestión con las enzimas *SacII* (diana de restricción: CCGC↓GG) y *SmaI* (diana de restricción: CCC↓GGG). La digestión se realizó en dos partes. En primer lugar el ADN plasmídico (6 µg) se incubó en presencia de 40 U de *SmaI* y 5 µl de tampón 10× (33 mM Tris-acetato, pH 7,9 a 37 °C, 10 mM acetato de magnesio, 66 mM acetato de potasio, 0,1 mg/ml BSA) en un volumen total de 50 µl durante 1 hora y media a 30 °C. Posteriormente, se añadieron a la reacción de digestión 40 U de la enzima *SacII* y se dejó incubar una hora y media a 37 °C. Una vez realizada la digestión se purificó el ADN linearizado en una columna de purificación de ADN del kit *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), añadiendo 3 volúmenes de tampón PB. Seguidamente se realizaron 2 lavados con 750 µl de tampón PE, se centrifugó, se descartó el eluido y se resuspendió la muestra en 44 µl de agua libre de nucleasas. Por último para evitar la recircularización del

plásmido purificado se incubó con 1 µl de fosfatasa alcalina intestinal bovina (CIAP) (Promega) y 5 µl de tampón 10× durante 45 minutos a 37 °C. La enzima se inactivó a 80 °C durante 20 minutos. Finalmente el plásmido linearizado se guardó a -80 °C hasta su uso.

2.3.3.2 Liberación del inserto

En primer lugar se liberaron los segmentos genómicos del virus a partir de los plásmidos de clonación pJetR1MutNae y pJetR2MutNae. Para ello se incubaron: 10 µg de cada ADN plasmídico con 30 U de la enzima *SacII*, 20 U de *NaeI* (GCC↓GGC), 5 µl de tampón 10× y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 µl a 37 °C durante 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se cargó en un gel de electroforesis de agarosa al 1,2 % y se recuperó el inserto. Se purificó empleado el kit de purificación de bandas de agarosa *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), para ello se recortó la banda correspondiente al tamaño del inserto. Se añadieron 3 volúmenes de tampón QG y se incubó durante 10 minutos a 50 °C. Una vez disuelto el gel se le añadió 1 ml de isopropanol y se cargó en la columna de purificación. Se hizo pasar la muestra a través de la membrana por centrifugación y se descartó el eluido. Se realizó un primer lavado con el tampón QC y posteriormente dos lavados con el tampón PE. Se descartó el eluido y finalmente se resuspendió el ADN en 30 µl de agua libre de nucleasas. El ADN copia del ARN1 y ARN2 de la cepa Ss160.03 se insertó en su correspondiente plásmido de expresión (Figura 9). Para ello se incubaron el vector (pBSδRiboT7t) y los fragmentos purificados en una ratio molar 1:3 (vector:inserto) en presencia de 1 µl de tampón 1×, 1 µl de enzima T4 ligasa (Promega) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 10 µl durante aproximadamente 18 horas a 15 °C.

2.3.3.3 Clonación y preparación del plásmido

Las ligaciones se clonaron en células competentes *E. coli* TG1 mediante choque térmico. Para ello se añadieron 5 µl de producto de ligación a las células TG1 en hielo y se dejaron incubar durante 1 h. Posteriormente se realizó un choque térmico de 55 s a 42 °C y se devolvieron rápidamente al hielo. Una vez que la temperatura descendió se le añadieron 250 µl de medio LB, y las bacterias se incubaron a 37 °C durante 1 h en agitación para su recuperación, y se continuó con el procedimiento de clonación descrito anteriormente. Se seleccionaron al menos 5 clones de cada segmento y se secuenciaron completamente para confirmar la existencia de una copia exacta del genoma viral empleando los cebadores

descritos en la Tabla 5. Los clones seleccionados se utilizaron para producir masivamente los plásmidos de expresión pBS160R1 y pBS160R2, que se purificaron con el kit comercial *NucleoBond® PC-500* (Macherey-Nagel). Brevemente, se realizó un inóculo a partir de una colonia de los clones seleccionados en 250 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó un máximo de 16 h. Se centrifugó a $5.000 \times g$ durante 15 min a 4 °C y el sedimento bacteriano se resuspendió en 12 ml de tampón S1 suplementado con ARNasa A. Se le añadieron 12 ml de tampón de lisis S2 mezclando por inversión y se incubó a temperatura ambiente un máximo de 5 min. Posteriormente, se añadieron 12 ml de tampón de neutralización a 4 °C. Se observó una turbidez blanca al precipitar las proteínas y el DNA cromosómico, la muestra se pasó por un filtro de papel y se dejó decantar. Inmediatamente se pasó la fase acuosa por una columna de extracción de gran capacidad previamente equilibrada. Seguidamente se dejaron pasar por gravedad a través de la columna 32 ml del tampón N3 para lavar los restos no deseados retenidos en la misma. Se realizó la elución de los ácidos nucleicos añadiendo 5 ml del tampón N5, el eluido se recogió en un tubo de centrifugación, donde se realizó la precipitación del ADN añadiendo 11 ml de isopropanol a temperatura ambiente, y se centrifugó a $15.000 \times g$. Posteriormente se realizó un lavado del sedimento con 5 ml de etanol a -20 °C seguido de una nueva centrifugación. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar completamente el precipitado. Finalmente se resuspendió el precipitado y se ajustó la concentración para obtener una solución stock de 1 µg/µl que se almacenó a -80 °C hasta su uso.

2.4 TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS BSR-T7/5

Un día antes de realizar la transfección se preparó una placa de 6 pocillos añadiendo 10^6 células/pocillo necesarias para obtener un tapiz confluyente en 24 h. La transfección se realizó añadiendo 1 µg de cada plásmido de expresión (pBS160R1 y pBS160R2) empleando como agente transfectante *Lipofectamina 2000* (Invitrogen). Se prepararon 2 tubos de cristal con 125 µl de medio *Opti-MEM* (Gibco), a un tubo se le añadió 1 µg de cada plásmido de expresión (2 µg totales) al otro tubo se le añadió la lipofectamina (6 µl). Se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurridos los 5 minutos se mezclaron ambas soluciones y se incubaron otros 20 minutos. El complejo se añadió gota a gota a un pocillo de células BSRT7/5 con 1 ml de medio DMEM sin antibiótico, repartiendo la solución por todo el área del pocillo. Al mismo tiempo, y siguiendo el mismo procedimiento, se realizó una

transfección empleando un plásmido cedido por el Dr. Brémont que contenía la secuencia codificante de una proteína de expresión en membrana, que se empleó como control de la transfección, como se explicará en el apartado inmunofluorescencia.

Las células transfectadas se incubaron durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se cambió el medio y la placa se incubó a 28 °C. Seis días más tarde se recuperó el contenido del pocillo rascando el tapiz para liberar todas las células y se sometió a tres rondas de congelación-descongelación con hielo seco. Se clarificó el lisado mediante centrifugación a $1.500 \times g$ durante 5 min a 4 °C y se realizaron dos diluciones del sobrenadante (1/100 y 1/1000) que se inocularon en la línea celular E-11 a 25°C para la recuperación del virus (P1). Después de 7 días sin observación de efecto citopático (ECP), se realizó un pase en blanco (P2), tras el cual se obtuvo ECP. A continuación se rasó el tapiz y se recogió el sobrenadante (virus crudo). Para producir un stock de virus, se inoculó en un frasco de 25 cm², tras observar ECP se recogió el sobrenadante, que se clarificó por centrifugación. La detección e identificación del virus se realizó por RT-PCR, real-time PCR y secuenciación (cebadores Tabla 5). Además el virus se tituló empleado el método de dosis infectiva 50% (TCID₅₀). También se comparó la producción de partículas infectivas en E-11 de la cepa rSs160.03 y wSs160.03 siguiendo el procedimiento descrito más adelante (apartado 2.7.)

2.5 OBTENCIÓN DE NUEVOS RECOMBINANTES

Empleando como molde la construcción plasmídica pBS160R2 (construcción originada en la sección 2.3.3) se originaron plásmidos de expresión con substituciones en las posiciones nucleotídicas 766 y 836 del ARN2 viral que dan lugar a cambios en la secuencia aminoacídica de la cápside viral en las posiciones 247 y 270, respectivamente, posiciones señaladas como posibles responsables o moduladores de la virulencia del virus y la especificidad de hospedador. Los plásmidos mutados se originaron empleando el kit comercial *QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies), tal y como se describe en el apartado 2.3.2. de este capítulo, empleando los cebadores MUTaa247 y MUTaa270 que introducen substituciones en las posiciones 766 y 836, respectivamente. (Tabla 7). Se originaron 3 plásmidos recombinantes: el pBS160R2_247, mutado en posición 766, el pBS160R2_270 mutado en posición 836, y el pBS160R2_247+270 con las posiciones 766 y 836 modificadas. Se realizó la transformación de *E. coli* con los plásmidos mutados, seleccionando al menos 5 de los clones obtenidos de cada mutante que se secuenciaron para

confirmar la existencia de las sustituciones. Una vez obtenidos los clones con las mutaciones correspondientes se realizó una producción masiva de plásmido (sección 2.3.3.3). Los plásmidos recombinantes obtenidos junto con el plásmido de expresión pBS160R1, que contiene la secuencia fiel a la cepa salvaje, se transfectaron en las células BSRT7/5. La transfección se realizó añadiendo 1 µg de cada plásmido de expresión (pBS160R1 y pBS160R2_247 o pBS160R2_270 o pBS160R2_247+70) empleando como agente transfectante *Lipofectamina 2000*, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4., de esta manera se obtuvieron las cepas virales recombinantes rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀.

Tabla 7 Cebadores empleados para la mutagénesis que da lugar a los cambios en el ARN2 de los residuos 247 y 270.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Posición RNA2*
Cebadores para mutagénesis dirigida cambios aminoacídicos		
MUTaa247	CCATTCTCTGGGGC <u>G</u> CGACCCAACCTCGACCTCGCTCCTGC	752-791
MUTaa270	GCCCATTGACTACA <u>A</u> TCTTGGAGTGGGCGACGTCGACCGG	822-861

*Posición respecto a la secuencia de la cepa SpSs-IAusc160.03 con número de acceso FJ803923

2.6 INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA

Durante este capítulo empleamos inmunofluorescencia indirecta por un lado para verificar la capacidad de transfección de células BSRT7/5 después del tratamiento con *Lipofectamina 2000*, y también para confirmar la obtención de virus recuperado en E-11 después del proceso de genética inversa. Para la evaluación del proceso de transfección se incluyó un control de células BSRT7/5 transfectadas con un plásmido que incluía la secuencia codificante de una proteína de expresión en membrana celular, y tras 24 h de incubación se realizó una inmunofluorescencia *ex vivo*. Para ello, en condiciones de esterilidad, para no afectar a los demás pocillos, se vació el pocillo control de células BSRT7/5 y se añadió 1 ml de medio DMEM al 10% de suero con el anticuerpo primario, que reconoce específicamente la proteína de membrana (1/2000). Se incubó durante 45 min a 28 °C, y a continuación el medio se vació completamente y se realizaron cuidadosamente 3 lavados con medio de cultivo. Se incubó el pocillo con 2 ml de DMEM con suero y el anticuerpo secundario comercial FITC *yellow mouse (fluorescein isocyanate)* (1/400), un anticuerpo producido en ratón que contiene

fluorescencia. Se incubó en oscuridad a 28 °C durante 45 min. Finalmente se vació el medio, se realizaron nuevamente 3 lavados para eliminar el exceso de anticuerpo, y se observó el pocillo al microscopio en busca de fluorescencia. Teniendo en cuenta que las células transfectadas expresan la proteína de membrana y por tanto aparecen con fluorescencia se estimó la proporción de células transfectadas.

Por otro lado, se inocularon células E-11 en una placa de 24 pocillos con el virus recuperado por genética inversa (rSs160.03). A las 48 h después de la infección se vació el medio y se fijaron las células incubándolas con una mezcla 1:1 de alcohol-acetona durante 20 min a -20 °C. Se vació el fijador y se dejó secar completamente, a continuación se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal diseñado para unirse a la proteína de la cápside de la cepa Ss160.03) (Ambart). Seguidamente se incubó con PBS-Tween al 0,05% durante 1 h a temperatura ambiente (1/500), pasado ese tiempo se lavó tres veces con PBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario (1/400) en PBS-Tween, un anticuerpo comercial anti ratón conjugado con la proteína fluorescente FITC (Sigma). Se incubó durante 1 h en oscuridad. Además se empleó el fluorescente DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) para marcar los núcleos según las instrucciones del fabricante (Sigma). Finalmente se visualizó la placa en el microscopio.

2.7 CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS DIFERENTES VIRUS

Se infectaron células E-11 con los virus wSs160.03, rSs160.03, rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀, rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1. La inoculación se realizó por adsorción durante 1 h, posteriormente se retiró el inóculo y se añadió a cada pocillo medio fresco (L-15 con suero al 2%). Después de 24h, 48h, 72 h, 5 días y 7 días se recogieron alícuotas de los pocillos infectados que se emplearon para realizar titulaciones por el método de TCID₅₀ descrito en apartados anteriores. Cada virus se tituló por duplicado.

2.8 ANÁLISIS DE VIRULENCIA DE LOS RECOMBINANTES *IN VIVO*

2.8.1 Infecciones experimentales

La aclimatación, el mantenimiento y el manejo de los peces se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 1 sección 2.4, *Aclimatación y manejo de los peces*.

Antes del inicio de los experimentos se sacrificaron 10 individuos y se procesaron para realizar el análisis virológico.

La infección experimental se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 1 sección 2.4.1. Los peces se mantuvieron durante un máximo de 35 días a 22 °C y se observaron diariamente para detectar si presentaban algún tipo de signo característico de la enfermedad y retirar las bajas. Los ejemplares supervivientes se sacrificaron al final del experimento empleando una sobredosis de MS-222 cumpliendo con la directiva 2010/63/UE.

En un primer experimento se utilizaron dos grupos de 25 lenguados (peso medio 2 g) que se distribuyeron en dos tanques de 100 L, uno de los grupos se infectó con la cepa salvaje wSs160.03 y el otro con la cepa recombinante rSs160.03, además en un tercer tanque se mantuvieron 10 peces que se emplearon como controles (bañados con medio L-15).

En un segundo experimento se utilizaron 320 lenguados distribuidos en 8 tanques de 100 L (40 peces/tanque). Los peces se infectaron por duplicado con las cepas recombinantes rSs160.03₂₄₇ (Tanques 1 y 2), rSs160.03₂₇₀ (Tanques 3 y 4), rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ (Tanques 5 y 6) y con la cepa wSs160.03 (Tanques 7 y 8), utilizada como control positivo. Se incluyeron también 2 grupos control de 15 peces cada uno.

2.8.2 Procesado de las muestras

Se extrajeron asépticamente cerebro y ojos de los peces muertos y sacrificados, que se procesaron en lotes de 5 individuos. Los tejidos se homogeneizaron y diluyeron 1:10 (p/v) en tampón Earle's suplementado con penicilina (1.000 UI/ml), estreptomycin (1.000 µg/ml), gentamicina (500 µg/ml) y fungizona (20 µg/ml). Los homogenados se clarificaron por centrifugación a 2.000 × g durante 20 min a 4 °C. Una alícuota de 0,1 ml de cada muestra se usó para la extracción del ARN y posterior amplificación por RT-PCR, el resto de los sobrenadantes obtenidos se incubaron entre 16-20 h a 4 °C, y se inocularon en diluciones 1:10 y 1:100 en placas de 48 pocillos con tapices semiconfluentes de E-11 (tapiz cubriendo el 80% de la superficie del pocillo). Después de 10 días, se realizó un subcultivo de las muestras inoculando 0,1 ml de la suspensión celular en una placa nueva. Las placas se observaron diariamente hasta la aparición de efecto citopático y durante un máximo de 7 días. La identidad del virus se confirmó por RT-PCR empleando los cebadores F2R3 (Tabla 5).

2.8.3 Extracción del ARN viral

Para la extracción del ARN total se empleó el kit comercial *E.Z.N.A.® Total RNA Kit I* (Omega Bio-Tek). Se mezclaron 100 µl de muestra y 350 µl de tampón de lisis TRK, suplementado con β-mercaptoetanol (20 µl/ml) en un vial de 1,5 ml y se pipeteó hasta conseguir una solución homogénea. Tras añadir 350 µl de etanol al 70% la mezcla se transfirió a la columna de extracción suministrada por el fabricante y se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 15 segundos. Una vez descartado el filtrado, se añadieron 700 µl de tampón I y se realizó una nueva centrifugación. Se cambió el tubo colector, se añadieron 500 µl de tampón II (suplementado previamente con 4 volúmenes de etanol absoluto) y se repitió de nuevo la centrifugación. Se descartó el filtrado, se añadieron 500 µl de tampón II y se centrifugó 2 minutos a $12.000 \times g$. Nuevamente se cambió el tubo colector, se añadieron 50 µl de H₂O libre de nucleasas, se incubó 30 segundos a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto para eluir el ARN, que se conservó a -20°C hasta su uso.

La concentración del ARN se determinó empleando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Thechnologies) tal y como se describe en el capítulo 1 (Sección 2.6).

2.8.4 Síntesis de ADNc y PCR

Para la síntesis de ADNc a partir del ARN viral se empleó el kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). La amplificación del ADNc se realizó transfiriendo 3 µl de ADNc empleando la polimerasa comercial *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega). Ambos procedimientos se realizaron del modo descrito en el capítulo 1 (Sección 2.7 y 2.8).

2.8.5 Cuantificación del genoma viral mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

Para la realización de la PCR a tiempo real se realizaron mezclas de reacción con volumen final de 20 µl. Las mezclas estaban compuestas por 10 µl de $2 \times iQ^{\text{TM}} \text{SYBR}^{\circledR} \text{Green Supermix}$ (Bio-Rad), 0,5 µl de cada cebador (concentración del stock, 200 nM), y 2 µl de ADNc. Se emplearon los cebadores SnodR1 descritos por Oliveira y col. (2013). Las muestras se analizaron por triplicado en un termociclador *CFX96™ Real-time PCR detection system* (BioRad) en placas de 96 pocillos siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 1 (sección 2.11.1).

2.8.6 Secuenciación

Los productos de PCR obtenidos de los tejidos de los peces infectados se secuenciaron para confirmar la existencia de las mutaciones correspondientes después de la infección en los peces, para ello se purificó la banda de PCR obtenida con los cebadores F2 y R3 (Tabla 5). Se cargaron en un gel 4 μ l de purificado y 4 μ l del marcador de concentración *Low Mass Ladder* (Invitrogen), y se calculó la concentración de cada purificado mediante la comparación de las bandas. Seguidamente se realizó la secuenciación según se ha descrito en el apartado 2.2.3 de este capítulo teniendo en cuenta que para productos de PCR se necesitan de 50-100 fmol de ADN molde.

2.9 CARACTERIZACIÓN DE LA REPLICACIÓN *IN VIVO*

En este ensayo se infectaron 4 grupos de 100 lenguados cada uno (peso medio 2 g) con las cepas wSs160.03, rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀, rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀. Los peces se infectaron por baño a una concentración final de 10^5 TCID₅₀/ml a 22 °C, desechando el inóculo y devolviendo a los peces a sus respectivos tanques. Al mismo tiempo se mantuvo un grupo control de 10 peces realizando el baño con L-15. Después de la infección se retiraron diariamente 10 peces de cada grupo, desde el día 1 al 10, que se sacrificaron con una sobredosis de MS-222, y se analizaron para conocer la evolución de la carga viral en el cerebro durante los primeros días de infección. Los tejidos extraídos se procesaron en dos lotes de 5 peces, se realizó la extracción de ARN total y la síntesis de ADNc como se ha descrito previamente (sección 2.8.3 y capítulo 1 sección 2.7). Mediante PCR cuantitativa se analizó el número de copias de ARN1 por gramo de tejido, que se calculó en base a la media de los dos lotes analizados en cada punto de muestreo.

2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el programa informático *Graph-Pad Prism 5.0* (GraphPad software Inc., USA). Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Se realizaron curvas de mortalidad de los individuos en el tiempo para los peces infectados con cada una de las cuatro cepas utilizando el análisis de Kaplan-Meier. Se empleó además el test de rangos logarítmicos *Mantel cox* para valorar las diferencias de supervivencia entre los distintos grupos. En el post-análisis se incorporó la corrección de Bonferroni para test múltiples ($p < 0,02$).

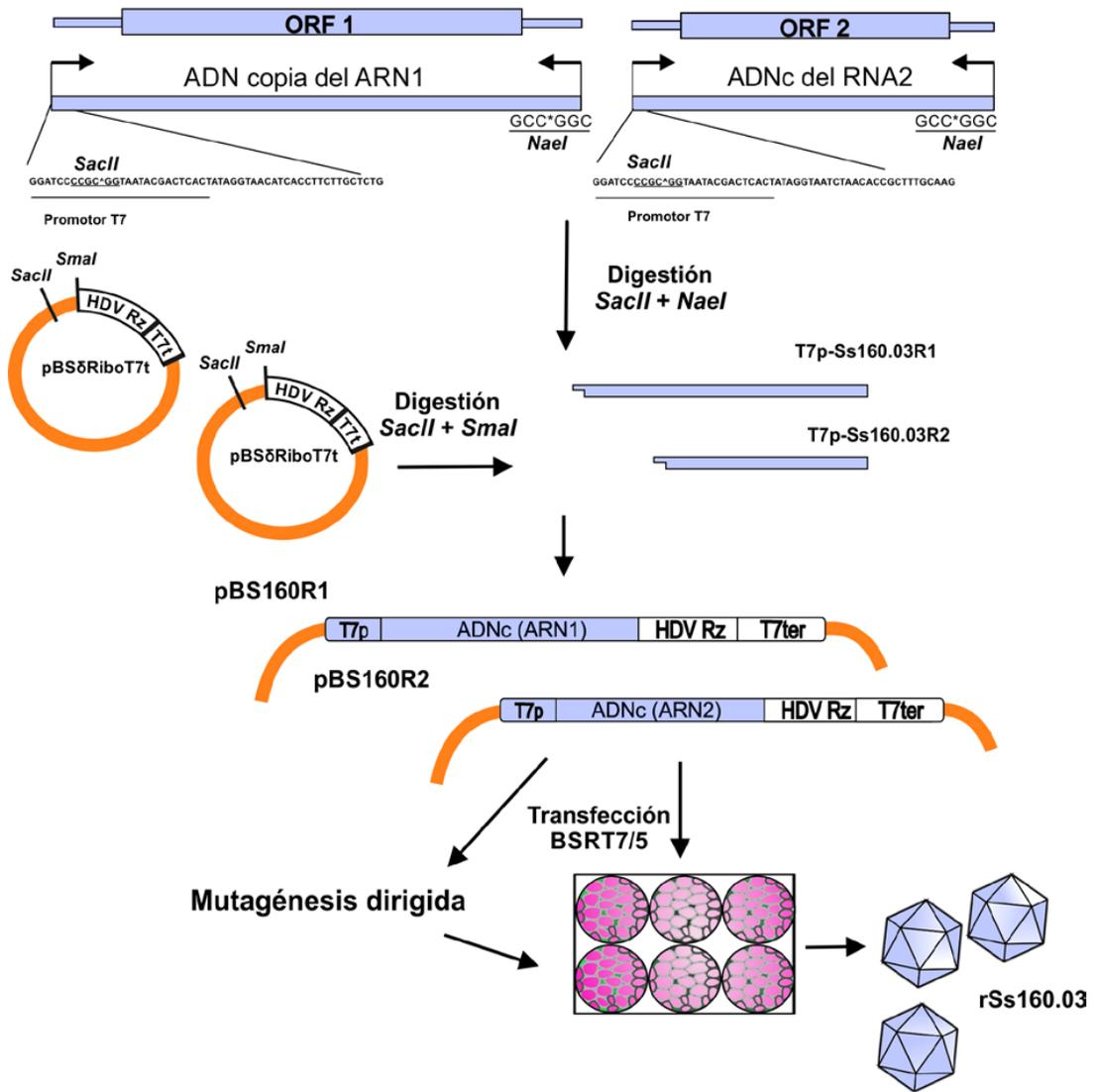


Figura 9 Construcción de plásmidos y sistema de genética inversa. La secuencia completa del ADN copia del ARN1 y ARN2 de la cepa Ss160.03 se amplificó añadiendo el promotor T7 al extremo 5' y un lugar de corte en el extremo 3' (diana para la enzima *NaeI*). Ambos segmentos se insertaron en sendos plásmidos pBSδRiboT7t usando los sitios de restricción de *SacII*, *NaeI* y *SmaI*, de manera que el extremo 3' de ambos segmentos se fusionó a la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) seguida de la secuencia terminadora de T7. Los virus recombinantes se recuperaron de las células BSRT7/5 transfectadas con 1 µg de pBS160R1 y 1 µg pBS160R2 (pBSR2₂₄₇, pBSR2₂₇₀, pBSR2₂₄₇₊₂₇₀) empleando lipofectamina (Ver Material y métodos).

3. RESULTADOS

3.1 CONSTRUCCIÓN DE ADNc

La secuencia de los extremos genómicos de la cepa Ss160.03, obtenidos empleando la técnica de 5' y 3' RACE, completaron las secuencias codificantes descritas en un trabajo anterior (Oliveira y col., 2009) y se depositaron en la base de datos *GenBank* con número de acceso FJ803911 y FJ803923. Al segmento de la polimerasa, ARN1, se añadieron 3 nucleótidos (nt) al extremo 5' y 37 nt en el extremo 3'. En el ARN2, se añadieron 22 nt y 37 nt en los extremos 5' y 3', respectivamente. Se realizó un análisis de la secuencia obtenida comparando cada segmento con la secuencia tipo de su genotipo correspondiente. Así, se comparó el ARN1 con la secuencia completa de una cepa tipo RGNNV, la cepa SGWak97 (Núm. Acc. NC_008040) y el ARN2 se comparó con la cepa SJNag93 de genotipo SJNNV (Núm. Acc. AB056572). No se observaron diferencias nucleotídicas en las secuencias obtenidas del extremo 5' en el ARN1 o ARN2. Por el contrario, en el extremo 3' sí observamos polimorfismo en varias posiciones. En el ARN1 se encontraron diferencias en los nucleótidos 3073, donde aparece una citosina en vez de una timina, y en la posición 3093, donde hay una timina en vez de una citosina. En el ARN2 se observaron 2 diferencias; una de ellas en el nucleótido 1408, en el que hay una timina, en vez de una citosina, y el nucleótido 1411 donde encontramos una adenina en vez de una timina. Destaca la posición 3093, ya que la secuencia de la cepa Ss160.03 contiene una timina que difiere de las cepas SJNag93 y SGWak97, en las que hay una citosina (Figura 10).

Siguiendo el procedimiento descrito en material y métodos se obtuvo el ADNc de cada segmento viral completo. Estos segmentos se clonaron en el plásmido pBSδRiboT7t obteniendo los plásmidos de expresión pBS160R1 y pBS160R2 cuya secuencia es idéntica a la secuencia publicada de la cepa Ss160.03. La Figura 9 representa el proceso de genética inversa seguido.

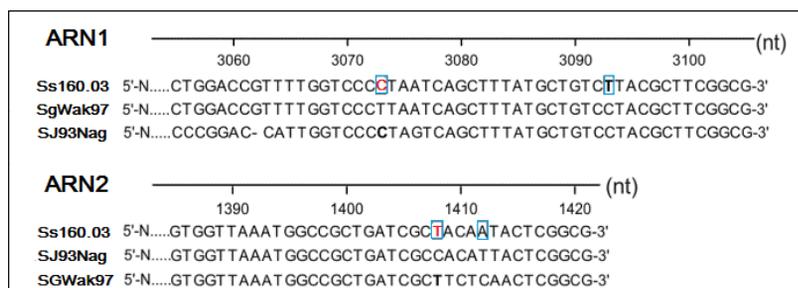


Figura 10 Alineamiento de las secuencias 3' obtenidas por RACE. Las secuencias del ARN1 están alineadas con la cepa SGWak97 (cepa de tipo RGNNV, núm. acc. NC_008040) y la secuencia de la cepa SJNag93 (cepa de tipo SJNNV, núm. de acc. AB056571). El extremo 3' del ARN2 se comparó con la cepa SJNag93 (núm. acc. AB056572) y la cepa SGWak97 (núm. de acc. NC_008041). Los nucleótidos señalados con un recuadro azul difieren de la secuencia de referencia (la SGWak97 para el ARN1 y la secuencia SJNag93 del ARN2). En rojo las posiciones 3073 y 1408 en las que se observa homología con las secuencias de las cepas SJ93Nag y SGWak97, respectivamente.

3.2 RECUPERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES

Los virus recombinantes derivados de la cepa rSs160.03 se recuperaron a partir de las células BSRT7/5 transfectadas con el plásmido pBS160R1 que contiene el segmento 1 de betanodavirus junto con los plásmidos del segmento 2 (pBS160R2 o pBS160R2_247 o pBS160R2_270 o pBS160R2_247+270). El sobrenadante de las células transfectadas se inoculó en las células E-11, y transcurridas 48h se comprobó el éxito del proceso mediante inmunofluorescencia indirecta (Figura 11.A-B). Después de dos pases en E-11 se realizó la confirmación mediante RT-PCR, obteniéndose la banda esperada de 427 pb con los cebadores F2R3, (Figura 11.C). Como control se realizó una reacción omitiendo la RT para verificar que no quedaban restos de ADN plasmídico, además el ARN extraído se trató con ADNasa. Por último, se secuenciaron los virus recuperados confirmando su identidad y la presencia de las mutaciones deseadas en los recombinantes rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀, rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀. (Figura 12).

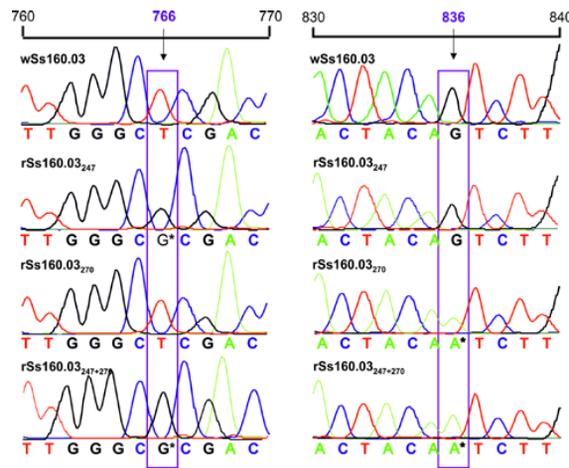


Figura 12 Mutaciones puntuales introducidas en la secuencia codificante del ARN2 en los virus recombinantes rSs160.03. Los electroferogramas muestran la secuencia obtenida en de los tres virus recombinantes rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀, rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀. La posición de los nucleótidos corresponde a la secuencia de Ss160.03 (FJ803923). Las cajas señalan las posiciones en las que se realizó la mutación y los asteriscos el nucleótido mutados.

La mutagénesis realizada implica el cambio de residuos en dos posiciones aminoacídicas (247 y 270) para incorporar los aminoácidos presentes en la cepa SJNag93 (Núm. Acc. AB056572). En este proceso un único cambio nucleotídico conlleva la sustitución de un aminoácido, de tal forma que el cambio en la posición 766 hace que el triplete TCG se modifique a GCG lo que implica un cambio de serina a alanina en la posición 247 de la secuencia proteica de la cápside. Igualmente, el cambio en la posición 836 de la secuencia nucleotídica, provoca que el triplete AGT se transforme a AAT y la sustitución de la serina por una asparagina como residuo 270 de la cápside.

Los títulos virales obtenidos en el pase 2 (P2) en E-11 fueron los siguientes: $1,8 \times 10^8$ TCID₅₀/ml con la cepa rSs160.03₂₄₇, y $3,2 \times 10^7$ TCID₅₀/ml para las cepas rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀. La cepa recombinante rSs160.3 alcanzó el título más alto, $1,8 \times 10^9$ TCID₅₀/ml. Además, se observó que la cinética de crecimiento del virus rSs160.03 era muy similar al de la cepa salvaje después de una infección a una MOI de 0,1 en células E-11 (Figura 13).

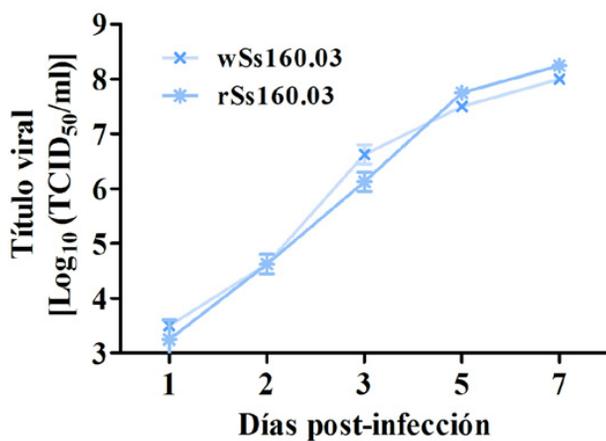
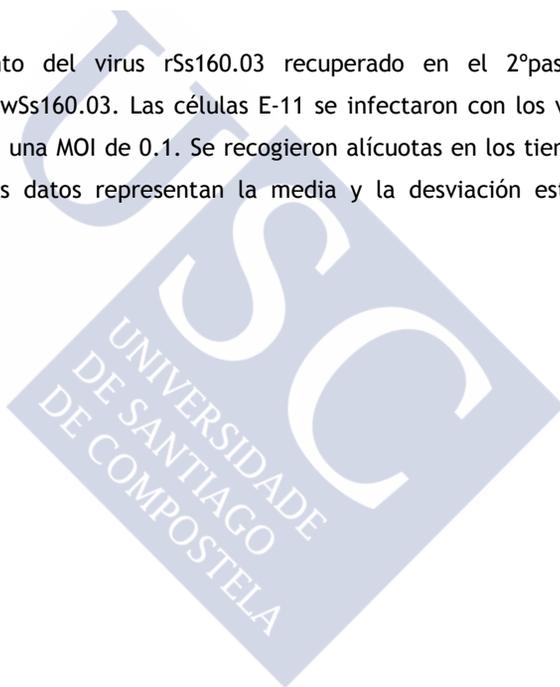


Figura 13 Cinética de crecimiento del virus rSs160.03 recuperado en el 2ºpase de E-11 y comparación con la cepa salvaje wSs160.03. Las células E-11 se infectaron con los virus rSs160.03 (cruz) y wSs160.03 (asterisco) con una MOI de 0.1. Se recogieron alícuotas en los tiempos indicados y se titularon por duplicado. Los datos representan la media y la desviación estándar de dos infecciones.



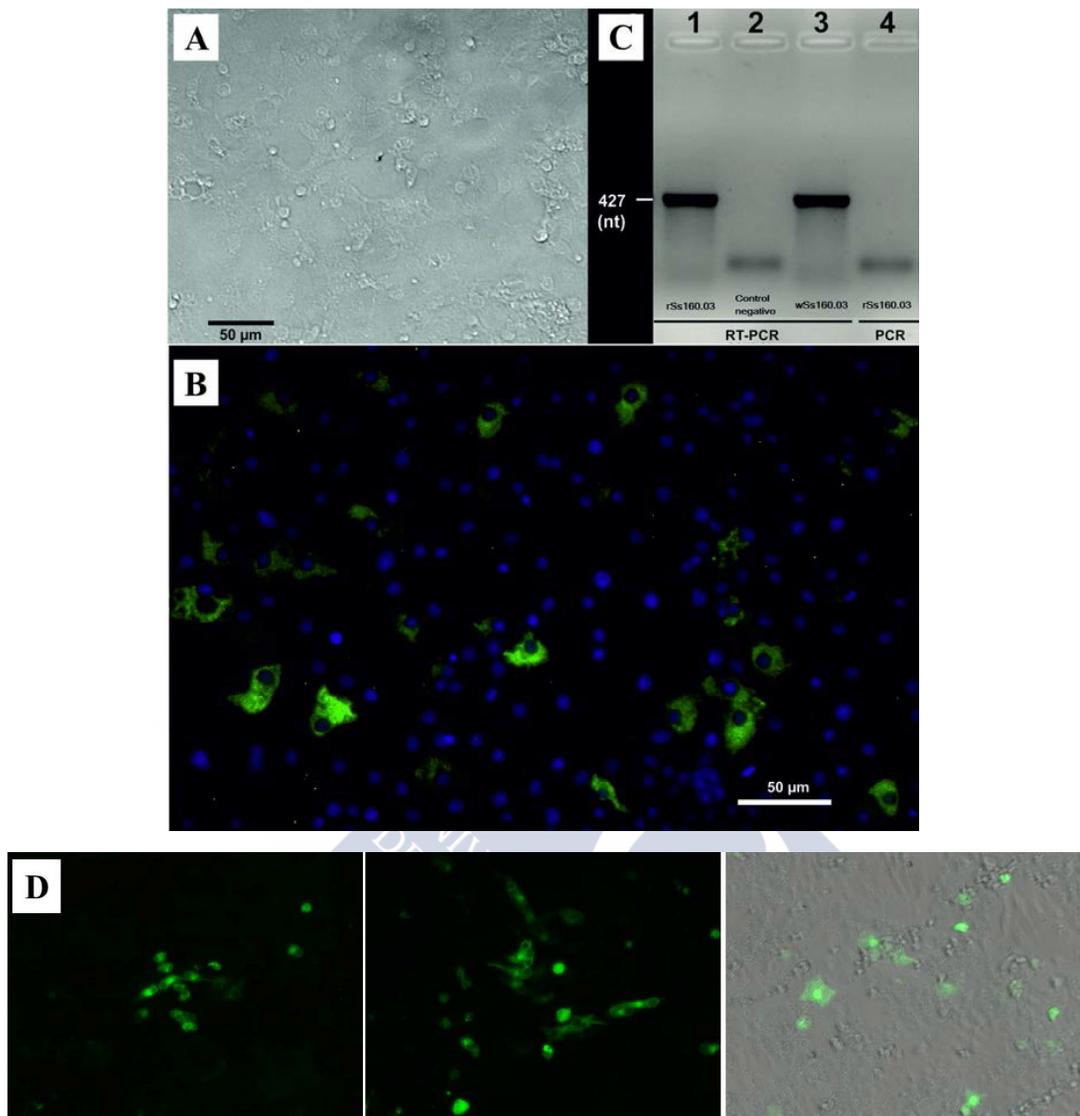
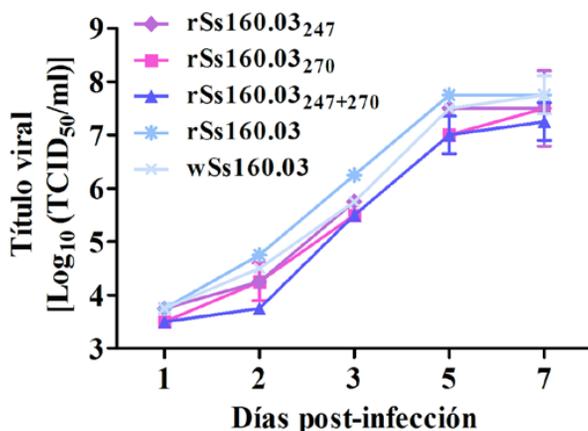


Figura 11 Confirmación de la recuperación de virus rSs160.03. Inmunofluorescencia de los pocillos tratados con anticuerpos monoclonales dirigidos a la cápside de betanodavirus en células E-11. A) Células E-11 a las 48 h de la infección en el primer pase. B) inmunofluorescencia de las células infectadas. Verde: virus marcados con FITC en células infectadas. Azul: núcleos marcados con DAPI. C) Visualización en el gel de agarosa de los productos de RT-PCR y PCR obtenidos de la extracción de ARN en el segundo pase en E-11 infectadas con rSs160.03. Línea 1: RT-PCR del ARN tratado con ADNasa. Línea 2: control negativo con agua DEPC. Línea 3: control positivo de RT-PCR con la cepa wSs160.3. Línea 4: PCR omitiendo la transcripción inversa. D) Control de transfección. Células BSRT7/5 transfectadas con un plásmido que expresa una proteína de membrana. Las células con fluorescencia representan el porcentaje de células transfectadas utilizando la Lipofectamina2000.

3.3 CURVAS DE CRECIMIENTO *IN VITRO* DE LOS VIRUS RECOMBINANTES

La replicación después de 24 horas de infección en E-11 fue similar en todas las cepas (Figura 14). Después de las 48 horas, se observó una diferencia de 1 logaritmo entre el título de la cepa rSS160.03₂₄₇₊₂₇₀ y la cepa rSs160.03. En el tercer día de la infección, la diferencia entre estas dos cepas se redujo. Finalmente y después de 7 días de infección no se encontraron diferencias entre los títulos de las cuatro cepas, alcanzando un valor de 10⁷ TCID₅₀/ml. Tampoco se observaron diferencias en el desarrollo del efecto citopático entre las cepas.

Figura 14 Cinética de replicación de la cepa wSs160.03 (virus salvaje) y los virus recombinantes con o sin mutaciones generados mediante un sistema de genética inversa. Las células E-11 se infectaron con los virus rSs160.03₂₄₇ (rombo), rSs160.03₂₇₀ (cuadrado), rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ (triángulo), rSs160.03 (cruz) y wSs160.03 (asterisco) con una MOI de 0.01. Se recogieron alícuotas en los tiempos indicados y se titularon por duplicado. Los datos representan la media y desviación estándar (DS) de dos infecciones.



3.4 COMPARACIÓN DE LA VIRULENCIA *IN VIVO* ENTRE LA CEPA SALVAJE Y LA CEPA RECOMBINANTE rSs160.03

Los peces empezaron a morir 5 días después de la infección en el grupo de peces infectados con la cepa salvaje wSs160.03 (Figura 15), mientras que en el grupo infectado con la cepa recombinante rSs160.03 el inicio de la mortalidad se retrasó hasta el día 11. Sin

embargo, al final del experimento, a día 30, la tasa de mortalidad en los dos grupos alcanzó el 100%. Se pudo observar un comportamiento anormal y pérdida de apetito en ambos grupos de peces desde los primeros días de la infección hasta el final del experimento. El análisis estadístico mostró que no existían diferencias significativas entre la virulencia de la cepa salvaje y la cepa recombinante ($p > 0,05$).

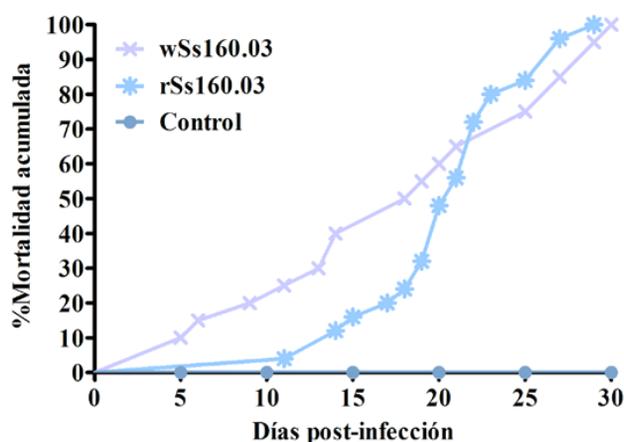


Figura 15 Curva de mortalidad acumulada causada por el virus wSs160.03 y el rSs160.03. Se infectaron juveniles de lenguado en un baño con una concentración viral de 10^5 TCID₅₀/ml con la cepa wSs160.03 (cruz) y la cepa recuperada del sistema de genética inversa e idéntica a la original (rSs160.03, asterisco) a 22 °C.

3.5 COMPARACIÓN DE LA VIRULENCIA ENTRE LA CEPA SALVAJE Y LOS RECOMBINANTES CON MUTACIONES PUNTUALES

La mortalidad se inició en todos los grupos de peces infectados entre los 2 y 4 días después de la infección. Al final del experimento, a los 35 días, la mortalidad acumulada de la cepa salvaje (wSs160.03) alcanzó el 100%, mientras que en los grupos de peces infectados con las cepas recombinantes rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ aproximadamente el 40% de los peces sobrevivió a la infección (Figura 16). En todos los grupos se observaron signos clínicos característicos de la infección por betanodavirus, como son la pérdida de apetito y natación anormal. Estos signos se observaron durante todo el experimento en los grupos infectados con la cepa wSs160.03, mientras que en los grupos infectados con las tres cepas recombinantes sólo se observaron durante los 15-20 primeros días de la infección, fase aguda

de la mortalidad, y los peces supervivientes no mostraron signos externos de patología. Los peces control no mostraron ningún signo de patología y tampoco se registraron bajas entre ellos.

El virus se detectó por RT-PCR y se aisló en cultivo celular a partir de todos los grupos de peces analizados, tanto peces muertos como supervivientes, con la única excepción de los peces utilizados como control negativo. Las secuencias nucleotídicas de los productos de PCR confirmaron la existencia de las mutaciones en el ARN2 de los virus recombinantes recuperados de los peces. El análisis estadístico de las curvas de mortalidad reveló que las curvas de cada cepa recombinante mostraba diferencias significativas respecto a la de la cepa salvaje wSs160.03 ($p < 0.002$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas de virulencia entre las cepas mutantes rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ ($p > 0,05$).

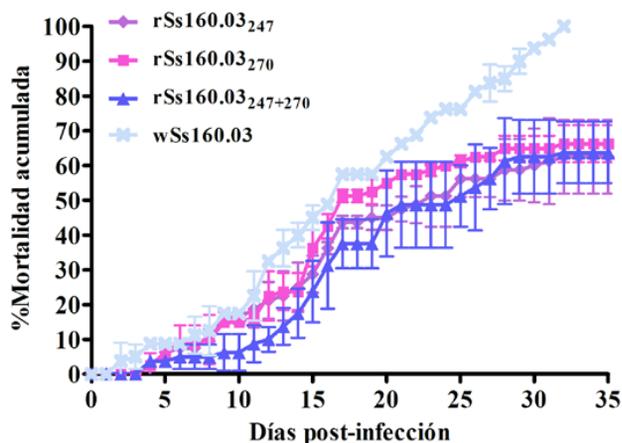


Figura 16 Curva de mortalidad acumulada causada por el virus wSs160.03 y los virus recombinantes con mutaciones puntuales. Se infectaron juveniles de lenguado en un baño con una concentración viral de 10^5 TCID₅₀/ml con las cepas wSs160.03 (cruz) y los virus rSs160.03₂₄₇ (rombo), rSs160.03₂₇₀ (cuadrado), rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ (triángulo) generados a través de un sistema de genética inversa a 22 °C. Los datos representan la media y la desviación estándar de dos réplicas.

3.6 CARGA VIRAL EN EL CEREBRO DURANTE LOS PRIMEROS DÍAS DE INFECCIÓN

Se realizó una tercera infección experimental para conocer la capacidad que tenían las distintas cepas para alcanzar el cerebro y replicar su genoma durante los primeros días de la infección (del día 1 al 10 post-infección). Las cuatro cepas (wSs160.03, rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀) se detectaron en el cerebro por RT-qPCR desde las 24h posteriores a la infección (Figura 17). Durante los primeros 5 días de la infección en todos los grupos se observó una carga viral muy similar. Sin embargo, a partir del sexto día, el número de copias de genoma viral en el cerebro de los peces infectados con la cepa wSs160.03 fue claramente superior al registrado en los peces infectados con las cepas recombinantes con mutaciones. Así, mientras a día 6 post-infección esta diferencia era de 1 logaritmo entre la cepa wSs160.03 y las cepas rSs160.03₂₄₇ y rSs160.03₂₇₀, a día 10 post-infección, la diferencia se incrementó a más de 2 logaritmos con la cepa rSs160.03₂₇₀.

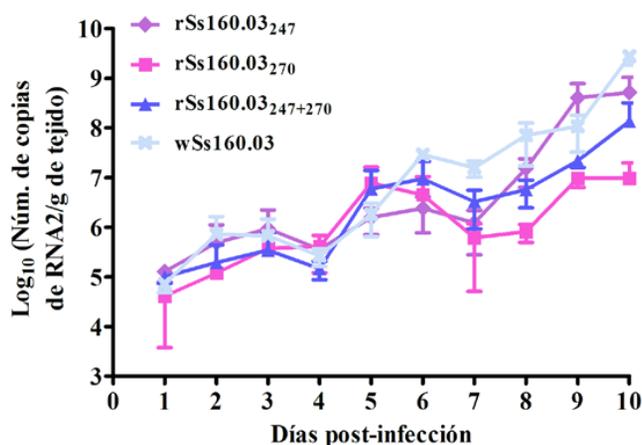


Figura 17 Replicación de la cepa wSs160.03 (cruz) y los recombinantes con mutaciones, rSs160.03₂₄₇ (rombo), rSs160.03₂₇₀ (cuadrado), rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ (triángulo) en cerebro de lenguado en los primeros días de la infección (de 1 a 10 días post-infección). El eje y representa el log₁₀ del número de copias de RNA2/g de tejido y en la x se representan los días post-infección. Los peces se infectaron en un baño a una concentración viral de 10⁵ TCID₅₀/ml a 22 °C, se sacrificaron 10 peces diariamente, los datos representan la media y desviación estándar de dos lotes de 5 peces.

4. DISCUSIÓN

Los factores virales que contribuyen a la virulencia y a la capacidad de producir patología de los betanodavirus todavía no han sido bien caracterizados. Se ha postulado que la especificidad de huésped está controlada por el ARN2 y/o la proteína de la cápside (CP) (Ito y col., 2008; Iwamoto y col., 2004), y en concreto por las posiciones expuestas de la región C-terminal, entre los residuos 238 a 340 (Iwamoto y col., 2004). Además, estudios previos realizados en nuestro laboratorio indican que las posiciones aminoacídicas 247 y 270 de la cápside de cepas recombinantes (RGNNV/SJNNV) podrían estar implicadas en la colonización de nuevas especies (Olveira y col., 2009).

En este estudio, analizamos el papel de los residuos 247 y 270 como posibles determinantes de huésped y virulencia en betanodavirus que han sufrido un intercambio de segmentos genómicos o *reassortment*. Con este propósito, se produjeron cepas recombinantes en células BSRT7/5 por medio de genética inversa como se ha descrito previamente (Takizawa y col., 2008b). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para identificar determinantes de virulencia en virus ARN como el virus Influenza (Horimoto y Kawaoka, 1994; Lycett y col., 2009), virus Lujo (Bergeron y col., 2012), virus del Nilo Occidental (Diamond, 2009), alphanodavirus (Ball y Johnson, 1999) y también virus que afectan a peces como alphavirus, aquabirnavirus y novirhabdovirus (Biacchesi, 2011).

En primer lugar se generó el virus recombinante rSs160.03, que presentó, después de dos pases, una capacidad de replicación en E-11 similar a la de la cepa salvaje (wSs160.03), así como una alta virulencia en lenguado, especie hospedadora natural, aunque se observó un ligero retraso en el inicio de la mortalidad con respecto a la cepa salvaje. A continuación se generaron las tres cepas mutantes rSs160.03₂₄₇ (Ser→Ala), rSs160.03₂₇₀ (Ser→Asn) y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀, con cambios aminoacídicos en la cápside que las asemejan más una cápside SJNNV “tipo”. El análisis de estos cambios sobre la virulencia *in vivo* reveló que las tres cepas eran capaces de causar patología en lenguado con signos característicos de ERV, lo que cuestiona su implicación como determinantes de huésped. Estos signos se observaron entre el 3^{er} día y los 15-20 días p.i., a diferencia de los grupos infectados con la cepa salvaje que mostraron signos clínicos durante todo el experimento (35 días). En los grupos infectados con las cepas mutantes después de que los signos clínicos cesaran se detuvo también la mortalidad

de manera que al final del experimento sobrevivieron en torno al 40% de los peces. Por el contrario, en los grupos infectados con la cepa salvaje las mortalidades alcanzaron el 100%. La menor capacidad para provocar mortalidad de las cepas mutantes podría deberse a una menor capacidad de los virus recombinantes para replicar en el cerebro del pez. De hecho, los datos de replicación en el cerebro durante los 10 primeros días de la infección (Figura 17) indican un incremento continuado del número de copias genómicas de la cepa salvaje, mientras que el crecimiento del número de copias en las otras cepas se frena a partir del sexto día. En base a las curvas de mortalidad obtenidas podríamos suponer que todos los peces bañados con la cepa wSs160.03 se infectaron y siguiendo el mismo razonamiento, en el caso de los peces bañados con las cepas mutantes, donde se alcanzó el 60% de mortalidad, cabría esperar que 4 de cada 10 peces no llegaran a ser infectados o que tuvieran una carga viral muy baja. Sin embargo, no podemos saber cuántos peces se infectaron por transmisión horizontal (por contacto directo con otros individuos infectados o a través del agua), lo que llevaría a la infección de todo el grupo. Además, se pudo detectar el virus en los peces supervivientes, lo que apoyaría la hipótesis de la transmisión horizontal y que indica que el pez no expulsa completamente el virus. Pero aun asumiendo un diferente nivel de infección, esas diferencias entre los virus mutantes y la cepa salvaje podrían explicar las diferencias observadas en el número de copias genómicas entre la cepa original y los mutantes, pero no explicarían las diferencias observadas entre los mutantes.

Se sabe que la región entre los residuos 217 y el extremo C-terminal se sitúa en la superficie externa de la cápside y por lo tanto puede estar implicada en la interacción del virus y la superficie celular (Tang y col., 2002). Se podría especular que los dos aminoácidos objeto de estudio en este capítulo (247 y 270), situados en esta región, podrían modificar la afinidad entre los virus y los receptores celulares, de manera que afectaría a la cinética de dispersión del virus. Se ha publicado, por ejemplo, que un único aminoácido en la posición 226 del receptor de hemaglutinina del virus influenza podría cambiar el sitio de unión a los receptores del ácido siálico (Zhang y col., 2013). Además, se ha visto que la eficiencia en la diseminación del virus es un determinante muy importante en la neurovirulencia de numerosos virus animales, como por ejemplo, en el retrovirus politrópico murino (Robertson y col., 1997), virus de la rabia (Dietzschold y col., 1985) y el virus Sindbis (Lee y col., 2002). Es importante recalcar que no se ha visto un efecto sinérgico de ambas mutaciones ya que cuando ambos aminoácidos están mutados (247 y 270) el virus recombinante correspondiente

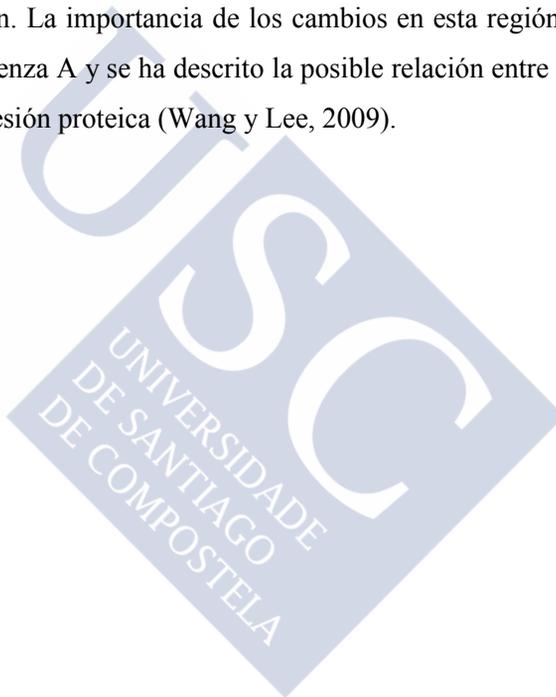
no se atenúa más allá de lo que lo hacen los virus que sólo contienen una posición cambiada. Ambos residuos se localizan probablemente en la región externa de la cápside, una estructura que se cree que está formada por 60 protrusiones (Tang y col., 2002), pero se desconocen su posición relativa y su orientación. Se podría especular que los cambios conformacionales relativos a las mutaciones serían responsables de los resultados obtenidos cuando se modifican estas posiciones. Sin embargo, sería necesario realizar nuevos estudios encaminados a conocer la posición exacta de estos residuos en la estructura de la cápside y su implicación en la interacción con los receptores celulares.

Los resultados obtenidos de los experimentos de replicación *in vitro* indicaron que los cambios realizados sobre las dos posiciones no tienen efecto sobre la replicación del virus en E-11 cuando las comparamos con la cepa salvaje. Las líneas celulares SSN-1 y E-11 son susceptibles a los 4 genotipos de betanodavirus, por lo tanto era de esperar que no se produjeran cambios significativos en la capacidad replicativa, teniendo en cuenta que los aminoácidos incorporados en la cepa Ss160.03 son aminoácidos presentes en el genotipo SJNNV. Estas diferencias respecto a los experimentos *in vivo* podrían deberse a los diferentes receptores de la superficie celular. Se sabe que el ácido siálico está implicado en la unión de los betanodavirus a la superficie de las células SSN-1 (Liu y col., 2005), y también debe estarlo en las células E-11 ya que son un subclón de las células SSN-1 (Iwamoto y col., 2000). Hasta el momento no existen datos referentes a los receptores neuronales que median la entrada de betanodavirus en las células nerviosas del pez, aunque es muy probable que sean diferentes a los que intervienen en la línea celular, porque esta línea deriva de un homogenado del cuerpo entero de alevines del pez cabeza de serpiente, *Channa striata*, (Frerichs y col., 1991). En este sentido, se ha observado que la mayoría de las cepas de virus de la rabia usadas en el laboratorio adquieren la capacidad de utilizar receptores presentes en células no neuronales, los cuales difieren de los receptores neuronales que usan para propagarse por el sistema nervioso (Seganti y col., 1990).

En conclusión, en este capítulo hemos demostrado que dos residuos aminoacídicos localizados en la región carboxilo terminal de la cápside desempeñan un importante papel en la virulencia de los betanodavirus. La cepa recombinante natural, virulenta para lenguado, presenta en las posiciones 247 y 270 una serina, mientras que se generaron virus atenuados al sustituirla por alanina (247) y asparagina (270). Sin embargo, debe de haber otros residuos

implicados en la virulencia, dado que no se consiguieron virus totalmente atenuados. En este sentido, Oliveira y col. (2009) describieron un tercer cambio en la secuencia de la proteína de la cápside compartido por todos los recombinantes naturales, y situado en el extremo aminoterminal (posición 20) que debería ser también considerado, ya que se encuentra en una región asociada con el proceso de ensamblaje y empaquetamiento en virus ARN (Tang y col., 2002).

Por último, hemos observado diferencias en la secuencia no codificante del extremo 3' de ambos segmentos génicos de la cepa recombinante Ss160.03 respecto a las cepas tipo de los genotipos SJNNV y SGWak97. Se sabe que las regiones no codificantes juegan un papel muy importante en la virulencia, presumiblemente interviniendo en los procesos de traducción, replicación y transcripción. La importancia de los cambios en esta región se ha estudiado en cepas del virus de la influenza A y se ha descrito la posible relación entre un único nucleótido y la regulación de la expresión proteica (Wang y Lee, 2009).







PAPER 2



2. Souto, S., Mérour, E., Biacchesi, S., Brémont, M., Oliveira, J.G. & Bandín, I. . **In vitro and in vivo characterization of molecular determinants of virulence in reassortant betanodavirus.** *J. Gen. Virol.* **96**, 1287–1296 (2015).
Doi: [10.1099/vir.0.000064](https://doi.org/10.1099/vir.0.000064)





CAPÍTULO 3:

SUSCEPTIBILIDAD DEL RODABALLO (*Scophthalmus maximus*) A BETANODAVIRUS Y ANÁLISIS DE DETERMINANTES DE ESPECIFICIDAD DE HUÉSPED Y VIRULENCIA.

The role of reassortant in betanodavirus infection in turbot (*Scophthalmus maximus*).



1. INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento en los años 80, los betanodavirus se han descrito en más de 50 especies distintas, fundamentalmente especies de peces marinos aunque también se han detectado en especies de agua dulce e invertebrados marinos (Maltese y Bovo, 2007).

En los capítulos anteriores se ha demostrado la gran susceptibilidad del lenguado a estos virus. Dado que la transmisión de betanodavirus entre especies ha sido descrita con anterioridad (Korsnes y col., 2012; Manin y Ransangan, 2011), el lenguado es una fuente potencial de infección de betanodavirus que podría poner en riesgo otras especies cultivadas en la misma área.

El rodaballo (*Scophthalmus maximus*) se cultiva en distintos países europeos, especialmente en España, Portugal y Francia y más recientemente destaca la gran producción de esta especie en China (FAO, 2014). La producción de rodaballo en España, centrada fundamentalmente en Galicia, representó en el 2013 casi un 90% de la producción mundial según un informe de la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España (APROMAR, 2014). En la actualidad, en Galicia, la industria del lenguado está íntimamente relacionada con el cultivo del rodaballo.

Una de las primeras referencias a una infección por betanodavirus, si bien descrita como encefalomiелitis, fue hecha en rodaballo por Bloch y col. en 1991, como señalan Munday y col. (2002) en su revisión. En el 2004 se produjo un brote de encefalopatía y retinopatía viral en larvas de rodaballo en Noruega, pero el virus no pudo aislarse. El análisis filogenético realizado en base a una secuencia de 823 nucleótidos del ARN2 reveló que no se agrupaba en ninguno de los cuatro genotipos establecidos, por lo que se propuso la formación de un quinto genotipo denominado TNV (*Turbot necrosis virus*) (Johansen y col., 2004). Esta secuencia ha sido incluida en otros estudios filogenéticos con el mismo resultado, aunque la ausencia de una secuencia mayor y del aislamiento del virus ha impedido un estudio más detallado. Recientemente nuestro grupo ha descrito el aislamiento de un betanodavirus perteneciente al genotipo RGNNV a partir de juveniles de rodaballo cultivado en la Península Ibérica (Oliveira y col., 2013). Por último, diferentes infecciones experimentales han establecido la susceptibilidad del rodaballo a betanodavirus pertenecientes a los genotipo SJNNV (Húsgağ y col., 2001) y BFNNV (Sommerset y col., 2003).

OBJETIVO

El objetivo de este capítulo es determinar la susceptibilidad del rodaballo a la cepa Ss160.03, recombinante natural procedente de lenguado senegalés. Además, con la intención de analizar la implicación de los aminoácidos 247 y 270 en la especificidad de huésped y en la virulencia para esta especie., se realizarán infecciones experimentales con las cepas recombinantes derivadas de la cepa Ss160.03 obtenidas en el capítulo anterior mediante genética inversa (rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀). Finalmente, y a efectos comparativos se utilizará también la cepa SJNag93 de tipo SJNNV.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 VIRUS Y CÉLULAS

En este capítulo empleamos las cepas de betanodavirus descritas en la Tabla 8. Se trata de cepas ya mencionadas en capítulos anteriores, la cepa SpSs-IAusc160.03 (denominada Ss160.03 para simplificar) recombinante natural RGNNV/SJNNV, tres cepas recombinantes con mutaciones puntuales obtenidas mediante un sistema de genética inversa (rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀) y una cepa del genotipo SJNNV, la cepa SJNag93. Los distintos aislados se propagaron en la línea celular E-11, tal y como se ha descrito anteriormente. (Capítulo 1, sección 2.2).

Tabla 8 Relación de cepas de betanodavirus empleadas en este capítulo.

Cepa viral	Genotipo	Referencia	Núm Acc. Genbank	
			ARN1	ARN2
Ss160.03*	RGNNV/SJNNV	Olveira y col. (2009)		FJ803923
rSs160.03₂₄₇	RGNNV/SJNNV [#]	Este trabajo	-	-
rSs160.03₂₇₀	RGNNV/SJNNV [#]	Este trabajo	FJ803911	-
rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀	RGNNV/SJNNV [#]	Este trabajo	-	-
SJNag93	SJNNV/SJNNV	Iwamoto y col. (2001b)	AB056571	AB056573

*SpSs-IAusc160.03. [#]Cepa recombinante derivada de Ss160.03 con mutaciones puntuales en la secuencia de la cápside: rSs160.03₂₄₇ [S247A], rSs160.03₂₇₀ [S270N], y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ [S247A/S270N].

2.2 INFECCIONES EXPERIMENTALES

Se obtuvieron juveniles de rodaballo con un peso medio de 2 g de una piscifactoría comercial y se mantuvieron en las instalaciones del acuario de la Universidad de Santiago de Compostela. Los peces se manejaron siguiendo los protocolos descritos previamente en los experimentos realizados con lenguados. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal siguiendo protocolos aprobados por la comisión de ética de la Universidad de Santiago de Compostela y la Xunta de Galicia (permiso núm. 15004/13/002). Antes de realizar los experimentos se analizaron 10 peces para descartar la presencia de virus o bacterias, como se ha descrito en el capítulo 1. Dado que la temperatura del agua en las instalaciones es de 16 °C, para aquellos experimentos realizados a 18°C se emplearon calentadores, y la temperatura del agua se incrementó 0,5 °C/día.

Las infecciones experimentales llevadas a cabo durante este capítulo se realizaron introduciendo los peces en un baño con el virus a una concentración de 10^5 TCID₅₀/ml con fuerte aireación durante 3 h. Después de la exposición al virus los peces se devolvieron a sus respectivos tanques y el inóculo se desechó. Los grupos de peces control se manipularon del mismo modo que los peces infectados pero añadiendo medio L-15 al baño en vez del virus. Una vez realizada la infección se observaron los peces diariamente para detectar la aparición de signos de patología y para retirar las bajas. Los peces supervivientes se sacrificaron al final del experimento con una sobredosis de MS-222 según la directiva europea 2010/63/UE.

Se extrajeron cerebro y ojos de los peces muertos, y de los sacrificados al final del experimento, que se procesaron en lotes de 5 peces para realizar el análisis virológico. Para cada lote, se realizó la cuantificación y aislamiento del virus por RT-qPCR y cultivo celular, respectivamente.

2.2.1 Infección experimental 1. Susceptibilidad del rodaballo al virus recombinante natural Ss160.03 a 18 y 16 °C.

Se infectaron 2 grupos de 30 peces cada uno con la cepa recombinante Ss160.03 y se mantuvieron durante 35 días a dos temperaturas distintas: 18 y 16 °C. Un grupo control (n=10) se mantuvo durante toda la duración del experimento a cada temperatura.

2.2.2 Infección experimental 2. Comparación entre la susceptibilidad a la cepa recombinante Ss160.03 y a una de genotipo SJNNV

Se infectaron 2 grupos de rodaballos con cada cepa, la cepa recombinante Ss160.03 de genotipo RGNNV/SJNNV y la cepa SJNag93, de genotipo SJNNV (n=30/cepa) y se mantuvieron a 18 y 16 °C. Además, se incluyó un grupo control de 10 peces a cada temperatura.

2.2.3 Infección experimental 3. Comparación entre la susceptibilidad a la cepa wSs160.03 y las cepas recombinantes derivadas- I.

En este experimento a la cepa Ss160.03 la denominaremos wSs160.03 de *wild strain*, cepa salvaje, para diferenciarla claramente de las cepas recombinantes derivadas obtenidas mediante genética inversa.

Los rodaballos se infectaron con las cepas wSs160.03, rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ a 18 °C (n=30 peces/cepa) y a 16 °C (n=20 peces/cepa). Además, se mantuvo un grupo control de 10 peces a cada temperatura.

2.2.4 Infección experimental 4. Comparación entre la susceptibilidad a la cepa wSs160.03 y las cepas recombinantes derivadas- II. Ensayo de mortalidad y replicación.

Se infectaron rodaballos con las mismas cepas descritas en la infección anterior. Se realizaron dos ensayos: un ensayo de mortalidad a 18 °C y a 16 °C en el que se infectaron 30 y 20 peces por cepa, respectivamente, y un ensayo de toma de muestras para analizar la replicación a diferentes tiempos post infección. En este último se infectaron 50 peces por cepa y temperatura y se retiraron 10 peces de cada tanque a los 5, 10, 15, 20 y 30 días post infección (d.p.i.) para realizar el análisis virológico. Los peces muestreados se sacrificaron con una sobredosis de MS-222 y se procesaron en 2 lotes de 5 peces por cada día de muestreo. Al igual que en los experimentos anteriores se incluyó un grupo control de 10 peces a cada temperatura.

2.3 ANÁLISIS VIROLÓGICO

Los cerebros de los peces infectados y de los peces control se procesaron en lotes correspondientes a 5 peces en una dilución 1:5 en tampón Earle's suplementado con antibióticos (Capítulo 1. Sección 2.5). Las muestras procesadas se utilizaron por un lado para la extracción del ARN total para realizar la RT-qPCR y por otro lado se inocularon en células E-11 a una concentración final de 1:100 y 1:1000, y se incubaron a 25 °C un máximo de 7 días, hasta observar efecto citopático, y a continuación se procedió a realizar un subcultivo en una nueva placa, utilizando 0,1 ml de cada pocillo. La identidad del virus se confirmó por RT-PCR.

2.4 IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS

La extracción del ARN total se realizó empleando el kit comercial *E.Z.N.A.® Total RNA Kit* (Capítulo 2 sección 2.8.3), y la transcripción inversa se realizó empleando la enzima *SuperScript® III Reverse Transcriptase* (Capítulo 1 sección 2.7). Para la confirmación de las distintas cepas de betanodavirus se realizó la PCR empleando la polimerasa comercial

GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) (capítulo 1. Sección 2.8) empleando los cebadores F7R7 y F2R3 (Névarez y col., 2005; Nishizawa y col., 1994, ver Tabla 5 del capítulo 2). Los productos amplificados se secuenciaron para confirmar la identidad de las cepas empleadas y la existencia de las mutaciones en el caso de las cepas derivadas de la cepa Ss160.03.

2.5 CUANTIFICACIÓN DEL GENOMA VIRAL

El protocolo seguido para la cuantificación viral se ha descrito en los capítulos anteriores. Se empleó la tecnología SYBR Green en un sistema *CFX96™ Real-Time PCR detection System* de Bio-Rad. Se emplearon los cebadores SnodR1 que hibridan en una región homóloga del ARN1 de modo que reconocen cualquier genotipo. El protocolo detallado se describe en el capítulo 1, sección 2.11.1.

2.6 PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA

La secuencia de la proteína de la cápside de la cepa wSs160.03 y de las tres cepas recombinantes se utilizó para realizar una predicción de estructura secundaria utilizando el algoritmo GOR o método de Garnier–Osguthorpe–Robson (Garnier y col., 1996) implementado en el programa informático Genious.

3. RESULTADOS

Con anterioridad a las infecciones experimentales se confirmó la ausencia de VHSV, IPNV, IHNV y betanodavirus en los rodaballos. Tampoco se aisló ningún patógeno de origen bacteriano. No se produjeron bajas en ningún grupo de peces utilizados como control a lo largo del período experimental.

3.1 INFECCIÓN EXPERIMENTAL 1. Susceptibilidad a Ss160.03 a 18 y 16 °C.

En el grupo de peces infectados a 18 °C se observaron bajas entre los 19 y 27 d.p.i. y la mortalidad acumulada alcanzó el 50% (Figura 18), además algunos peces mostraron comportamiento anormal realizando movimientos en espiral. Sin embargo, a 16 °C la mortalidad fue muy inferior (10%): sólo se produjeron 3 bajas, se retiró un pez a los 25 d.p.i., y dos peces el día 28 post-infección. No se observaron signos clínicos.

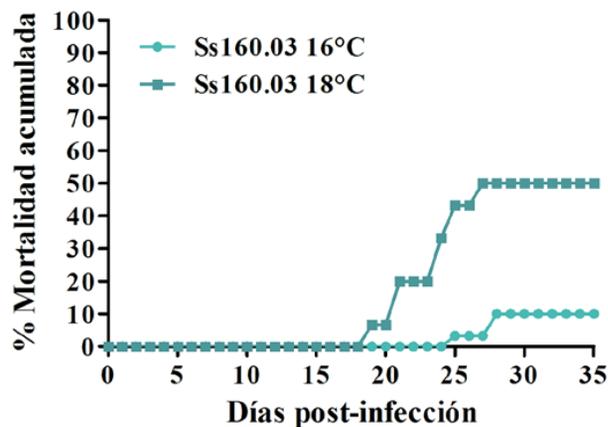


Figura 18 Curvas de mortalidad acumulada causada por el virus Ss160.03 en juveniles de rodaballo infectados en un baño con una concentración viral de 10^5 TCID₅₀/ml a 18 °C (cuadrado) y 16 °C (círculo).

Se obtuvo una carga viral muy similar en todos los lotes analizados, el número de copias de ARN1 por gramo de tejido osciló entre $4,1 \times 10^8$ media de copias/ g de los supervivientes (n=3) a 18 °C y $2,9 \times 10^9$ copias/g (n=1, lote de 3 peces) de los peces que murieron a 16 °C. Además, se recuperó el virus en cultivo celular de todos los lotes de peces infectados (Tabla 9).

Tabla 9 Análisis virológico de las muestras de cerebro de la infección experimental 1. Los lotes de peces muertos y sacrificados al final del experimento se examinaron en cultivo celular (C.C.) y RT-qPCR (expresados como la media del número de copias de ARN1 por gramo de tejido de los lotes analizados).

Temp. del agua.		Análisis virológico	
		C.C. ¹	Media Copias ²
18°C	Bajas	3 /3	$1,6 \times 10^9$
	Supervivientes	3 /3	$4,1 \times 10^8$
16°C	Bajas	1 /1	$2,9 \times 10^9$
	Supervivientes	5 /5	$1,7 \times 10^9$

¹Lotes de peces en los cuales se recuperó el virus en cultivo celular/total de lotes analizados. ²Media núm. de copias de ARN1/g de tejido

3.2 INFECCIÓN EXPERIMENTAL 2. Comparación entre la susceptibilidad del rodaballo a la cepa recombinante y a una de genotipo SJNNV

Las mortalidades en el ensayo realizado a 18 °C alcanzaron el 36,7% en el grupo de peces infectados con la cepa recombinante y 16,7% en el grupo de peces infectados con la cepa del genotipo SJNNV (Figura 19.A). El inicio de la mortalidad en el grupo de peces infectados con la cepa recombinante se produjo a los 15 d.p.i., y se registraron bajas hasta los 22 d.p.i. En el grupo de peces infectados con la cepa de tipo SJNNV se produjeron 6 bajas entre los 13 y 20 d.p.i. Durante la fase de mortalidad se observó natación anormal en algunos peces infectados con la cepa recombinante. A 16 °C, la mortalidad registrada fue muy baja (Figura 19.B), alcanzando el 6,7 y 10% con las cepas Ss160.03 y SJNag93, respectivamente. No se observaron signos clínicos de patología en ninguno de los grupos a esta temperatura.

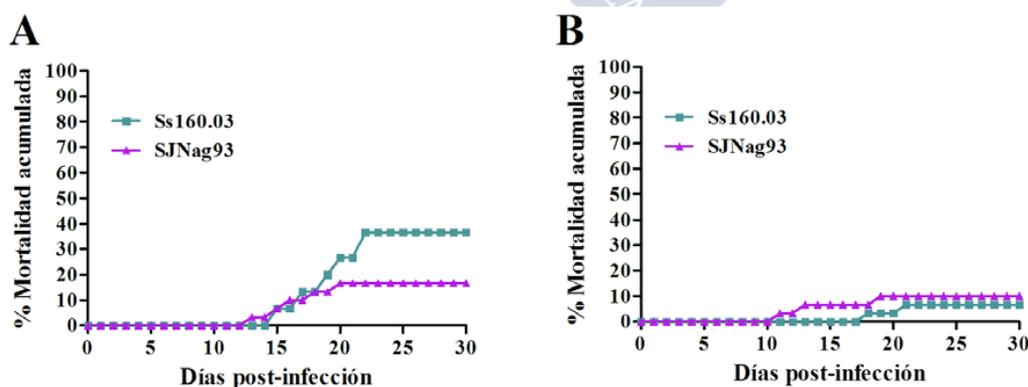


Figura 19 . Curvas de mortalidad acumulada en rodaballos infectados por baño a una concentración viral de 10^5 TCID₅₀/ml con el aislado recombinante RGNNV/SJNNV (cepa Ss160.03, cuadrado) y el aislado SJNNV (cepa SJNag93, triángulo) a 18 °C (A) y 16 °C (B).

A 18 °C la carga viral en los peces muertos infectados con la cepa recombinante (n=2) alcanzó una media de $7,6 \times 10^9$ copias/g, y en los supervivientes (n=3) se observó que la carga viral era del orden de 1 logaritmo menor ($7,3 \times 10^8$ copias/g) (Figura 20). La carga viral detectada en los peces muertos infectados con el aislado SJNNV (cuantificado a partir de un único lote obtenido) fue de $1,1 \times 10^8$ copias/g y, en los supervivientes (n=4) alcanzó una media de $1,0 \times 10^9$ copias/g. A 16 °C, los peces infectados con la cepa recombinante registraron valores de $1,0 \times 10^9$ copias/g en el único lote de 2 peces muertos analizado. En los supervivientes se alcanzaron $4,2 \times 10^8$ copias/g. Al igual que se observó a 18 °C, la carga viral obtenida en los peces muertos con el genotipo SJNNV fue menor que el observado en la cepa recombinante; en el lote de 3 peces muertos se detectaron $1,9 \times 10^7$ copias/g y una media de $2,6 \times 10^8$ copias en los supervivientes (n=4). En todos los grupos de peces infectados, tanto a 18 como a 16 °C, se pudo recuperar el virus en cultivo celular (Figura 20).

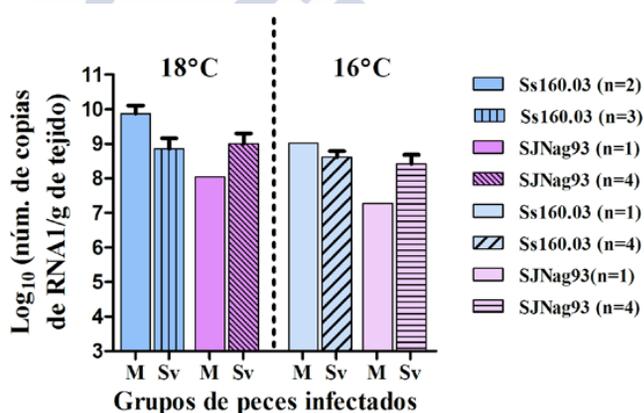


Figura 20 Carga viral detectada en los lotes de peces muertos (M) y supervivientes (Sv) infectados con las cepas de betanodavirus Ss160.03 (RGNNV/SJNNV, azul) o SJNag93 (SJNNV, violeta). Replicación del virus en cerebro y ojos detectada por RT-qPCR (\log_{10} copias de ARN1/g) de peces infectados a 18 °C (izquierda) y 16 °C (derecha). Los datos de copias representan la media+DS de los lotes analizados en cada grupo.

3.3 INFECCIÓN EXPERIMENTAL 3. Comparación entre la susceptibilidad a la cepa wSs160.03 y las cepas recombinantes derivadas I.

A 18 °C la cepa salvaje, wSs160.03, alcanzó las mayores mortalidades (50%) mientras que en el grupo de peces infectados con la cepa recombinante rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀, portadora de dos sustituciones, se observó la mortalidad más baja (20%) (Figura 21). Las cepas con una única

sustitución, rSs160.03₂₄₇ y rSs160.03₂₇₀, produjeron mortalidades similares, alcanzando el 40% y 36,7%, respectivamente. Las bajas se registraron entre los 20 y 27 d.p.i. y algunos peces presentaron natación anormal durante la fase de mortalidad en los grupos infectados con las cepas wSs160.03 y rSs160.03₂₇₀, mientras que no se observaron signos clínicos en los demás grupos. A 16 °C no se produjeron mortalidades en ninguno de los grupos infectados y tampoco se observaron signos clínicos de patología.

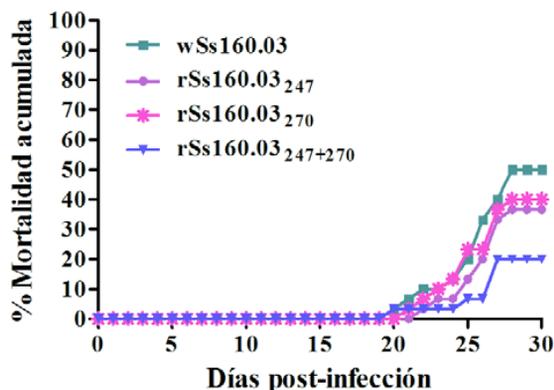


Figura 21 Mortalidad acumulada en rodaballos infectados por baño a una concentración viral de 10^5 TCID₅₀/ml con el aislado salvaje (wSs160.03, cuadrado) y las tres cepas recombinantes (rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀: círculo, asterisco y triángulo, respectivamente) a 18 °C.

La carga viral media de los peces muertos a 18 °C infectados con la cepa salvaje wSs160.03 (n=3) fue de $2,2 \times 10^8$ copias de ARN1/g, 1 logaritmo más alta que la media de copias obtenida en las cepas recombinantes, que registraron $1,9 \times 10^7$ (rSs160.03₂₄₇), $1,8 \times 10^7$ (rSs160.03₂₄₇) y $2,1 \times 10^7$ copias de ARN1/g (rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀) (Figura 22). Se recuperó el virus en cultivo celular en los 3 lotes de peces muertos correspondientes a la cepa wSs160.03 y de 1 lote de peces supervivientes ($4,8 \times 10^7$ copias/g) de los 3 lotes analizados (media $2,7 \times 10^7$ copias/g). En cuanto a las cepas recombinantes, el virus se re-aisló de los 2 lotes de peces muertos infectados con la cepa rSs160.03₂₄₇, de uno de los 2 lotes de peces muertos correspondientes a la cepa rSs160.03₂₇₀ ($2,9 \times 10^7$ copias/g), y del único lote de peces muertos de la cepa rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀. No se recuperó el virus en ninguno de los lotes supervivientes de estas tres cepas, que registraron una carga viral media menor que la de la cepa salvaje ($2,2 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$, $9,3 \times 10^6$ copias/g en los grupos infectados con las cepas rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀, respectivamente).

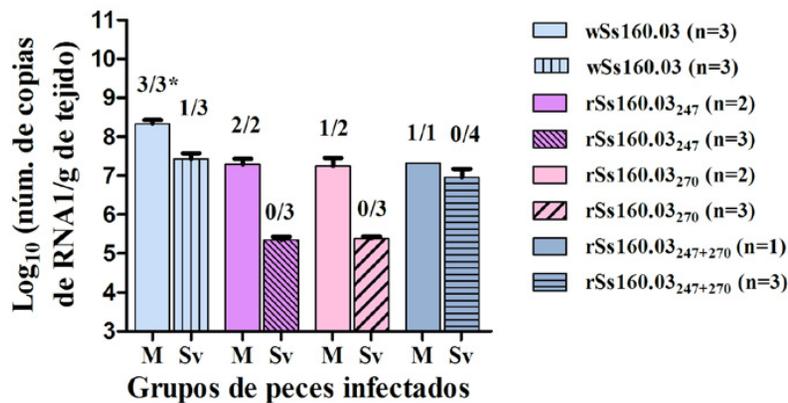


Figura 22 Carga viral detectada en los lotes de peces muertos (M) y supervivientes (Sv) infectados a 18 °C con las cepas de betanodavirus wSs160.03 (virus *salvaje*) y los virus recombinantes generados mediante un sistema de genética inversa. Datos expresados como el log₁₀ de núm. copias de ARN1/g de tejido. Los datos representan la media y desviación estándar (DS) de los lotes analizados (n). *lotes en los que se re-aisló el virus en cultivo celular/lotes analizados.

Los resultados obtenidos de los peces supervivientes a 16 °C mostraron que la cepa recombinante natural (wSs160.03) se detectó en todos los lotes analizados ($1,1 \times 10^7$ media de copias/g, n=4), mientras que sólo se re-aisló el virus en 2 de los 4 lotes que registraron $1,6 \times 10^7$ copias/g (Tabla 10). Las tres cepas recombinantes se detectaron en el 75% de los lotes. La cepa rSs160.03₂₄₇ alcanzó una carga viral media de $2,0 \times 10^6$ copias/g, sin aislamiento de partículas infectivas. Se re-aisló el virus en 2 lotes de los 3 positivos por RT-qPCR de la cepa rSs160.03₂₇₀ con $2,6$ y $1,5 \times 10^7$ copias/g y en 1 de los 3 lotes de la cepa rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀, que registró $6,8 \times 10^6$ copias/g.

Tabla 10 Examen virológico por cultivo celular (C.C.) y RT-qPCR de las muestras de cerebro de los peces supervivientes (Sv1-Sv4) en la infección experimental 3 a 16 °C.

Análisis virológico de supervivientes: aislamiento en cultivo/ carga viral (copias /g)						
Temp.	Cepa Viral	Sv1	Sv2	Sv3	Sv4	Media
16°C	wSs160.03	+/ $1,6 \times 10^7$	+/ $1,6 \times 10^7$	-/ $7,1 \times 10^6$	-/ $6,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$
	rSs160.03 ₂₄₇	-/ $2,1 \times 10^5$	-/ $5,5 \times 10^6$	NA	-/ $3,2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$
	rSs160.03 ₂₇₀	+/ $2,6 \times 10^7$	NA	+/ $1,5 \times 10^7$	-/ $3,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$
	rSs160.03 ₂₄₇₊₂₇₀	NA	+/ $6,7 \times 10^6$	-/ $4,5 \times 10^7$	-/ $3,9 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$

+: betanodavirus aislado en cultivo celular, -: no aislado, NA: no aplica, Neg: virus no detectado en RT-qPCR y cultivo

3.4 INFECCIÓN EXPERIMENTAL 4. Comparación entre la susceptibilidad a la cepa wSs160.03 y las cepas recombinantes derivadas- II. Ensayo de mortalidad y replicación.

3.4.1 Ensayo de mortalidad

Durante los 30 días de ensayo no se registraron mortalidades en ninguno de los grupos de peces infectados, tampoco en los peces control a 18 o 16 °C. A 18 °C, algunos peces infectados con la cepa wSs160.03 mostraron natación anormal, con movimientos en espiral. A 16 °C, no se observaron signos clínicos.

Después de los 30 d.p.i. los peces que se mantuvieron a 18 °C se sometieron a estrés mecánico que consistió en la realización de movimientos del agua empleando una red durante unos minutos con la intención de evaluar la replicación del virus bajo condiciones de estrés moderado. La inducción de estrés dio lugar a altos niveles de mortalidad (Figura 23), los peces empezaron a morir después de 2 días en el grupo infectado con la cepa wSs160.03 y se alcanzó el 100% de mortalidad a los 19 días.

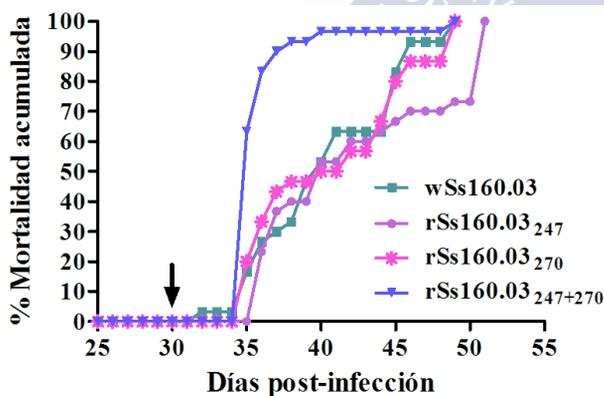


Figura 23 Mortalidad acumulada después de la inducción de estrés en rodaballos infectados por baño a una concentración viral de 10^5 TCID₅₀/ml con el aislado salvaje (wSs160.03, cuadrado) y las tres cepas recombinantes (rSs160.03₂₄₇, círculo, asterisco y triángulo, respectivamente) a 18 °C.

Sin embargo, el primer lote de peces que murieron entre los 2 y 5 días después de la inducción del estrés, mostró una carga viral baja ($6,7 \times 10^3$ copias/g), y tampoco se recuperó virus infectivo (Tabla 11). Los peces analizados en los siguientes lotes alcanzaron una media de copias de $2,3 \times 10^7$ copias/g, y además, se recuperó virus infectivo en cultivo celular.

Los grupos infectados con las cepas recombinantes rSs160.03₂₄₇ y rSs160.03₂₇₀ se comportaron de manera muy similar. Así, se aisló el virus en los dos primeros lotes de peces muertos, que se corresponden con los peces muertos entre los 6-7 días después del estrés en los grupos infectados con la cepa rSs160.03₂₄₇, y los 5-6 días con la cepa rSs160.03₂₇₀, registrando una carga viral de $1,1 \times 10^7$ y $1,9 \times 10^7$ copias/g, respectivamente. En el resto de lotes aunque el virus se detectó por RT-qPCR ($2,2 \times 10^5$ y $9,8 \times 10^4$ media de copias/g) no se recuperó en cultivo celular. Finalmente, todos los lotes de peces muertos infectados con la cepa rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ fueron considerados positivos por RT-qPCR, pero registraron una carga viral muy baja ($1,3 \times 10^5$ media de copias/g) y el virus no se recuperó en cultivo celular. La curva de mortalidad en este grupo fue muy distinta a la observada en las otras cepas, ya que se registró una mortalidad muy elevada en un único día (19 bajas).

Tabla 11 Resultados del análisis virológico del experimento de mortalidad después de la inducción de estrés. El cerebro de los peces muertos se analizó en lotes de 5 peces (P1 a P6) por cultivo celular y RT-qPCR expresado como media de copias de ARN1 por gramo de tejido.

		Análisis virológico							
Agua		Cultivo celular/ RT-qPCR						Re-aislados	No re-aislados
Temp.	Cepa viral	P1	P2	P3	P4	P5	P6	ARN1 copias /g	ARN1 copias /g
								Media	Media
18 °C	wSs160.03	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	$2,3 \times 10^7$	$6,7 \times 10^3$
	rSs160.03 ₂₄₇	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	$1,1 \times 10^7$	$2,2 \times 10^5$
	rSs160.03 ₂₇₀	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	$1,9 \times 10^7$	$9,8 \times 10^4$
	rSs160.03 ₂₄₇₊₂₇₀	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	NA	$1,3 \times 10^5$

Resultados de cultivo celular/RT-qPCR: (+) positivos y (-) negativos. NA: no aplica.

3.4.2 Ensayo de replicación

Los resultados del análisis de replicación en los distintos puntos de muestreo a 18 °C revelaron que la mayor capacidad de replicación en cerebro se registró en los peces infectados con la cepa wSs160.03 (Figura 24). El genoma viral se detectó en estos peces desde el día 5 p.i., aunque sólo en uno de los dos lotes analizados ($2,5 \times 10^5$ copias/g), y fue aumentando sustancialmente hasta los 15 d.p.i., alcanzando $1,4 \times 10^9$ copias/g (media de 2 lotes), decreció a los 20 días hasta un valor medio de $6,1 \times 10^6$ copias/g, y finalmente se registró una carga viral media de $1,2 \times 10^7$ copias/g a los 30 d.p.i. Se recuperaron partículas infectivas del virus

desde los 10 d.p.i. hasta los 30 d.p.i. La cepa recombinante rSs160.03₂₇₀ se detectó por primera vez a los 10 d.p.i. con una carga viral media de $1,8 \times 10^6$ copias/g, se mantuvo con una carga viral similar a los 15 y 20 días (carga viral media $4,4$ y $1,5 \times 10^6$ copias/g), y a los 30 d.p.i. se incrementó en casi 1 logaritmo ($1,2 \times 10^7$ copias/g). El virus se recuperó en cultivo a los 15 y 30 d.p.i. La cepa rSs160.03₂₄₇ no se detectó en el cerebro de rodaballo hasta el día 15 p.i., mostrando una gran diferencia entre los lotes analizados; un lote alcanzó $7,0 \times 10^7$ copias/g y se re-aisló en cultivo celular, mientras el otro lote, del que no se recuperaron partículas infectivas, registró $2,2 \times 10^4$ copias/g. A los 20 d.p.i. alcanzó $2,1 \times 10^6$ copias/g y no se aisló en cultivo celular. Al final del experimento se observó un aumento de 1 logaritmo hasta $1,7 \times 10^7$ copias/g a día 30 p.i. y además se recuperaron partículas infectivas de ambos lotes. La cepa rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ se detectó únicamente a los 20 y 30 d.p.i., con una carga viral media muy similar de $1,5$ y $7,2 \times 10^6$ copias/g, respectivamente. No se re-aisló el virus en ninguno de los lotes analizados de peces infectados con esta cepa.

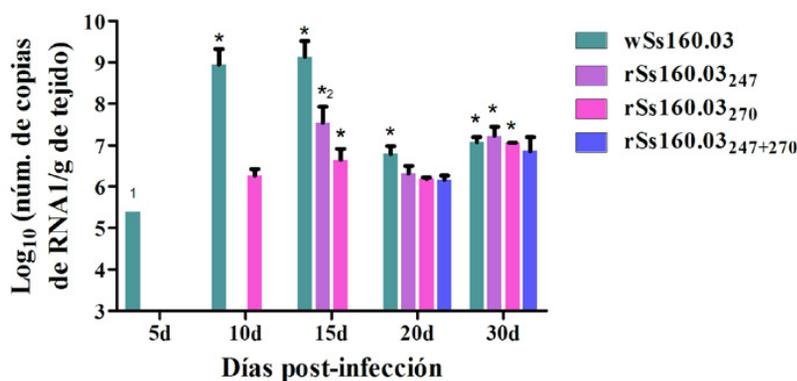


Figura 24 Replicación viral en cerebro de rodaballos infectados por baño con las cepas wSs160.03, rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ a 18 °C y una concentración viral de 10^5 TCID₅₀/ml. Se analizaron 2 lotes de 5 peces sacrificados a los 5, 10, 15, 20 y 30 días post-infección por RT-qPCR, los resultados se expresaron (eje y) como la media del log₁₀ copias de RNA1/g, n=2, y desviación estándar, DS. *lotes recuperados en cultivo celular. ¹Virus detectado por RT-qPCR en 1 de los 2 lotes. ²Virus recuperado en cultivo de 1 de los 2 lotes.

A 16 °C, la replicación viral se redujo claramente y sólo se detectó el virus en peces infectados con las cepas wSs160.03 y wSs160.03₂₄₇ (Tabla 12). La cepa salvaje se detectó a los 10 y 15 d.p.i. aunque sólo se recuperó en cultivo celular a partir de uno de los lotes

analizados a los 10 d.p.i. ($1,5 \times 10^5$ copias/g), por otro lado se recuperó la cepa rSs160.03₂₄₇ también de un único lote a los 15 d.p.i. ($1,6 \times 10^5$ copias/g).

Tabla 12 Resultados del análisis virológico del experimento de muestreo de rodaballos infectados por baño con las cepas wSs160.03, rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ a 16 °C analizados a los 5, 10, 15, 20 y 30 días post-infección. El análisis se realizó por medio de RT-qPCR para cuantificar el número de copias de ARN1 por gramo de tejido (expresado como la media de copias/g, n=2).

Análisis virológico: Aislamiento en cultivo/ Carga viral (copias/g)										
Temp. Agua	Cepa viral	10 d.p.i.		15 d.p.i.		20 d.p.i.		30 d.p.i.		Media copias
		P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	
16 °C	wSs160.03	Neg.	+/ $1,5 \times 10^5$	Neg.	-/ $1,9 \times 10^5$	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	$1,7 \times 10^5$
	rSs160.03 ₂₄₇	Neg.	Neg.	+/ $1,6 \times 10^5$	-/ $7,9 \times 10^4$	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	$1,2 \times 10^5$
	rSs160.03 ₂₇₀	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NA
	rSs160.03 ₂₄₇₊₂₇₀	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NA

Resultados en cultivo celular: (+) positivo y (-) negativo. Neg: virus no detectado por RT-qPCR/cultivo celular. NA: no aplica.

3.5 Predicción de la estructura secundaria.

La simulación de la estructura de la proteína de la cápside de la cepa wSs160.03 y de las cepas recombinantes rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ indicó que la sustitución en el aminoácido 247 de serina a alanina origina un acortamiento de una hélice entre dos cadenas beta de la cápside de las cepas rSs160.03₂₄₇ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ respecto a la cepa salvaje, mientras que la sustitución en la posición 270, de una serina por una asparagina, da lugar a un giro beta formado por dos residuos en las cepas rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ con respecto a la cepa salvaje (Figura 25).

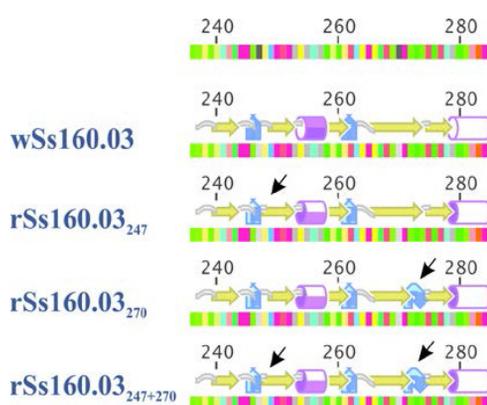


Figura 25 Predicción de la estructura secundaria de la proteína de la cápside de la cepa wSs160.03 y las recombinantes rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ y rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀, empleando el algoritmo GOR implementado en Genious. Las flechas indican los cambios en las estructuras correspondientes a los aminoácidos sustituidos.

4. DISCUSIÓN

En este capítulo se ha analizado la susceptibilidad de juveniles de rodaballo a una cepa recombinante de betanodavirus (RGNNV/SJNNV) y a una cepa de genotipo SJNNV a dos temperaturas: 16 °C, temperatura de cría del rodaballo en Galicia, y 18 °C, temperatura relativamente frecuente del agua de nuestras costas en verano, y que como se ha visto en capítulos anteriores es una temperatura de crecimiento de betanodavirus. Se han producido niveles moderados de mortalidad, que a 18 °C alcanzaron un máximo del 50%, causados por la cepa recombinante, mientras que se produjeron niveles bajos de mortalidad (17%) en el grupo de peces infectados con la cepa del genotipo SJNNV. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Húsgağ y col., (2001), en los que no se observaron mortalidades de rodaballos después de la infección por baño; sin embargo, se podría explicar por las diferencias en tamaño de los peces, ya que realizaron la infección con peces de 4,3 g de peso medio frente a los 2 g que presentaban los peces utilizados en este estudio. También la diferencia de tiempo de exposición al virus puede haber influido en los resultados, Húsgağ y col. realizaron una infección de 1h, mientras que en nuestro trabajo los peces estuvieron expuestos al virus durante 3h. A 16 °C, se registraron bajas mortalidades en ambos grupos, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Nishizawa y col. (2012) y Tanaka y col. (1998) que observaron una disminución de la mortalidad al reducir la temperatura de infección de diferentes especies de mero. El análisis de la replicación viral indicó que el número de copias virales alcanzó siempre mayores niveles en los peces muertos infectados con la cepa recombinante (casi 2 logaritmos tanto a 18 °C como a 16 °C). Sin embargo, se observaron valores de replicación similares entre los peces supervivientes de ambas cepas a las dos temperaturas de ensayo.

Es importante resaltar que la cepa recombinante, que posee una cápside de tipo SJNNV con ligeras modificaciones (3 sustituciones aminoacídicas respecto a la cepa SJNag93) produce un incremento de la mortalidad del 30% respecto a la cepa SJNag93 a 18 °C. Los estudios de virulencia en betanodavirus son muy limitados. Se ha propuesto que el ARN2 y la proteína de la cápside están relacionados con la especificidad de huésped (Ito y col., 2008; Iwamoto y col., 2004). En el capítulo anterior demostramos que dos residuos de la cápside localizados en la región C-terminal (247 y 270) de la cepa recombinante juegan un papel importante en la virulencia de betanodavirus en lenguado. En este capítulo, la presencia de

mutación en cada aminoácido (S247A o S270N) tuvo un ligero efecto en la mortalidad de los juveniles de rodaballo, con una reducción de la mortalidad del 10% en ambos casos. Sin embargo, la mutación en ambas posiciones redujo la mortalidad a más de la mitad con respecto a la que se observó en los peces infectados con la cepa salvaje. Estos resultados se corresponden con lo observado en el ensayo de replicación, en el que el genoma del virus recombinante que contiene ambas mutaciones, no se detectó en el cerebro hasta los 20 d.p.i., mientras que la cepa salvaje se detectó desde los 5 d.p.i. Además, la cepa salvaje mostró un incremento sustancial del número de copias de ARN1 desde los 5 al 15 d.p.i., hasta alcanzar $1,4 \times 10^9$ copias/g, aunque después sufrió un ligero descenso, mientras la carga viral de la cepa mutante fue del orden de 10^6 copias/g. En el curso del experimento de replicación realizado a 16 °C, aunque las dificultades para replicar de todas las cepas fueron evidentes, la cepa salvaje se detectó a los 10 y 15 d.p.i. Por el contrario, la cepa con las dos mutaciones no se detectó en ningún punto de muestreo. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el anterior capítulo con lenguado, la especie de la cual se aisló la cepa recombinante. En esta especie la cepa salvaje causó mortalidades del 100%, y la sustitución de los aminoácidos 247 o 270 resultaron en una reducción de la mortalidad del 40%, pero la mutación de ambos aminoácidos no condujo a una mayor atenuación del virus recombinante. La simulación de la estructura secundaria de la cápside indicó que la sustitución en la posición 247 de una serina a una alanina provoca un acortamiento en una estructura en hélice entre dos cadenas beta, mientras que la sustitución en la posición 270 de una serina a una asparagina conduce a la formación de un giro beta, estos cambios en la estructura secundaria se asocian a cambios en la súper-estructura secundaria. Ambos residuos se localizan en una región expuesta de la cápside según Tang y col. (2002), que está formada por 60 protrusiones involucradas en el reconocimiento del huésped. En un estudio previo hemos postulado que estas posiciones aminoacídicas, al igual que otras que han sido cambiadas, podrían proporcionar una mejor interacción con las células de lenguado (Oliveira y col., 2009), y que por lo tanto la sustitución de cualquiera de los aminoácidos tendría un considerable efecto en la virulencia, tal y como se ha demostrado en el capítulo anterior. Sin embargo, esta interacción parece ser mucho menos eficiente en rodaballo, lo que sugiere que los receptores son diferentes y es un factor que puede haber contribuido en gran medida a que la mortalidad causada por la cepa salvaje fue moderada (hasta un 50% de mortalidad). En este contexto, la modificación de una posición aminoacídica parece no tener un efecto significativo en la virulencia y es necesario que ambas

posiciones estén modificadas para causar tal efecto. Se ha postulado que en otros virus neurotrópicos como el Sindbis virus los cambios en la glicoproteína pueden afectar a su habilidad para invadir el sistema nervioso (Lustig y col., 1988), algo semejante parece suceder con la modificación de las dos posiciones aminoacídicas en la cápside del recombinante natural, ya que la cepa que presenta esas dos mutaciones tiene dificultades para replicar en el cerebro del rodaballo. La explicación que podría darse es que la mutación ha alterado la afinidad por los receptores celulares y por lo tanto ha afectado a la cinética de replicación viral, que podría haber llevado incluso a un cambio de tropismo. Serían necesarios análisis de detección del virus mutante en otros tejidos/órganos del rodaballo para confirmar esta hipótesis.

En cuanto al análisis de los factores externos que afectan al desarrollo de la enfermedad, en base a las diferencias de mortalidad y replicación viral observadas a 18 y 16°C, se puede concluir que la temperatura es un factor limitante para la infección de este virus en rodaballo. Además, es interesante analizar el efecto del estrés en la replicación de la cepa salvaje y los diferentes recombinantes. Se ha sugerido que en condiciones de estrés se ve favorecida la capacidad de replicación de betanodavirus en regiones no nerviosas como las gónadas (Arimoto y col., 1992), pero hasta el momento no se había documentado si este factor podía afectar a la replicación en cerebro. En primer lugar, es importante recalcar que aunque se observó una mortalidad del 100% en los cuatro grupos de peces infectados, en el grupo infectado con la cepa recombinante rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ se registró una mortalidad muy alta en un único día y el virus no se recuperó en cultivo celular, lo que indica que las mortalidades observadas no pueden ser atribuidas al efecto del virus. En relación a las otras cepas, la replicación de la cepa salvaje se vio claramente favorecida por el estrés, ya que las primeras mortalidades se produjeron en los peces infectados con esta cepa y, aunque no se recuperó en el primer lote de peces muertos, sí se pudo re-aislar del resto de los lotes. La replicación de las cepas recombinantes rSs160.03₂₄₇ y rSs160.03₂₇₀ pareció incrementarse, pero sólo hasta cierto punto, ya que la recuperación del virus se produjo únicamente en los primeros lotes. En este ensayo se ha demostrado que el estrés incrementa la replicación de los betanodavirus en los tejidos nerviosos, de todas formas será necesario realizar experimentos con diferentes tipos de estrés, en los que se evalúe el nivel de estrés de los peces, para obtener más información sobre el efecto de este factor en la replicación viral.



PAPER 3
(Unpublished)



The ROLE OF REASSORTMENT IN BETANODAVIRUS INFECTION IN TURBOT (*Scophthalmus maximus*). (Unpublished)**S. Souto, J.G. Oliveira & I. Bandín****Abstract**

In this study the susceptibility of turbot juveniles to two betanodavirus strains: a RGNNV/SJNNV reassortant (Ss160.03) isolated from sole and a SJNNV strain was assessed. The reassortant isolate exhibits a slightly modified SJNNV CP, with two amino acid substitutions in the C-terminal domain compared to the SJNNV parental genotype. In order, to analyse the role of those amino acids as virulence as host determinants in turbot, three mutant strains (rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀, rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀) that bear mutations in the CP sequence (positions 247 and 270) were used in experimental trials. Fish were challenged by immersion exposed to a virus concentration of 10^5 TCID₅₀/ml at 18°C and 16°C. A time course experiment was also performed at 18°C in order to compare the replication in the brain tissues of the Ss160.03 and the mutant strains.

Moderate mortalities (up to 50%) were recorded at 18°C in the fish challenged with the Ss160.03 strain, whereas low mortalities (16.7%) were observed in the group challenged with the SJNNV strain. Regarding the challenges performed with the mutants, it was observed a slight decrease (around 20%) in the mortalities caused by rSs160.03₂₄₇ and rSs160.03₂₇₀ when compared with the figures obtained with Ss160.03. However, the mutation of both positions reduced mortality more than half of that observed in fish challenged with the wild strain. These results are confirmed by those of the time course assay. In this assay the Ss160.03 strain showed the highest capacity to replicate in brain tissues (it was detected from day 5 to 30 pi and reached the highest viral load with a peak of 10^9 viral copies/g). However, the mutant rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ was not detected in the brain until 20 dpi. Regarding the strains bearing only one mutation rSs160.03₂₇₀ was first detected at 10 dpi (peak of 10^7 viral copies/g) and rSs160.03₂₄₇ at 15 dpi.

Introduction

Nervous necrosis virus (NNV), a betanodavirus belonging to the family *Nodaviridae*, genus *Betanodavirus*, is responsible of high mortality rates, most frequently observed in larvae and juveniles, in more than 50 fish species. NNV is the etiological agent of viral encephalopathy and retinopathy (VER), a neurological disorder typically characterized by lack of appetite, changes in pigmentation and abnormal swimming behaviour (Maltese and Bovo, 2007). Hyperinflation of the swim bladder and hyperexcitability may also be observed (Péducasse et al., 1999).

The genome of NNV consists of two single-stranded positive-sense RNA molecules (RNA1 and RNA2). The RNA1 encodes the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP), whereas RNA2 encodes the capsid protein (CP) of about 42 kDa. Based on phylogenetic analysis of a variable region of the RNA2 (T4 region), the betanodavirus isolates are classified into four different genotypes: striped jack nervous necrosis virus (SJNNV)-type, tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV)-type, barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV)-type and redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)-type (Nishizawa et al., 1997). A putative fifth genotype, turbot necrosis virus (TNV) has also been proposed (Johansen et al., 2004). However, the isolation of natural reassortants between SJNNV and RGNNV genotypes from sole (*Solea senegalensis*), sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) has been reported in Southern Europe in the last years (Oliveira et al., 2009; Panzarin et al., 2012; Toffolo et al., 2007). Most of these reassortant strains showed a RNA1 typed as RGNNV and a SJNNV-type RNA2. Reassortant strains isolated from Senegalese sole and sea bream exhibited a modified SJNNV capsid amino acid sequence (Oliveira et al., 2009). Two of these modified positions (residues 247 and 270) have been shown to play a major role in the betanodavirus virulence for Senegalese sole (Souto et al., 2015a).

The high susceptibility of Senegalese sole to betanodavirus infection has been previously demonstrated (Souto et al., 2015a, 2015b). This species is therefore a potential source of infection that could jeopardize species cultivated in close areas. Currently, in our area, the industry of Senegalese sole is closely related with the turbot (*Scophthalmus maximus*) farming. Betanodavirus interspecies transmission has been reported (Korsnes et al., 2012; Manin and Ransangan, 2011) which represents a risk for any susceptible fish species

inhabiting the same area than an NNV infected fish. Likewise, turbot has been demonstrated to be susceptible to betanodavirus belonging to genotypes SJNNV (Húsgard et al., 2001) and BFNNV (Somerset et al., 2003). In addition, an outbreak of VER in turbot larvae was reported, and a fifth genotype, namely the turbot nervous necrosis virus (TNV) type was proposed after sequencing the PCR product obtained from the affected turbot (Johansen et al., 2004). More recently, an isolate belonging to the RGNNV genotype has been obtained from juvenile farmed turbot (Oliveira et al., 2013).

The aim of this study was to assess the susceptibility of turbot to an isolate originated from Senegalese sole, the reassortant strain SpSs-IAusc160.03 (RGNNV/SJNNV). We also investigated the susceptibility of turbot to three recombinant Ss160.03-derived strains (rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ and rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀), in order to investigate the possible role of the amino acids 247 and 270 in host specificity and virulence. A type strain from SJNNV genotype was also included in the study for comparative purposes.

Material and Methods

Viruses and cells

The betanodaviruses strains used in this work were (i) the SpSs-IAusc160.03 (Oliveira *et al.*, 2009), called Ss160.03 in the text, a reassortant strain isolated from diseased Senegalese sole with a genome consisting on a RGNNV-type RNA1 segment and SJNNV-type RNA2 segment (RGNNV/SJNNV) and (ii) the SJNNV type strain SJNag93 (Iwamoto et al., 2001).

We also used three recombinant viruses generated from the strain SpSs-IAusc160.03 using a reverse genetics system (Souto et al., 2015b). These strains harbour site-specific mutations in the capsid protein sequence: rSs160.03₂₄₇ [S247A], rSs160.03₂₇₀ [S270N], and rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ [S247A/S270N].

The viruses were propagated in E-11 cells grown in L-15 Leibovitz (Lonza) medium supplemented with penicillin (100 units ml⁻¹) and streptomycin (100 mg ml⁻¹) and 2% foetal bovine serum (FBS, Lonza) and maintained at 25°C.

Viral titration was performed in 96-well plates (Nunc), and expressed as the viral dilution infecting 50% of the cell cultures (TCID₅₀), following the methodology described by Reed and Muench (1938).

Experimental challenges

Experimental infections in turbot were performed in order to assess the virulence of each virus.

Turbot juveniles (mean weight 2 g) were obtained from a commercial fish farm and maintained in the fish facilities of the Universidad de Santiago de Compostela. The fish were fed dry commercial pellets ad libitum daily. All efforts were made to minimize animal suffering. Fish were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the European Union guidelines for the handling of laboratory animals (directive 2010/63/UE). The protocol was approved by the Galician Committee of experimental animal's welfare and the Xunta de Galicia (Permit Id. 15004/13/002). The fish were placed in opaque tanks containing seawater and acclimated at experimental temperature for 10 days. Before each experimental infection, 10 fish were sacrificed with an anaesthetic overdose (MS-222, Sigma-Aldrich) and used for diagnosis of bacterial pathogens as well as four regular viral agents: infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and betanodavirus as described by Oliveira et al. (2013). The temperature of the water at the facilities was maintained at 16°C. In those groups at 18°C the temperature of the tanks was raised 0.5°C per day and maintained by immersion heaters. All the challenges were performed by bath immersion at a virus concentration of 10^5 TCID₅₀/mL for 3h with strong aeration. Control fish were handled as the infected groups and L-15 medium was used for mock infection. Mortalities and clinical signs were recorded daily and dead fish were removed. The sampled fish as well as surviving fish were euthanized using a MS-222 overdose. Brains samples (in pools of 5) were used for identification and quantification of the virus by RT-qPCR and cell culture.

Challenge 1. Susceptibility to the reassortant strain Ss160.03 at 18 and 16°C.

Two groups of turbot ($N=30$) were bath challenged with the strain Ss160.03 at two different temperatures 18°C and 16 °C. Other two groups ($N=10$) were mock infected at both temperatures. Fish were maintained for 35 days.

Challenge 2. Comparison between the susceptibility to the Ss160.03 and SJNNV-type strains

Four groups of fish ($N=30$) were infected with either SJNag93 (a SJNNV strain) and the reassortant Ss160.03 at 18°C and 16 °C. Two control groups ($N=10$) were also performed at both temperatures Fish were maintained for 30 days

Challenge 3. Comparison between the susceptibility to the wSs160.03 and the recombinant strains-I

Turbot were bath challenged with either the wild strain wSs160.03 or recombinants rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀, rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀, and L-15 medium (control groups) at the two temperatures: 18°C ($N=30$ fish/strain) and 16°C ($N=20$ fish/strain).

Challenge 4. Comparison between the susceptibility to the wSs160.03 and the recombinant strains-II Mortality and time course sampling trial

Fish were infected with the same strains described in the challenge 3. Two different assays were performed: a mortality assay at 18°C ($N=30$ fish/strain) and 16°C ($N=20$ fish/strain) and a time course sampling assay at both temperatures (50 fish per strain and temperature). In the time course assay, ten fish were sampled from each tank for the analysis by quantitative RT-PCR at 5, 10, 15, 20 and 30 days post-infection.

Virus isolation

Brain tissues (in pools of 5) were collected and homogenized in Earle's medium (1:5 w/v) supplemented with antibiotics (1000 IU/ mL penicillin, 1000 µg/ mL streptomycin, 500 µg/ mL gentamycin and 500 µg/ mL partricin). Following centrifugation of samples at $3000 \times g$ for 15 min at 4°C, the resulting supernatants were split in two aliquots; one stored at -80°C for later use in RT-qPCR and the other incubated for 24 h at 4 °C and afterwards inoculated onto a monolayer of E-11 cells cultured in a 24-well plate at a final dilution of 1:100 and 1:1000. The plates were incubated at 25 °C and monitored for cytopathic effect (CPE) for 7 days. Identity of viral isolates was confirmed by RT-PCR.

Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA genome of betanodaviruses was extracted from brain tissues or cell culture homogenates using E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek) and analysed by RT-PCR using Superscript III (Invitrogen) for the cDNA synthesis and the Gotaq Polymerase (Promega) for the PCR. The pairs of primers used, F2/R3 for the RNA2 (Nishizawa et al., 1994) and F7/R7 for the RNA1 (Névarez et al., 2004). PCR products were subjected to nucleotide sequencing using the CEQTM Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (Beckman Coulter) in a CEQTM 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter). The sequences were analysed using DNASTARLasergene® v.7.1 SeqMan II and MegAlign (DNASTAR).

Quantitative Real-Time (qPCR).

The qPCR was performed using SYBR green reagent with a *CFX96TM Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) in 20- μ l mixture containing 2 μ l of cDNA, 200 nm of each primer SnodR1 (Oliveira et al. 2013), 10 μ L 2x iQTMSYBR®Green Supermix (Bio-Rad) and 2 μ L of cDNA. The quantification was performed as previously described (Souto et al., 2015b). All samples were tested in triplicate.

Secondary structure prediction.

The amino acid sequence of the coat protein of the wSs160.03 and de recombinants rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ and rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ were subjected to secondary structure prediction using GOR algorithm or Garnier–Osguthorpe–Robson method (Garnier et al., 1996) implemented in Genious software.

RESULTS

Turbot were confirmed to be free from bacterial pathogens, VHSV, IHNV, IPNV and betanodaviruses prior to infection. No mortalities were observed in the mock infected fish, and no virus was detected in these control fish at the end of the trials. Identity of the re-isolated virus from the infected fish was confirmed by RT-PCR and the presence of the mutations by sequencing.

Challenge 1: Susceptibility to the reassortant strain Ss160.03 at 18 and 16°C.

The mortality curves from this experimental infection are represented in Fig. 1. At 18°C mortalities were recorded between 19 and 27 days post-infection (dpi) and cumulative mortality reached 50%. During this time some fish showed abnormal swimming behaviour with looping and spiral movements. However, at 16 °C only 3 fish died (10%), 1 at day 25 and 2 at 28 dpi and no clinical signs were observed. Table 1 shows the RNA1 mean copies per gram of tissue obtained from dead fish and survivors at both temperatures. Very similar viral load was observed in all the pools of infected fish. The RNA1 copy number ranged from 4.1×10^8 mean copies/g ($N=3$) from survivors at 18 °C to 2.9×10^9 copies/g ($N=1$, 3 dead fish pooled) recorded in dead fish at 16 °C. NNV was re-isolated by cell culture from all pools of fish.

Challenge 2: Comparison between the susceptibility to the Ss160.03 and a SJNNV-type strain

The mortalities at 18 °C reached 36.7% in the group infected with the reassortant strain and 16.7% in the fish challenged with the SJNNV-type strain (Fig. 2A). The onset of mortality in the reassortant-challenged group was at 15 dpi and lasted to 22 dpi. In the group infected with the SJNNV isolate the 6 fish died from 13 dpi to 20 dpi. During the mortality phase some fish challenged with the reassortant isolate showed abnormal swimming behaviour. At 16 °C very low mortalities (6.7-10%) were recorded among the fish challenged with the two isolates (Fig. 2B). No clinical signs were observed at this temperature. Regarding the viral load recorded in the different groups (Fig. 3), at 18°C within the group challenged with isolate Ss160.03 dead fish ($N=2$) reached 7.6×10^9 mean copies/g and survivors ($N=3$) showed a viral load 1 log lower (7.3×10^8 mean copies/g). In the group challenged with the SJNNV isolate the viral load in dead fish ($N=1$) was 1.1×10^8 copies/g and the survivors ($N=4$) reached 1.0×10^9 mean copies/g. At 16°C within the group challenged with Ss160.03, viral load in dead fish (only 1 pool containing 2 fish) was 10^9 copies/g and in the survivors ($N=4$) reached 4.2×10^8 mean copies/g. As it was observed at 18°C the lowest viral load was obtained in the SJNNV-challenged group, 1.9×10^7 copies/g were recorded from dead fish (1 pool of 3 fish) and 2.6×10^8 mean copies/g from survivors ($N=4$). No significant differences were found after comparing the mean copies of the surviving fish infected with the different isolates at 18 °C or 16 °C. The virus was re-isolated by cell culture from all the pools at both temperatures.

Challenge 3: Comparison between the susceptibility to the wSs160.03 and the recombinant strains-I

The cumulative mortality from challenged fish with the recombinant strains and the wild strain wSs160.03 and kept at 18°C are represented in Fig. 4A. The wild strain showed the highest mortality rate (50 %) and the strain rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ the lowest one (20%). Virulence of the recombinant strains rSs160.03₂₄₇ and rSs160.03₂₇₀ that bear a single amino acid substitution was alike, with mortalities of 40% and 36.7%, respectively. Mortalities were recorded between 20 to 27 dpi and abnormal swimming behaviour was observed in some fish during the acute mortality phase in the groups challenged with wSs160.03 and rSs160.03₂₇₀. No clinical signs were observed in the other groups. No mortality or clinical signs were observed in the challenged groups during the trial at 16°C. At 18 °C, the viral load in the dead fish from the group challenged with the wSs160.03 strain ($N=3$) was 2.2×10^8 mean copies/g around 1 log higher than that observed in the fish challenged with the rSs160.03₂₄₇ (1.9×10^7 mean copies/g of tissue, $N=2$) (Fig. 4B). In both cases virus was re-isolated from all pools. Two pools of dead fish were analysed from the fish infected with the rSs160.03₂₇₀ strain. However, virus was only recovered from the first pool (viral load 2.9×10^7 copies/g), whereas in the second pool the RNA copies number was slightly lower (6.9×10^6 copies/g). The only pool of dead fish obtained from the group challenged with the strain rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ was positive for betanodavirus by RT-qPCR (2.1×10^7 copies/g) and cell culture. The virus was not recovered from any pool of surviving fish with the exception of one pool of fish challenged with the wSs160.03, which showed a viral load of 4.8×10^7 copies/g. The survivors in the remaining groups showed lower RNA copies numbers (2.2×10^5 , 2.5×10^5 and 6.8×10^6 mean copies/g in the groups challenged with rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ and rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀, respectively).

The results obtained from the surviving fish at 16 °C are also shown in Table 2. The wSs160.03 was detected in the four pools analysed (1.1×10^7 mean copies/g) but it was only re-isolated from 2 pools both with 1.6×10^7 copies/g. In the fish challenged with the mutant rSs160.03₂₄₇ the virus was detected by RT-qPCR in 3 pools out of 4 with a viral load of 2.0×10^6 mean copies/g, although no infective virus was recovered from none of them. In the group challenged with the mutant rSs160.03₂₇₀ the virus was detected by RT-qPCR in 3 out of 4 pools reaching 1.5×10^7 mean copies/g. Betanodavirus was isolated from two of these pools

with a viral load of 1.5 and 2.6×10^7 copies/g, but no infective particles were recovered from the other pool showing 3.5×10^6 copies/g tissue. The mutant rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ was detected in 3 out of 4 pools (3.7×10^6 mean copies/g) and the virus was re-isolated only from 1 pool (6.7×10^6 copies/g).

Challenge 4: Comparison between the susceptibility to the wSs160.03 and the recombinant strains-II Mortality and time course sampling trial

No mortalities were recorded during this experiment at 18°C or 16°C . Some fish from the group infected with the wSs160.03 showed erratic swimming such as looping and spiral swimming at 18°C in both experimental groups (mortality and sampling). Fish were fed until the end of the experiment at both temperatures. No clinical signs were observed at 16°C .

After 30 dpi survivors from the mortality experiment at 18°C were subjected to mechanical stress in order to evaluate the replication of the virus under moderate disturbing conditions. The mortality curves and the results from this trial are shown in Fig. 5 and Table 3, respectively. Stress led to a high mortality in all groups, fish began to die after two days in the group challenged with wSs160.03. However, the first pool of dead fish (P1, composed of 5 fish that died between day 2 and 5 post stress) had low viral load (6.7×10^3 copies/g) and virus was not re-isolated by cell culture. After that, fish analysed in the remaining pools reached a viral load of 2.3×10^7 mean copies/g and the virus was successfully recovered in cell culture. The fish infected with recombinants rSs160.03₂₄₇ and rSs160.03₂₇₀ showed similar behaviour. In both groups, the highest genome copy number was obtained from the first pools of dead fish (P1 and P2) in which fish died between days 6-7 (rSs160.03₂₄₇) and 5-6 dpi (rSs160.03₂₇₀) reaching 1.1 and 1.9×10^7 mean copies/g, respectively, and the virus was re-isolated in cell culture as well. The remaining dead fish were not positive by cell culture and the number of copies was between 2.2×10^5 and 9.8×10^4 . Even though all pools of fish challenged with rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ were positive by RT-qPCR (viral load of 1.3×10^5 mean copies/g) the virus was not recovered by cell culture. The mortality curve of this group was quite different to the other groups with acute mortalities (19 fish died in a single day, Fig. 5).

Time course trial

Regarding the sampling assay the results from the trial at 18°C are represented in the Fig. 6. The highest capacity to replicate in brain tissues was observed with the wSs160.03 strain.

Viral genome was detected at day 5 p.i. but only from one of the two pools of fish analysed (2.5×10^5 copies/g) and grew substantially until 15 dpi, reaching 1.4×10^9 mean copies/g of tissue (n=2) to decrease to 6.1×10^6 mean copies/g at 20 dpi. Finally it was observed a slight increase at 30 dpi (1.2×10^7 mean copies/g). The virus was recovered in cell culture from 10 dpi to 30 dpi. Recombinant strains rSs160.03₂₇₀ was first detected at 10 dpi with a viral load of 1.8×10^6 mean copies/g. A similar viral load was maintained 15 and 20dpi (mean viral load 4.4 and 1.5×10^6 copies/g, respectively) to finally increase 1 log (1.2×10^7 copies/g). Virus was recovered in cell culture at 15 and 30 dpi. The recombinant rSs160.03₂₄₇ was first detected in the brain at 15 dpi, showing high differences between the two pools analysed: one pool was positive by cell culture and reached 7.0×10^7 copies/g, whereas the other pool only yielded 2.2×10^4 copies/g and no infective particles were recovered in cell culture. At 20 dpi the viral load in fish challenged with this strain was roughly 10^6 mean copies/g and no virus was isolated. At the end of the experiment a 1 log increase was observed (1.7×10^7 mean copies/g) at day 30, which allowed the isolation in cell culture. rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ was not detected by RT-qPCR until 20 dpi, showing a viral load of 1.5×10^6 meancopies/g, value that grew slightly towards the end of the experiment (7.2×10^6 mean copies/g). No infective particles were recovered.

At 16°C viral replication was clearly reduced and only the strain wSs160.03 and the recombinant rSs160.03₂₄₇ were detected (Table 4). The wild strain was detected at 10 and 15 dpi but only recovered by cell culture from one pool at 10 dpi (1.5×10^5 copies/g), whereas the recombinant was detected from the two pools at 15 dpi but isolated from one of them (1.6×10^5 copies/g).

Secondary structure prediction

As it is shown in Fig 7 simulation of the secondary structure of the capsid indicated that the substitution at position 247 from serine to alanine caused a shortening in the coil between two β -strands and the substitution at position 270 from serine to asparagine led to the formation of a two residues β -turn

Discussion

In the present study the susceptibility of turbot juveniles to a reassortant betanodavirus strain (RGNNV/SJNNV) and to s SJNNV-type strain was assessed at two different temperatures 16 (turbot rearing temperature) and 18°C (the highest water temperature reached in summer in our area, which is more appropriate for betanodavirus growth). Moderate levels of mortality at 18 °C were caused by the reassortant strain Ss160.03 (up to 50%), whereas low levels of mortality (17%) were observed in the SJNNV-challenged group. Mortality in bath challenged turbot using the same SJNNV strain was not recorded by Húsgard et al. (2001), but differences in fish size (mean 4,3 g versus 2 g) and duration of bath exposure (1 h versus 3 h) could account for the different results. At 16°C low mortalities were observed in both groups. These results are in agreement with our previous observations in sole (Souto et al., 2015b) and with those reported by Nishizawa et al.(2012) and Tanaka et al. (1998) who observed a decrease in mortality by reducing rearing temperature in different grouper species. The analysis of viral replication indicated that the number of viral copies was always higher in the dead fish challenged with the reassortant strain (almost two logs at 18 °C and 16 °C) However, the results obtained from the survivors showed a similar level of replication of both isolates at both temperatures.

It is interesting to note that the reassortant strain, harbouring a SJNNV capsid with slight modifications (5 amino acid substitutions with respect to the SJNag93) caused a mortality level 30% higher than that caused by SJNag93 strain at 18 °C. To date studies on betanodavirus virulence have been scarce. It has been postulated that the RNA 2 and the capsid protein are involved in the host cell interaction and especially the C-terminal region of the capsid has been regarded to control host specificity (Ito et al., 2008; Iwamoto et al., 2004). In a previous work (Souto et al., 2015a) we demonstrated that two residues of the capsid protein located in the C-terminal region (247 and 270) of the reassortant Ss160.03 play a major role in the betanodavirus pathogenicity for sole. In the present study mutation of each amino acid (S247A or S270N) had a slight effect on the mortality of turbot juveniles (a 10% reduction in both cases). However, mutation of both positions reduced mortality more than half of that observed in fish challenged with the wild strain. These findings are in agreement with the poor initial replication of the recombinant virus harbouring both mutations which was not detected in the brain until 20 dpi, whereas the wild strain was detected 5 dpi. In

addition, the wild-type strain showed a sustained increase from 5 to 15 dpi up to reach 1.4×10^9 copies/g (although thereafter showed a decrease), whilst the viral load of the mutant strain was roughly 10^6 copies/g. In the time course experiment performed at 16 °C although the difficulties to replicate for the all strains were evident, the wild-type strain was detected at 10 and 15 dpi. However, the strain showing both mutations was not detected at any sampling time. Different results were obtained in Senegalese sole, the fish species from which wt Ss160.03 was isolated. In this species the wt strain caused 100% mortality (Souto et al., 2015a, 2015b), and substitution of either 247 or 270 resulted in a reduction of mortality of 40%, but mutation of both amino acid positions did not lead to a further attenuation of the recombinant virus (Souto et al., 2015a). Simulation of a secondary structure of the capsid indicated that the substitution at position 247 from serine to alanine caused a shortening in the coil between two β -strands, whereas substitution at position 270 from serine to asparagine led to a small β -turn, which means that the secondary structure elements combined in a super-secondary structure. Both residues are located in the surface-protruding domain reported by Tang et al. (2002) to form 60 protrusions which would be involved in cell host recognition. We have previously postulated that these amino acidic positions, as well others that have been changed in the capsid of the reassortant strain with respect to the SJNag93 capsid could have favoured sole colonization (Olveira et al., 2009). Following this hypothesis this modified capsid would provide a best interaction with the sole cells and therefore substitution of any of the modified amino acids would have a considerable effect on virulence, as it has been demonstrated (Souto et al., 2015b). However, since this interaction seems to be much less efficient in turbot, probably because the receptors are different which may have had a significant effect on the virulence (moderate mortalities caused by the wt strain up to 50%). In this context, the modification of one amino acidic position seems not to have a significant effect on virulence and it would be necessary for both positions to be modified in order to cause such effect. It has been postulated that in other neurotropic virus such as Sindbis virus the changes in the glycoprotein can affect their ability to invade the nervous system (Lustig et al., 1988). It can be suggested that the mutations have altered the affinity to the cellular receptors in turbot, which is already low, and therefore affecting the kinetics of virus replication, probably leading to a different tropism of the virus. Further studies with detection of the recombinant strains in other tissues could help to clarify this hypothesis.

On the other hand it is interesting to analyze the effect of stress on the replication of the wt strain and the different recombinant strains. It has been suggested that stress conditions could favour the betanodavirus replication in non-nervous tissues as gonads (Arimoto et al., 1992), nevertheless so far it is not documented if it also occurs in the in brain. First of all, it is important to note that although 100% mortality was observed in the four groups of infected fish, in the group challenged with the recombinant rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀, mortality curve showed acute mortalities in a single day and the virus was not recovered in cell culture, indicating that mortalities were not caused by the viral strain. Regarding the other strains, the replication of wt strain was clearly favoured by the stress because mortalities were first observed in fish challenged with this strain, and although the strain was not recovered from the first pool of dead fish it was re-isolated from the remaining pools. Recombinants rSs160.03₂₄₇ and rSs160.03₂₇₀ seemed also to increase their replication but only to a certain extent, because viral recovery was only achieved from the first pools of dead fish. These results confirm that stress increase the replication of betanodavirus in the nervous tissues, but further studies will be necessary to determine the mechanisms involved and the importance of this factor in betanodavirus replication.

References

- Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroge, K., Furusawa, I., 1992. Detection of Striped Jack Nervous Necrosis Virus(SJNNV) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA). *Fish Pathol.* 27, 191–195.
- Garnier, J., Gibrat, J.-F., Robson, B., 1996. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence, *Methods in Enzymology*, Methods in Enzymology. Elsevier.
- Húsgard, S., Grotmol, S., Hjeltnes, B.K., Rødseth, O.M., Biering, E., 2001. Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Dis. Aquat. Organ.* 45, 33–44.

Ito, Y., Okinaka, Y., Mori, K.-I., Sugaya, T., Nishioka, T., Oka, M., Nakai, T., 2008. Variable region of betanodavirus RNA2 is sufficient to determine host specificity. *Dis. Aquat. Organ.* 79, 199–205.

Iwamoto, T., Mise, K., Mori, K., Arimoto, M., Nakai, T., Okuno, T., 2001. Establishment of an infectious RNA transcription system for Striped jack nervous necrosis virus, the type species of the betanodaviruses. *J. Gen. Virol.* 82, 2653–2662.

Iwamoto, T., Okinaka, Y., Mise, K., Mori, K.-I., Arimoto, M., Okuno, T., Nakai, T., 2004. Identification of host-specificity determinants in betanodaviruses by using reassortants between striped jack nervous necrosis virus and sevenband grouper nervous necrosis virus. *J. Virol.* 78, 1256–1262.

Johansen, R., Sommerset, I., Tørud, B., Korsnes, K., Hjortaa, M.J., Nilsen, F., Nerland, a H., Dannevig, B.H., 2004. Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis.* 27, 591–601.

Korsnes, K., Karlsbakk, E., Nylund, A., Nerland, A.H., 2012. Horizontal transmission of nervous necrosis virus between turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic cod *Gadus morhua* using cohabitation challenge. *Dis. Aquat. Organ.* 99, 13–21.

Lustig, S., Jackson, a C., Hahn, C.S., Griffin, D.E., Strauss, E.G., Strauss, J.H., 1988. Molecular basis of Sindbis virus neurovirulence in mice. *J. Virol.* 62, 2329–2336.

Maltese, C., Bovo, G., 2007. Viral encephalopathy and retinopathy. *Ittiopatologia* 4, 93–146.

Manin, B.O., Ransangan, J., 2011. Experimental evidence of horizontal transmission of Betanodavirus in hatchery-produced Asian seabass, Lates calcarifer and brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* fingerling. *Aquaculture* 321, 157–165.

Névarez, L., Cozien, J., Thiéry, R., 2004. Characterization of the RNA-dependent RNA polymerase gene of isolates of viral encephalopathy and retinopathy virus, in: VIth International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates. Hakodate, Japan, p. P–15.

- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T., Muroga, K., 1997. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1633–1636.
- Nishizawa, T., Gye, H.J., Takami, I., Oh, M.-J., 2012. Potentiality of a live vaccine with nervous necrosis virus (NNV) for sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* at a low rearing temperature. *Vaccine* 30, 1056–1063.
- Nishizawa, T., Mori, K., Nakai, T., Furusawa, I., Muroga, K., 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Organ.* 18, 103–107.
- Olveira, J.G., Souto, S., Dopazo, C.P., Bandín, I., 2013. Isolation of betanodavirus from farmed turbot *Psetta maxima* showing no signs of viral encephalopathy and retinopathy. *Aquaculture* 406, 125–130.
- Olveira, J.G., Souto, S., Dopazo, C.P., Thiéry, R., Barja, J.L., Bandín, I., 2009. Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *J. Gen. Virol.* 90, 2940–2951.
- Panzarin, V., Fusaro, A., Monne, I., Cappelozza, E., Patarnello, P., Bovo, G., Capua, I., Holmes, E.C., Cattoli, G., 2012. Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infect. Genet. Evol.* 12, 63–70.
- Péducasse, S., Castric, J., Thiéry, R., Jeffroy, J., Le Ven, A., Baudin Laurencin, F., 1999. Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. *Dis. Aquat. Organ.* 36, 11–20.
- Sommerset, I., Lorenzen, E., Lorenzen, N., Bleie, H., Nerland, A.H., 2003. A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine* 21, 4661–4667.
- Souto, S., Lopez-Jimena, B., Alonso, M.C., García-Rosado, E., Bandín, I., 2015a. Experimental susceptibility of European sea bass and Senegalese sole to different betanodavirus isolates. *Vet. Microbiol.* 177, 53–61.

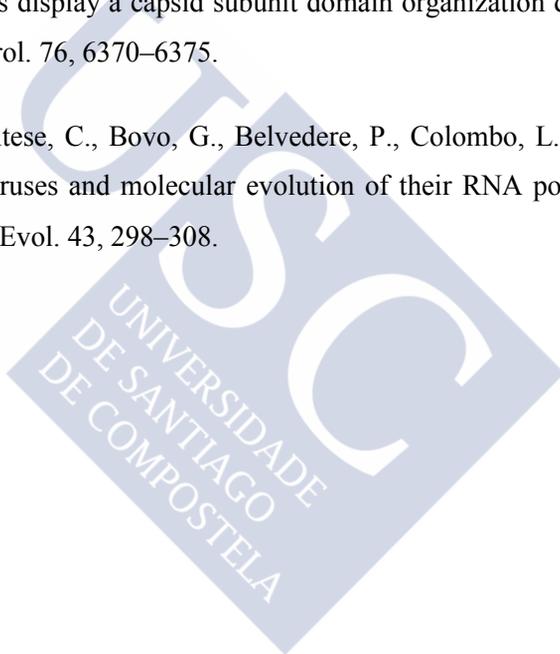
Souto, S., Mérour, E., Biacchesi, S., Brémont, M., Oliveira, J.G., Bandín, I., 2015b. In vitro and in vivo characterization of molecular determinants of virulence in reassortant betanodavirus. *J. Gen. Virol.* 96, 1287–1296.

Souto, S., Oliveira, J.G., Bandín, I., 2015c. Influence of temperature on Betanodavirus infection in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Vet. Microbiol.* 179, 162–167.

Tanaka, S., Aoki, H., Nakai, T., 1998. Pathogenicity of the Nodavirus Detected from Diseased Sevenband Grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathol.* 33, 31–36.

Tang, L., Lin, C.-S., Krishna, N.K., Yeager, M., Schneemann, A., Johnson, J.E., 2002. Virus-like particles of a fish nodavirus display a capsid subunit domain organization different from that of insect nodaviruses. *J. Virol.* 76, 6370–6375.

Toffolo, V., Negrisolo, E., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., Colombo, L., Valle, L.D., 2007. Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Mol. Phylogenet. Evol.* 43, 298–308.



TABLES

Table1. Virological examination of brain samples from challenge 1. Pools of dead and surviving fish at the end of the experiment were examined using cell culture assay (C.C.) and RT-qPCR (expressed as mean RNA1 copies per g of tissue).

Water Temp.		Virological analysis	
		C.C. ¹	Mean copies ²
18°C	Dead fish	3 /3	1.6×10^9
	Survivors	3 /3	4.1×10^8
16°C	Dead fish	1 /1	2.9×10^9
	Survivors	5 /5	1.7×10^9

¹Pools of fish in which the virus was recovered by cell culture/ total of pools analyzed. ²Mean RNA1 copies/g of tissue

Table 2: Virological examination of brain samples from challenge 3. Pools of surviving (Sv1-Sv4) fish at the end of the experiment, maintained at 16 °C, were examined using cell culture assay (C.C.) and RT-qPCR (expressed as number of RNA1 copies per g of tissue).

Virological analysis of challenge 3: C.C. / RT-qPCR (copies /g)						
Temp.	Virus strain	Sv1	Sv2	Sv3	Sv4	Mean
16 °C	wSs160.03	+ / 1.6×10^7	+ / 1.6×10^7	- / 7.1×10^6	- / 6.2×10^6	1.1×10^7
	rSs160.03 ₂₄₇	- / 2.1×10^5	- / 5.5×10^6	NA	- / 3.2×10^5	2.0×10^6
	rSs160.03 ₂₇₀	+ / 2.6×10^7	NA	+ / 1.5×10^7	- / 3.5×10^6	1.5×10^7
	rSs160.03 ₂₄₇₊₂₇₀	NA	+ / 6.7×10^6	- / 4.5×10^7	- / 3.9×10^7	3.7×10^6

(+) positive and (-) negative results from cell culture/RT-qPCR assays. NA, not applicable.

Table 3: Virological examination of brain samples from the mortality trial-stress. Brain tissues from dead fish were analyzed in pools of 5 (P1-P6) by cell culture and RT-qPCR expressed as mean number of RNA1 copies per g of tissue.

Virological analysis of challenge 3: C.C. / RT-qPCR (copies /g)									
Water Temp.	Virus strain	Cell culture/ RT-qPCR						Re-isolated	Non Re-isolated
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	RNA1 copies /g	RNA1 copies /g
18 °C	wSs160.03	- /+	+ /+	+ /+	+ /+	+ /+	+ /+	2.3×10^7	6.7×10^3
	rSs160.03 ₂₄₇	+ /+	+ /+	- /+	- /+	- /+	- /+	1.1×10^7	2.2×10^5
	rSs160.03 ₂₇₀	+ /+	+ /+	- /+	- /+	- /+	- /+	1.9×10^7	9.8×10^4
	rSs160.03 ₂₄₇₊₂₇₀	- /+	- /+	- /+	- /+	- /+	- /+	NA	1.3×10^5

(+) positive and (-) negative results from cell culture/RT-qPCR assays. NA: not applicable.

Table 4: Virological analysis results of the time course experiment. Bath challenged turbot with the strains wSs160.03, rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ and rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ at 16°C analyzed at 5, 10, 15, 20 and 30 days post-infection. Virus examination from brain tissues in cell culture and RT-qPCR expressed as mean number of RNA1 copies per g of tissue (N=2) and standard deviation (SD).

Virological analysis of the time course. Challenge 4: C.C. / RT-qPCR (copies /g)										
Temp. Agua	Cepa viral	10 dpi		15 dpi		20 dpi		30 dpi		mean copies
		P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	
16 °C	wSs160.03	Neg.	+1.5×10 ⁵	Neg.	-1.9×10 ⁵	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	1.7 × 10 ⁵
	rSs160.03 ₂₄₇	Neg.	Neg.	+ 1.6×10 ⁵	-7.9×10 ⁴	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	1.2 × 10 ⁵
	rSs160.03 ₂₇₀	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NA
	rSs160.03 ₂₄₇₊₂₇₀	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NA

(+) positive and (-) negative results. Cell culture/RT-qPCR (copies/g). Neg: negative for betanodavirus.



FIGURES

Figure 1: Percentage cumulative mortality caused by Ss160.03. Turbot juveniles were infected by bath (10^5 TCID₅₀ ml⁻¹) and maintained at 18 °C (Square) and 16 °C (circle) for 35 days.

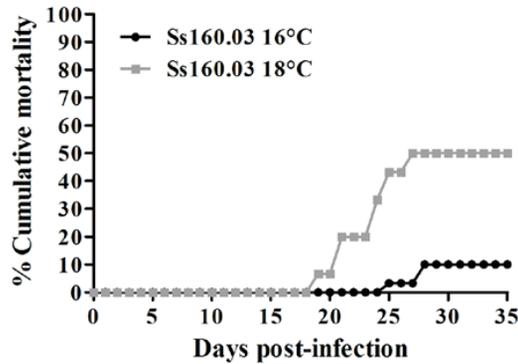


Figure 2: Percentage cumulative mortalities. Turbot were bath-challenged with 10^5 TCID₅₀/ml of the reassortant Ss160.03 (square) and the SJNag93 (triangle) and were kept at two temperatures: 18 °C (A) and 16 °C (B).

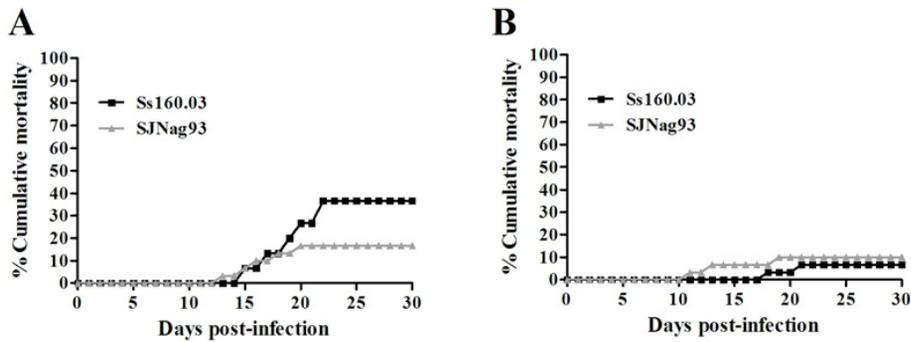


Figure 3: Virological examination of brain samples from challenge 2. Pools of dead (D) and surviving fish at the end of the experiment (Sv) were examined by RT-qPCR (expressed as Log₁₀ number of RNA1 copies per g of tissue). n= number of pools analysed in each group from the groups infected with Ss160.03 and SJNag93 at 18 °C (left) and 16 °C (right). The bars represent the mean copies and the standard deviation (SD).

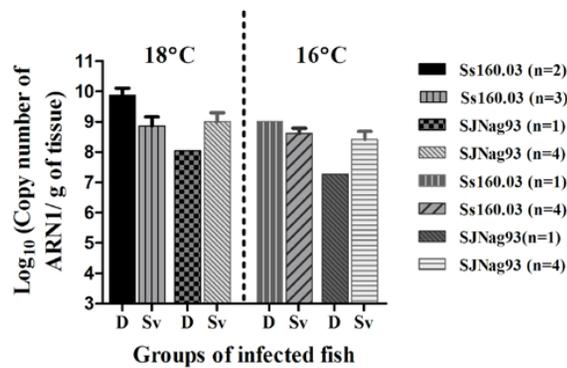


Figure 4: Results from challenge 3 at 18 °C. (A) Curves of mortality of turbot infected with the wild-type wSs160.03 (square) and the three recombinants: rSs160.03₂₄₇ (circle), rSs160.03₂₇₀ (asterisk) and rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ (triangle). (B) Virological examination. Pools of dead (D) and surviving fish at the end of the experiment (Sv) were examined by RT-qPCR (expressed as Log₁₀ number of RNA1 copies per g of tissue). n= number of pools analyzed in each group from the groups infected with wSs160.03 and the three recombinants strains rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀ and rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ (from left to right). The bars represent the mean copies and the standard deviation (SD).

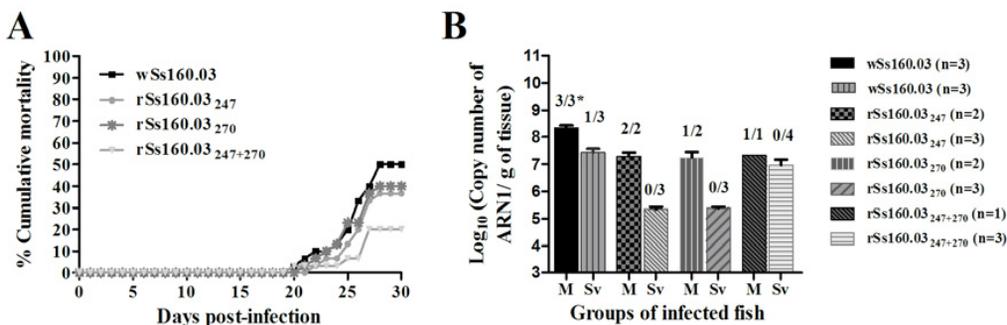


Figure 5: Curves of mortality obtained in challenge 4 in which turbot were subjected to mechanical stress from day 30 pi. Fish were infected with the wild-type wSs160.03 (square) and the three recombinants: rSs160.03₂₄₇ (circle), rSs160.03₂₇₀ (asterisk) and rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ (triangle) and kept at 18 °C.

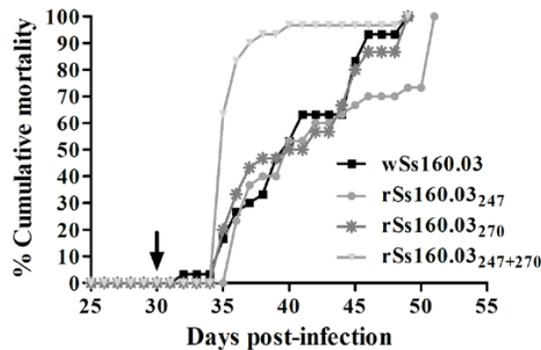


Figure 6: Time course of the viral replication in brain. RNA1 replication in brain tissues of the turbot infected with rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀, rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ and wSs160.03. Numbers on the y axis represent the log₁₀ of the number of RNA1 copies detected by RT-qPCR per gram of brain tissues ($N=2$) and the numbers on the x axis indicate the days post-challenge. Fish were infected by bath at a final concentration of 10^5 TCID₅₀ ml⁻¹ and maintained at 18 °C. Samples were analysed in pools of five fish. *Pools of fish positive for betanodavirus by cell culture ¹virus detected by RT-qPCR from 1 out of 2 pools. ² virus recovered by cell culture from 1 out of 2 pools.

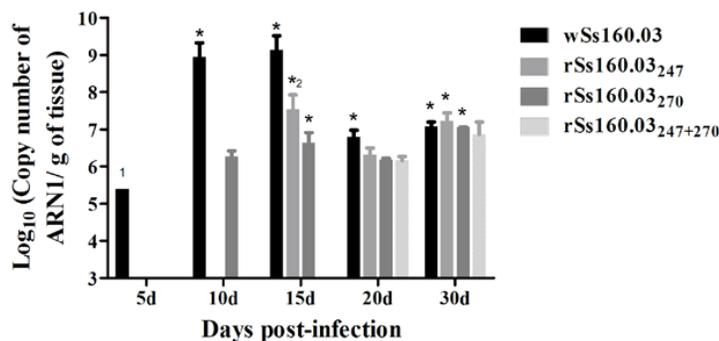
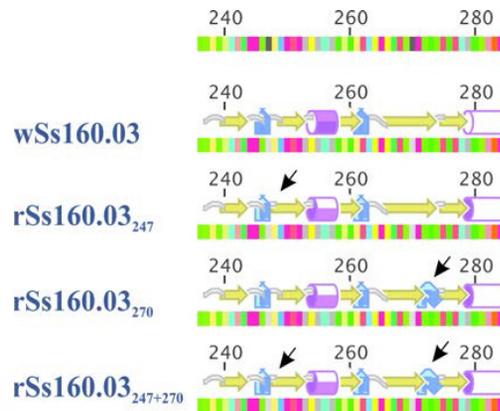


Figure 7. Simulation of the secondary structure of the capsid protein sequence. The predicted structures of the wSs160.03 and the recombinant strains are represented. The changes observed at the two positions (247 and 270) are indicated by arrows.



CAPÍTULO 4:

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA INFECCIÓN DE LENGUADO POR BETANODAVIRUS.

**Influence of temperature on Betanodavirus infection
in Senegalese sole (*Solea senegalensis*).
Vet. Microbiol. **179**, 162–167 (2015).**



1. INTRODUCCIÓN

Los factores ambientales ejercen una gran influencia sobre la interacción virus-hospedador. Entre estos factores, la temperatura del agua es determinante en las infecciones producidas por bacterias y virus. Los peces, como animales ectotermos, están muy adaptados a su entorno acuático particular, de modo que la temperatura del agua influye en todos los procesos corporales, incluidos los que intervienen en el sistema inmune. Por ello, los cambios en la temperatura externa, tienen la capacidad de modular la susceptibilidad de los peces a los distintos patógenos. Por otro lado, la temperatura interviene modificando la virulencia del agente patógeno afectando a los procesos de colonización de órganos diana del hospedador, en la unión, transporte y replicación a nivel celular y, finalmente, en la liberación de partículas infectivas.

En un primer momento, a la necrosis nerviosa viral (VNN) o encefalopatía y retinopatía viral (VER) originada por betanodavirus, se le denominó “enfermedad de verano”; debido a que la aparición de esta patología se asociaba a temperaturas de 29-30 °C, valores típicos del verano tropical (Bellance y Gallet de Gaint-Aurin, 1988). En observaciones posteriores, se pudo comprobar que las infecciones por betanodavirus se producen principalmente con temperaturas del agua de entre 20 y 30 °C (Maltese y Bovo, 2007). Además, se han registrado brotes en aguas con temperaturas por debajo de estos valores; en bacalao (*Gadus morhua*) cultivado en Noruega a temperaturas medias de entre 12 y 19 °C (Hellberg y col., 2010); en lubina (*Dicentrarchus labrax*) cultivada a 15 °C (Borghesan y col., 2003); y en fletán del atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) a 6 °C (Grotmol y col., 1999), lo que demuestra que los betanodavirus tienen una gran capacidad de adaptación a distintos ambientes. Diferentes autores, han asociado la aparición de signos clínicos con incrementos de la temperatura del agua (Arimoto y col., 1994; Fukuda y col., 1996; Tanaka y col., 1998); mientras que se ha descrito que la proliferación de betanodavirus se inhibe cuando la temperatura del agua supera los 30 °C (Yuasa y col., 2007).

En base a los aislamientos de betanodavirus, en peces de acuicultura se ha visto que existe una asociación entre genotipos y especies cultivadas en distintas zonas geográficas con climas distintos. Los genotipos RGNNV y SJNNV se asocian a especies cultivadas en aguas con temperaturas superiores a los 20 °C, pero mientras el genotipo SJNNV causaría brotes de enfermedad con temperaturas entre 20 y 26 °C (Arimoto y col., 1994); el genotipo RGNNV lo

haría entre 25 y 30 °C. Por otra parte, el genotipo BFNNV se asocia a peces de aguas frías, como es el caso del bacalao o del fletán (Grotmol y col., 1999). Por este motivo, se ha propuesto que la evolución de los betanodavirus podría estar influenciada por la temperatura de las regiones geográficas en las que se encuentra. Se ha sugerido, que la capacidad de cada aislado para adaptarse a una determinada temperatura depende de las diferencias genómicas de los distintos genotipos. Totland y col. (1999) realizaron una infección cruzada; infectando jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*) a 20 °C con una cepa del genotipo BFNNV, aislada de fletán a 6 °C; y por otro lado fletán a 6 °C, con un aislado de genotipo SJNNV, procedente de jurel dentón a 20 °C. El resultado fue una clara pérdida de virulencia de ambos aislados, debida posiblemente a la adaptación del genoma viral a la especie hospedadora y/o a la temperatura. Thiéry y col. (1999) describieron la adaptación a diferentes temperaturas, con el aislamiento de cepas con diferentes genotipos aislados de una misma especie cultivada en distintas condiciones ambientales. En este sentido, el mismo grupo (Thiéry y col., 2004) aisló una cepa de betanodavirus perteneciente al genotipo BFNNV de lubina cultivada a baja temperatura, siendo la lubina una especie habitualmente cultivada en aguas templadas-cálidas e infectada por betanodavirus del genotipo RGNNV.

El estudio del comportamiento de diferentes cepas de betanodavirus en líneas celulares, ha permitido comprobar, que existe cierta relación entre el genotipo y la temperatura óptima de crecimiento; de modo que los distintos genotipos se pueden diferenciar en base a la temperatura de incubación a la que se observa efecto citopático. Se ha determinado que las temperaturas óptimas para cada genotipo son: 25–30 °C para el tipo RGNNV, 20–25 °C para SJNNV, 20°C para TPNNV y 15–20 °C para BFNNV (Iwamoto y col., 2000). A pesar de estas temperaturas óptimas; Ciulli y col. (2006b) describieron el crecimiento de un aislado del genotipo RGNNV a temperaturas entre 15 y 30 °C, demostrando que el rango de temperaturas de crecimiento de este genotipo es más amplio de lo que inicialmente se pensaba.

La existencia de aislados recombinantes, cuyo genoma está formado por segmentos de genotipos distintos, ha planteado dudas sobre su sensibilidad hacia la temperatura y ha llevado a profundizar en este tipo de estudios. Hata y col. (2010) tras analizar cepas de los genotipos SJNNV, RGNNV y recombinantes de ambos genotipos generados in vitro, observaron que la región del ARN1 que codifica los aminoácidos 1-445 de la polimerasa viral, es capaz de controlar la capacidad de replicación del virus a determinadas temperaturas. Esto podría

deberse a la modificación de la conformación de la polimerasa o a la intervención en el transporte celular, debido a que en esta región se encuentra una señal de unión a la membrana mitocondrial (Hata y col., 2010). Más recientemente, Panzarin y col. (2014) han descrito la replicación de genotipos RGNNV, SJNNV y recombinantes naturales en células E-11 entre los 15 y 30 °C. Estos autores han destacado una mejor replicación a 30 °C de los genotipos RGNNV y RGNNV/SJNNV frente a los aislados que presentan un ARN1 de tipo SJNNV, lo que indica una gran implicación del ARN1 en la sensibilidad a la temperatura.

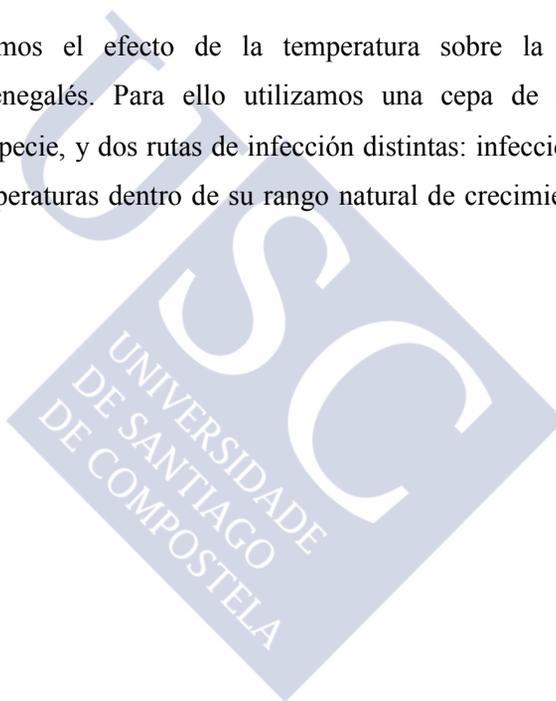
Hasta el momento no se han esclarecido todos los mecanismos implicados en la sensibilidad de los betanodavirus a la temperatura, aunque el ARN1 ha sido señalado como principal responsable, no se ha descartado la posible implicación de la proteína de la cápside (Hata y col., 2010). Se sabe que en otros virus, como el virus Influenza (Lang y col., 2011), la sensibilidad a la temperatura está modulada por la polimerasa viral, modificando la capacidad de replicación del genoma viral (Dalton y col., 2006; Lang y col., 2011). Se han detectado 9 posibles residuos en la subunidad PA de la polimerasa viral del virus Influenza A implicados en la sensibilidad a la temperatura. Se ha visto que cambios en estos aminoácidos reducen la replicación y transcripción de los mutantes a determinadas temperaturas, se cree que interfiriendo en el transporte de la polimerasa al núcleo y/o produciendo cambios en su conformación durante el ensamblaje (Da Costa y col., 2015). También se ha visto que la temperatura interviene modificando la conformación de la proteína de la cápside, influyendo en la capacidad de los virus para unirse a la célula, en la capacidad de los viriones para distribuirse dentro del citoplasma, o interviniendo en la traducción del genoma viral, como se ha visto en el virus de la fiebre aftosa del ganado (Delagneau, 1970). La interacción entre los segmentos genómicos es otro de los factores que podría intervenir en la sensibilidad del virus a la temperatura (Hata y col., 2010); en este sentido, los virus recombinantes son una herramienta muy útil a la hora de arrojar luz sobre este asunto.

Aunque hasta el momento sólo se han producido epizootias de VER en lenguados cultivados a temperaturas de 22-23 °C, sí se ha detectado el virus en poblaciones salvajes (Bandín y col., 2010). Como mencionamos en el segundo capítulo, el cultivo intensivo de esta especie está íntimamente ligado a las poblaciones naturales, debido a la necesidad de introducir stocks procedentes del medio natural. El lenguado senegalés, especie eurihalina y euriterma, se distribuye por la costa Oeste africana y la costa europea del Atlántico y

Mediterráneo Occidental (Dinis y col., 1999). En la naturaleza, se pueden encontrar en un rango de temperaturas que va desde los 13 a los 28 °C (Vinagre y col., 2006). Además de la creciente producción de lenguado de manera intensiva, con un rango de mayor fertilidad entre 15 y 21 °C (Anguis y Cañavate 2005) y temperatura de cultivo en torno a los 20 °C (Imsland y col., 2003), existe cría de esta especie en cultivos semi-intensivos y extensivos, principalmente en esteros distribuidos a lo largo de las costas de la Península Ibérica. Estos peces están expuestos a fluctuaciones de temperatura muy grandes durante el día y grandes variaciones de temperatura anuales que van desde los 12 a los 26 °C (Castro y col., 2012b).

OBJETIVO

En este capítulo abordaremos el efecto de la temperatura sobre la infección de betanodavirus en lenguado senegalés. Para ello utilizamos una cepa de betanodavirus recombinante aislada de esta especie, y dos rutas de infección distintas: infección por baño y cohabitación, ambas a tres temperaturas dentro de su rango natural de crecimiento (22, 18 y 16 °C).



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 CEPA VIRAL Y PROPAGACIÓN

En este capítulo usamos la cepa recombinante Ss160.03 descrita en el capítulo 1. La producción del virus se realizó tal y como se describe en el citado capítulo (Sección 2.2).

2.2 INFECCIONES EXPERIMENTALES

Para realizar las infecciones experimentales se utilizaron lenguados de 1 g de peso medio proporcionados por una piscifactoría comercial. El protocolo seguido desde la llegada de los peces a las instalaciones del acuario de la Universidad de Santiago de Compostela hasta el inicio de los ensayos se corresponde con el descrito en el capítulo 1 en la sección *Aclimatación y manejo de los peces* (Capítulo 1, sección 2.4).

2.2.1 Infección 1. Infección por baño y cohabitación a 22, 18 y 16 °C.

Para este experimento se utilizaron un total de 370 lenguados que se distribuyeron para su adaptación en tres grupos de temperatura: 22, 18 y 16 °C. Una vez adaptados, aproximadamente la mitad de los peces (180) se distribuyeron en 6 tanques de 100 L, a razón de 30 peces/tanque (2 tanques para cada temperatura). Cada grupo se sometió a un baño con la cepa viral Ss160.03 a una concentración de 10^5 TCID₅₀/ml durante 3h. Después de la exposición al virus los peces se devolvieron a sus respectivos tanques, y el inóculo se desechó. Dos días más tarde, se añadieron a cada tanque 30 peces marcados mediante una inyección con azul alcían para que cohabitasen con los peces infectados por baño. Un grupo control de 10 peces (5 bañados con medio L-15 y 5 controles de inyección con azul alcían) se mantuvo durante todo el experimento a cada temperatura.

2.2.2 Infección 2. Infección a baja temperatura (16 °C)

En este experimento se infectaron 90 peces por inmersión a 16 °C, del modo descrito en el apartado anterior, y se mantuvieron durante 50 días a esta temperatura. Para conocer la replicación del virus a diferentes tiempos se sacrificó un grupo de 15 peces cada 10 días (10, 20, 30, 40 y 50 días post infección, d.p.i.). Un control de peces no infectados (n=10) se mantuvo bajo las mismas condiciones.

2.2.3 Infección 3. Efecto del incremento de la temperatura en la susceptibilidad del lenguado

En este experimento 4 grupos de 55 lenguados, denominados GI a GIV, se infectaron por inmersión a 16 °C empleando el mismo procedimiento y concentración viral que en apartados anteriores, considerándose este momento *tiempo 0*. Después de 5 días (GI), 15 días (GII), 30 días (GIII) y 45 días (GIV) se inició un incremento de temperatura hasta los 22 °C, a razón de 1 °C/día. El mismo procedimiento se siguió con 4 grupos de 10 peces control GIc a GIVc. Inmediatamente antes del incremento de temperatura se sacrificaron 15 peces de cada grupo para analizar la carga viral, estos grupos se denominaron LT, de *Low Temperature* (LT5, LT15, LT30 y LT45). Además, como controles se mantuvieron durante todo el experimento a 16 °C un grupo de peces infectados (n=20), y otro de peces no infectados bañados con medio L-15 (n=10).

2.3 PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y AISLAMIENTO VIRAL

El análisis viral se realizó como se describió en el capítulo 1. Brevemente: de todos los peces (muertos o sacrificados) se extrajeron el cerebro y los ojos que se procesaron en lotes de órganos correspondientes a 5 peces, se realizó una dilución 1:5 p/v con tampón de Earle's y se homogeneizó. Los homogeneizados resultantes se emplearon para los análisis posteriores por RT-qPCR y cultivo celular en E-11, siguiendo los procedimientos descritos en el capítulo 1 (Sección 2.5). Tanto los peces muestreados como los supervivientes se sacrificaron empleando una sobredosis de MS-222 (Sigma) para evitar el sufrimiento de los animales, cumpliendo así con lo establecido en la directiva 2010/63/UE.

2.3.1 Extracción del ARN viral y amplificación cDNA

Para la extracción del ARN total se empleó el kit comercial *E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit I* (Omega Bio-Tek) a partir de 0,1 ml de muestra y siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 2 sección 2.6.

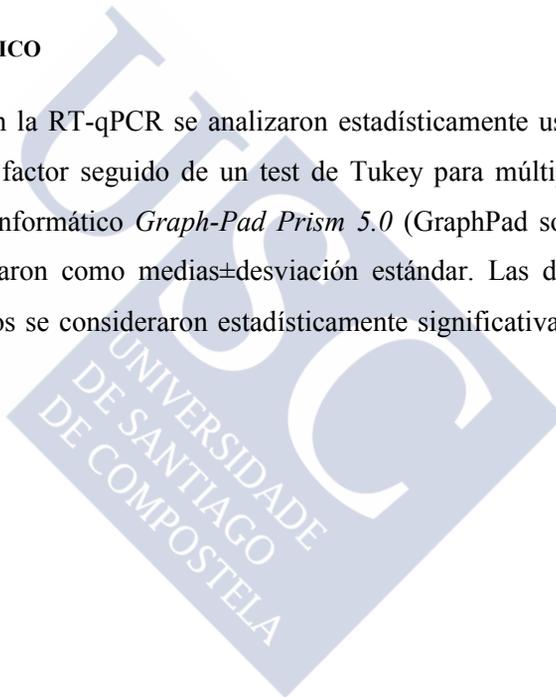
La síntesis de ADNc se realizó a partir ARN viral total extraído empleando el kit *SuperScript[™] III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). La amplificación del ADNc se realizó transfiriendo 3 µl de ADNc, empleando la polimerasa comercial *GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase* (Promega). Ambos procedimientos se realizaron del modo descrito en el capítulo 1 (Sección 2.7 y 2.8).

2.4 CUANTIFICACIÓN DEL GENOMA VIRAL MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-QPCR).

Para la realización de la PCR a tiempo real se realizaron mezclas de reacción con volumen final de 20 μ l. Las mezclas estaban compuestas por 10 μ l de $2\times iQ^{\text{TM}}$ SYBR® *Green Supermix* (Bio-Rad), 0,5 μ l de cada cebador (concentración del stock, 200 nM), y 2 μ l de ADNc. Se emplearon los cebadores SnodR1 F/R descritos por Oliveira y col. (2013). Las muestras se analizaron por duplicado en un termociclador *CFX96TM Real-time PCR detection system* (BioRad) en placas de 96 pocillos, siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 1 (sección 2.11.1).

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en la RT-qPCR se analizaron estadísticamente usando el análisis de varianza ANOVA de un factor seguido de un test de Tukey para múltiples comparaciones empleando el programa informático *Graph-Pad Prism 5.0* (GraphPad software Inc., USA). Los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar. Las diferencias entre los grupos de peces infectados se consideraron estadísticamente significativas en aquellos casos en los que $p < 0,05$



3. RESULTADOS

3.1 INFECCIÓN 1. Infección por baño y cohabitación a 22, 18 y 16 °C.

3.1.1 Curvas de mortalidad

Se registraron mortalidades altas a 22 y 18 °C (Figura 26), mientras que a 16 °C ningún pez murió durante el experimento, ni se detectaron signos clínicos de encefalopatía y retinopatía viral. A 22 °C, en los grupos infectados por baño, las mortalidades alcanzaron el 100% a los 22 d.p.i., y en los grupos cohabitantes a los 20 d.p.i. A 18 °C se registraron mortalidades inferiores, alcanzando el 75% (76,7 en la réplica 1 y 73,3 en la réplica 2) de los peces infectados por baño, y el 78,3% (83,3 réplica 1 y 73,3 réplica 2) de los peces cohabitantes a los 30 días, momento en el que se dio por finalizado el experimento. Se observaron, además, signos típicos de la infección por betanodavirus como falta de apetito y natación anormal en todos los grupos de peces infectados a estas dos temperaturas.

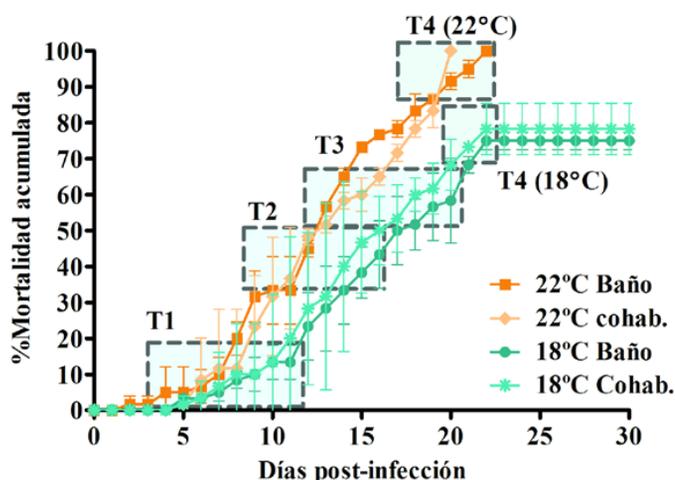


Figura 26 Curva de mortalidad acumulada en peces infectados con el aislado de betanodavirus Ss160.03 (RGNNV/SJNNV) mediante baño a una concentración viral de 10^5 TCID₅₀/ml a 22 °C (cuadrado) y a 18 °C (círculo) y de peces expuestos al virus por cohabitación (Cohab.) a 22 °C (rombo) y a 18 °C (asterisco). A 16 °C no se registraron mortalidades. Las curvas representan la media de dos experimentos distintos y las barras de error. T, fases de la curva de mortalidad elegidas para el análisis mediante cultivo y RT-qPCR: T1, mortalidad de 0 a 16,7 %, T2, desde 33,3 a 50%, T3, desde 50 a 66,7% y T4, desde 83,3 a 100% en los peces a 22 °C y desde los 66,7 a 83,3% a 18 °C.

Todos los lotes de peces muertos analizados resultaron positivos para betanodavirus por RT-qPCR y el virus se pudo re-aislar en cultivo celular. Los peces supervivientes a 18 y 16 °C se sacrificaron al final del experimento y su análisis reveló que también a 18 °C todos los lotes eran positivos para betanodavirus por RT-qPCR y cultivo celular. Sin embargo, de los peces mantenidos a 16 °C solamente se recuperaron partículas infectivas en cultivo de uno de los lotes infectados por baño, aunque todos los lotes se consideraron positivos por RT-qPCR.

3.1.2 Replicación del virus en cerebro

Para la cuantificación del número de copias de ARN1 en cerebro y ojos de los peces muertos se seleccionaron 4 lotes (1 lote= 5 peces) de cada grupo y temperatura. Estos lotes incluyen los primeros peces en morir (T1, mortalidad entre 0 y 16,7%), los últimos peces en morir (T4, mortalidad entre 83,3 y 100% a 22 °C y mortalidad entre 66,7 y 83,3% a 18 °C) y dos lotes de peces muertos entre T1 y T4 (T2, mortalidad entre 33,3 y 50%; T3, mortalidad del 50 al 66,7%) que aparecen representados en la Figura 26. También se analizó 1 lote de peces supervivientes a 18 °C, y todos los lotes de peces supervivientes a 16 °C.

Al cuantificar la carga viral de los distintos lotes de peces infectados a 22 y 18 °C se observó que el número de copias de ARN1 variaba entre $5,5 \times 10^7$ copias/g en el lote T1 de los cohabitantes a 22 °C y $1,3 \times 10^{11}$ en el lote T3 de peces infectados por baño a 18 °C (Figura 27). En estos grupos se observa que al final del experimento (T4) el virus tiende a alcanzar el mismo número de copias independientemente de la ruta de infección y temperatura, llegando a las 10^{10} copias/g. A 16 °C, la media del número de copias detectadas en los peces supervivientes infectados por baño es del orden de $4,9 \times 10^5$ copias/g de tejido. En peces cohabitantes es 1 logaritmo menor ($4,9 \times 10^4$ copias /g de tejido). La carga viral apenas varía entre T1 y T4 en los peces infectados por baño, registrándose valores medios de $5,4 \times 10^9$ a $3,9 \times 10^{10}$ copias/ g de tejido a 22 °C y de $2,1 \times 10^8$ a $7,1 \times 10^{10}$ copias/g de tejido a 18 °C. Por el contrario, se observa un incremento significativo del valor medio del número de copias de T1 a T4 en los grupos de cohabitación: de $1,6 \times 10^7$ a $2,3 \times 10^{10}$ copias/g en el grupo a 22 °C y de $3,8 \times 10^8$ a $2,1 \times 10^{10}$ copias/g en el grupo a 18°C. La carga viral detectada en los peces supervivientes a 18 °C ($3,6 \times 10^{10}$, baño, y $9,8 \times 10^9$ copias/g, cohabitación) apenas difiere de la detectada en los lotes T4 que incluyen a los últimos peces muertos.

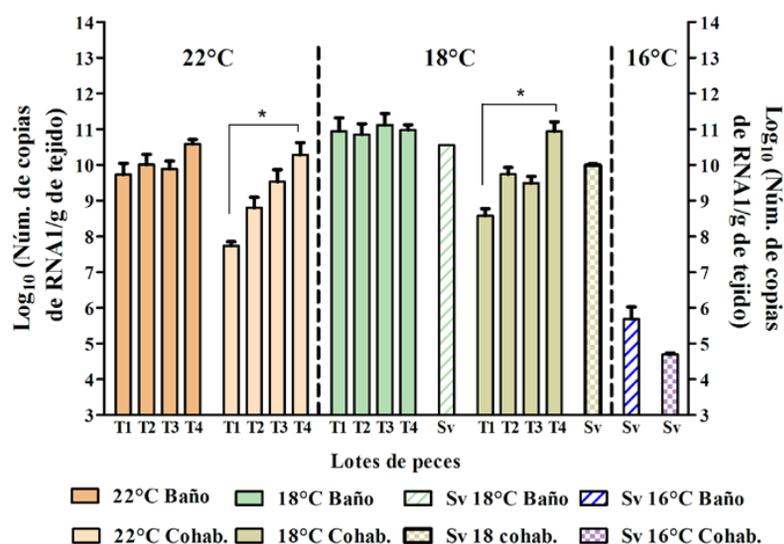


Figura 27 Carga viral detectada en los lotes de peces analizados de la infección 1 a tres temperaturas distintas 22 °C, 18 °C y 16 °C. Replicación del virus en cerebro y ojos detectada por RT-qPCR (log₁₀ copias de ARN1/g de tejido) de peces infectados por baño y cohabitación en cuatro fases la curva de mortalidad (T1, T2, T3 y T4, ver Figura 26) y en peces supervivientes (Sv) a 18 °C y 16 °C. Los datos de copias representan la media y la desviación estándar de dos infecciones. El asterisco indica las diferencias significativas entre los grupos de acuerdo con el test de Tukey (p<0,05).

3.2 INFECCIÓN 2. Infección a baja temperatura (16 °C)

Durante este experimento únicamente se contabilizaron 11 peces muertos, lo que se corresponde con un 8,25% de mortalidad acumulada. No se observaron signos clínicos de VER en los peces durante el experimento. El genoma viral se detectó en todos los lotes analizados en los distintos días de muestreo (10, 20, 30, 40 y 50 d.p.i.) y la carga viral se incrementó ligeramente desde los 10 d.p.i. (valor medio de $3,8 \times 10^8$ copias/g) hasta los 30 d.p.i. (valor medio de $1,0 \times 10^{10}$ copias/g) (Figura 28). A partir de los 30 días el número de copias descendió hasta valores iniciales registrándose valores medios de $7,8 \times 10^8$ copias/g a los 50 d.p.i. El virus se pudo recuperar en cultivo celular en todos los lotes de peces infectados, confirmándose su identidad por RT-PCR. No se observaron signos clínicos en los peces control ni se detectó/aisló el virus.

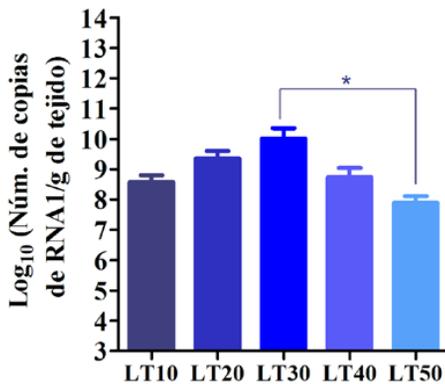


Figura 28 Carga viral detectada en peces de la infección 2 sacrificados a 10, 20, 30, 40 y 50 días después de la infección por baño con la cepa de betanodavirus Ss160.03 (RGNNV/SJNNV) a una concentración viral de 10^5 TCID₅₀/ml a 16 °C. Las barras representan la replicación del virus en cerebro y ojos detectada por RT-qPCR (log₁₀ copias de RNA1/g de tejido). Los datos de copias representan la media y la desviación estándar de 3 lotes de 5 peces. El asterisco indica las diferencias significativas entre los grupos de acuerdo con el test de Tukey ($p < 0,05$).

3.3 INFECCIÓN 3. Efecto del incremento de la temperatura en la susceptibilidad del lenguado

3.3.1 Curvas de mortalidad

Durante este experimento se alcanzaron mortalidades del 100% en todos los grupos en los que la temperatura se elevó hasta los 22 °C (Figura 29). Además, se observaron signos clínicos característicos de ERV: hiperactividad, falta de apetito y natación anormal (peces girando sobre si mismos). A medida que la temperatura fue aumentando, los peces mostraron una hiperactividad inicial a los 4-5 días en GI (incremento de temperatura después de 5 días a 16 °C), y GII (después de 15 días a 16 °C), este comportamiento se observó antes (2-3 días) en los dos grupos restantes (GIII y GIV, a 16 °C durante 30 y 45 días, respectivamente). La falta de apetito se detectó después de 5-6 días en GI y GII, y después de 3-4 días en GIII y GIV. En todos los grupos se observaron peces con natación errática y falta de coordinación transcurridos 5-8 días del inicio del incremento de temperatura. En GI y GII el inicio de la mortalidad se produjo 13 y 10 días después del incremento de la temperatura, respectivamente. En los grupos mantenidos más tiempo a 16 °C la mortalidad se inició antes, 5 días después del incremento de temperatura en el GIII y 4 días en el GIV. En el grupo de peces mantenidos a 16 °C durante todo el experimento murieron 8 peces que se corresponde con un 7,5% de mortalidad acumulada. No se observaron signos clínicos.

El virus se detectó por RT-qPCR y se re-aisló en cultivo celular a partir de todos los lotes de peces analizados (tanto muertos como supervivientes). No se detectaron bajas ni signos clínicos de patología en ninguno de los controles de peces no infectados.

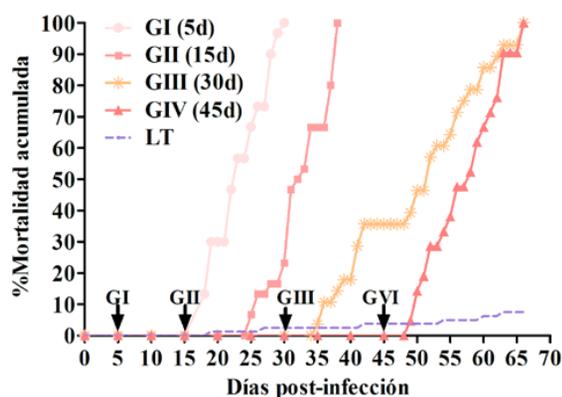


Figura 29 Cinética de mortalidad acumulada en peces infectados con el aislado de betanodavirus Ss160.03 (RGNNV/SJNNV) mediante baño a 16 °C y sometidos posteriormente a un aumento de temperatura hasta los 22°C. Los peces se infectaron con una concentración viral de 10⁵ TCID₅₀/ml y después de 5 días (GI, círculo), 15 días (GII, cuadrado), 30 días (GIII, asterisco) y 45 días (GIV, triángulo) se inició un incremento progresivo de la temperatura (1°C/día) hasta los 22°C. Las flechas muestran el momento en el que se inicia el incremento de temperatura. Un grupo de peces se mantuvo hasta el final del experimento a 16 °C (línea discontinua).

3.3.2 Efecto de la temperatura en la replicación viral en cerebro.

El virus se detectó en todos los lotes de peces mantenidos a 16 °C hasta el final del experimento (66 días), y en los peces sacrificados a los 5, 15, 30 y 45 (LT₅, 15, 30 y 45), lo que confirma la presencia del virus antes del aumento de la temperatura. Se observó que la carga viral en estos peces se incrementó 2,8 logaritmos desde los 5 d.p.i. a los 45 d.p.i. Sin embargo, la carga viral decrece significativamente desde los 45 d.p.i. (media de $2,7 \times 10^9$ copias/g) hasta el final del experimento, con una carga viral media de $6,1 \times 10^7$ copias/g a día 66. Después de incrementar la temperatura a 22°C, el número de copias genómicas detectado en el cerebro de los peces pertenecientes a los distintos grupos (GI a GIV) no mostró diferencias significativas, independientemente de los días que éstos se mantuvieron a 16°C (Figura 30). El número medio de copias por gramo de tejido varió entre $3,0 \times 10^9$ en el grupo

que permaneció a 16 °C durante más tiempo (GIV, 45 d.p.i.) y $2,6 \times 10^{10}$ copias/g en el grupo que estuvo menos días (GI, 5 d.p.i.).

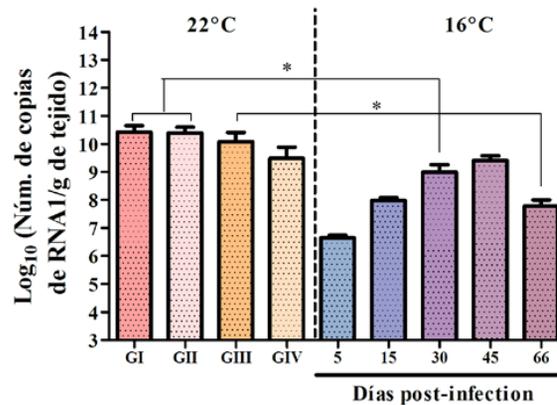


Figura 30 Carga viral detectada en peces de la infección 3 por RT-qPCR (expresado como log₁₀ copias de ARN1/g tejido) en el cerebro y ojos de los peces analizados en lotes de 5 peces. Las barras a la izquierda de la línea discontinua representan la replicación viral (media y DS, n=6) en peces muertos pertenecientes a los grupos de 5 días (GI), 15 días (GII), 30 días (GIII) y 45 días (GIV) a 16 °C y a los que después se le aumentó la temperatura (1°C/día) hasta los 22 °C. GI, peces muertos entre los 18 y 30 días post-infección (d.p.i.); GII, de 25-38 d.p.i.; GIII, peces muertos de 35 a 66 d.p.i. y GIV, entre 49 y 66 d.p.i. (ver Figura 29). A la derecha, las barras representan la carga viral de los peces muestreados a 16 °C analizados a 5, 15, 30 y 45 d.p.i. (media y DS, P=3) y de los supervivientes al final del experimento (66 d.p.i.) a 16 °C (P=3). El asterisco indica las diferencias significativas entre los grupos de acuerdo con el test de Tukey ($p < 0,05$).

Las copias de genoma detectadas en los peces muertos del GI (que se corresponden con mortalidades entre los 18 y 30 d.p.i.) y el GII (mortalidades entre 25 y 38 d.p.i.) fueron más de 1 logaritmo mayores que la media de copias observada en los peces sacrificados a los 30 d.p.i. a 16 °C. El número de copias de ARN1 de los grupos GI y GII fueron de $2,6-2,5 \times 10^{10}$ copias/g frente a las $1,0 \times 10^9$ copias/g detectadas a los 30 d.p.i. En el GIII, grupo que incluye a los peces muertos entre los 25 y 66 d.p.i., la carga viral media se incrementó en 2 logaritmos con respecto a los peces sacrificados a los 66 d.p.i. a 16 °C, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre el GIV, que se corresponde con los peces muertos entre los 49 y 66 d.p.i., y los peces sacrificados a los 66 d.p.i. En los 6 peces muertos a 16 °C, analizados individualmente, se detectó una carga viral entre $5,2 \times 10^7$ y $5,9 \times 10^8$ copias/g, por lo que no alcanzaron valores más altos que los observados en los peces sacrificados.

4. DISCUSIÓN

En este capítulo se ha estudiado el efecto que tiene la temperatura del agua sobre la infección de betanodavirus en lenguado senegalés. Para ello se realizaron infecciones experimentales usando la cepa recombinante Ss160.03, por baño y cohabitación, y a tres temperaturas distintas, dentro del rango en las que se puede encontrar esta especie: 22, 18 y 16 °C. En los distintos experimentos se han analizado la mortalidad y la carga viral presente en el cerebro de los peces infectados.

Los resultados muestran que las mortalidades más elevadas en esta especie se registran a 22 °C, alcanzando en todos los grupos expuestos una tasa del 100%. Al disminuir la temperatura a 18 °C, las mortalidades descienden a 75-80%, mientras que a 16 °C se registró una mortalidad discreta (sobre un 8%). La disminución de la mortalidad con el descenso de la temperatura ya se ha descrito anteriormente en diferentes especies de mero (Tanaka y col., 1998; Nishizawa y col., 2012). La recuperación de partículas infectivas en los grupos cohabitantes demuestra la existencia de transmisión horizontal de betanodavirus en lenguado a las tres temperaturas analizadas. La transmisión horizontal de los betanodavirus se ha descrito anteriormente en infecciones experimentales en jurel dentón, mero manchado y fletán del Atlántico (Arimoto y col., 1993; Totland y col., 1999; Manin y Ransangan 2011), y también en infecciones naturales y experimentales en lubina (Le Breton y col., 1997; Péducasse y col., 1999). También se ha demostrado la transmisión horizontal entre individuos de distintas especies, en condiciones naturales, entre lubina y dorada cultivadas en la misma granja (Castric y col., 2001), y en infecciones experimentales entre rodaballo y bacalao (Korsnes y col., 2012) y entre lubina asiática y mero manchado (Manin y Ransangan 2011). Los resultados de mortalidad en peces expuestos al virus por cohabitación fueron muy similares a los resultados observados en peces infectados por baño, lo que muestra una gran efectividad de la transmisión horizontal. Los niveles de mortalidad recogidos en la bibliografía en peces cohabitantes varían entre un 46% en lubina (Péducasse y col., 1999), 56,7 % en lubina asiática (Manin y Ransangan 2011) y un 100% en mero manchado (Manin y Ransangan 2011). Es interesante resaltar que en nuestro estudio a 22 °C se alcanzó el 100% de mortalidad en los grupo de peces cohabitantes 4 días antes que en los grupos de peces infectados por baño, lo que sugiere que el virus expulsado por los peces infectados resulta más virulento que el virus producido en cultivo celular.

En la infección por baño llevada a cabo a 16 °C se registró una mortalidad muy baja y no se observaron signos clínicos en los peces supervivientes. Tanaka y col., (1998) obtuvieron resultados similares en una infección experimental en mero de pintas rojas. Además se han producido algunos brotes de VER en lubina a bajas temperaturas (entre 14-15 °C) en los que los peces no presentaban signos clínicos externos de patología (Galeotti y col., 1999; Borghesan y col., 2003). En este estudio se pudo detectar la replicación del virus durante todo el experimento hasta los 66 días con una carga viral alta que se incrementa desde el día 10 al 30, alcanza $4,0 \times 10^{10}$ copias/g, y luego decrece hasta las $6,0 \times 10^7$ copias/g de tejido. Estos resultados sugieren el establecimiento de una infección subclínica en la mayoría de los peces infectados. Es conocido que los betanodavirus pueden causar infecciones subclínicas durante largos periodos de tiempo (Gjessing y col., 2009). Además, se han podido aislar partículas infectivas de peces que no presentaban patología externa un año más tarde de haberse producido el brote infeccioso (Johansen y col., 2004b). La existencia de una infección subclínica en los peces mantenidos a 16 °C se confirma por la aparición de signos clínicos compatibles con el desarrollo de encefalopatía y retinopatía viral tras el aumento de la temperatura. En los grupos de peces mantenidos durante 30 y 45 días a 16 °C se observaron signos clínicos e incluso mortalidad antes de que la temperatura alcanzara los 22 °C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las infecciones experimentales realizadas a diferentes temperaturas en las que se produjeron altas mortalidades a 18 °C. La carga viral de los peces muertos en el tercer experimento de los grupos GI, GII y GIII, que registraron un número de copias por encima de 10^{10} copias /g, es comparable con la carga viral obtenida en los peces del primer experimento, en el cual los peces se mantuvieron a 22 °C desde el inicio del experimento, lo que indica que incluso después de 30 días a 16 °C, cuando la temperatura se incrementa, el virus replica hasta alcanzar la carga viral necesaria para desencadenar mortalidades. Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas entre la carga viral de los peces que murieron a 22 °C con signos de patología, después de haber estado 45 días a 16 °C, y los peces que se sacrificaron a los 45 y 66 d.p.i. a 16 °C. Estos resultados parecen indicar que la propia infección subclínica puede debilitar a los peces de manera que un mínimo aumento de la carga viral desencadenaría la patología. De hecho, se ha podido comprobar en estudios histológicos que las infecciones subclínicas de betanodavirus dan origen a lesiones en cerebro y retina en juveniles de bacalao del atlántico (Gjessing y col., 2009).

El estrés producido por el aumento de la temperatura podría ser un factor coadyuvante de la mortalidad que no podemos desestimar, pero sabemos que el lenguado se enfrenta en la naturaleza a grandes fluctuaciones de temperatura que pueden variar desde los 13 °C a los 28 °C (Vinagre y col., 2006), y además, en nuestros ensayos no se produjeron mortalidades ni cambios perceptibles en los peces control que soportaron los mismos procedimientos experimentales. Asimismo, en una investigación realizada por Castro y col., (2012b) los ejemplares de lenguados estudiados no sufrieron mortalidades durante un ensayo que supuso choques térmicos de seis grados de diferencia.

Se sabe que la temperatura juega un papel muy importante en el desarrollo de la infección por betanodavirus (Chi y col., 1999b; Nishizawa y col., 2012; Oh y col., 2013). Algunos autores han comprobado que la temperatura no está implicada en la unión a la célula hospedadora (Chi y col., 1999b; Hata y col., 2010). De hecho, nuestros resultados muestran que todos los grupos de peces, independientemente de la temperatura, resultan infectados por el virus. Sin embargo, si se encontraron diferencias en la carga viral entre los distintos grupos, lo que indicaría que la replicación es un proceso sensible a la temperatura, tal y como se ha descrito anteriormente (Hata y col., 2010; Panzarin y col., 2014). La sensibilidad a la temperatura es un proceso que se cree que está determinado fundamentalmente por el ARN1, específicamente por una región que codifica los aminoácidos 1-445 de la polimerasa viral (Hata y col., 2010). El ARN1 de la cepa recombinante que se usó en este experimento es de tipo RGNNV. Los betanodavirus pertenecientes a este genotipo suelen provocar infecciones a temperaturas de entre 23-25°C en lubina y a 28-30°C en mero (Maltese y Bovo 2007), mientras que la cepa recombinante causa mortalidades en lenguado entre 18-22°C. El análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de la polimerasa viral del recombinante con la cepa SGWak97 (cepa tipo del genotipo RGNNV) reveló la existencia de numerosos cambios aminoacídicos (Oliveira y col., 2009), seis de los cuales estaban localizados en la región descrita por Hata y col., (2010). Estos cambios podrían estar involucrados en la diferencia de comportamiento frente a la temperatura observada entre el recombinante y las cepas RGNNV.



PAPER 4



3. Souto, S., Oliveira, J. G. & Bandín, I. **Influence of temperature on Betanodavirus infection in Senegalese sole (*Solea senegalensis*)**. *Vet. Microbiol.* **179**, 162–167 (2015). Doi: [10.1016/j.vetmic.2015.07.004](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.004)







GENERAL DISCUSSION



An increasing number of studies have reported betanodavirus detection or isolation from Senegalese sole in recent years (Thiéry et al., 2004; Cutrín et al., 2007; Oliveira et al., 2009; Panzarin et al., 2012). According to phylogenetic studies, most of these isolates are reassortant strains exhibiting RGNNV-type RNA1 and SJNNV-type RNA2 segments, which suggests that the reassortment may have promoted the adaptation of the virus to this host species (Oliveira et al., 2009). In the first chapter, Senegalese sole was challenged with three NNV isolates: a reassortant RGNNV/SJNNV isolate (SpSs-IAusc160.03), a SJNNV reference strain (SJNag93) and a RGNNV isolate (ERV378/102-5/04) in order to compare the susceptibility of sole to the reassortant strain and to the two parental strains. Two different routes of infection were tested: waterborne exposure, which better mimics natural NNV infection, and intramuscular injection, which ensures delivery of a standardised viral dose (Péducasse et al., 1999; Skliris and Richards, 1999). According to the results obtained, Senegalese sole was shown to be highly susceptible to the three NNV isolates used in this study, given that 100% mortality was recorded in all infected sole groups. However, some differences were observed in the mortality curve depending on the NNV isolate. In fact, in the bath trials, mortality in the fish challenged with the reassortant strain was observed clearly earlier on (all fish were dead by day 18, versus day 25 and 31 in the SJNNV- and RGNNV-challenged groups, respectively). This difference was not so evident in the i.m. trials (36 d.p.i. in the reassortant-challenged group versus 38-41 in the other groups). Based on this result, it can be suggested that the external barriers of sole (i.e. skin, mucus) could be an important factor in controlling RGNNV infection in this fish species, at least at early stages of infection. Regardless of the infection route, the most severe signs of the disease were recorded in sole challenged with the reassortant isolate, yielding the highest viral titres, and showing fewer differences between the RNA2 copy number and the viral titre.

The results from virological analyses in the first chapter revealed the existence of a statistical correlation between viral RNA copy numbers and viral titres ($P < 0.005$, Spearman test), although, in general, the viral copy numbers were higher than the viral titres. Differences between infective viral particles and the viral genome copy numbers have been previously reported in infections caused by several human viruses (Garcia et al., 2001; Falsey et al., 2003), fish viruses (Purcell et al., 2006; Hope et al., 2010) and higher vertebrate viruses (Achenbach et al., 2004). The differences observed in this assay increased up to 5 and 6 logs, especially in the bath challenges, and in the RGNNV- and SJNNV-challenged groups. Several

explanations have been put forward for the differences between the viral genome copy number and viral titre. Similarly, the differences found for the avian influenza H5N1 virus (Dovas et al., 2010) have been associated to virus inactivation under aquatic environmental conditions. The reported NNV ability to survive for extended periods of time under a wide range of environmental conditions (Frerichs et al., 2000) makes viral inactivation during sample processing unlikely. Another possibility is the loss of viral infectivity in dead tissues (Rosenbergova et al., 2009). In the present work, the overnight degradation of fish tissues when the individuals were found dead the following morning cannot be ruled out. This degradation would probably be more intense in bath-challenged fish, due to their smaller size. Alternatively, defective viral particle production or overexpression of the RNA2, as reported for the S segment of RVFV (Garcia et al., 2001) and BRSV F RNA (Achenbach et al., 2004), could be taking place. The putative overexpression of the RNA2 segment or the generation of defective particles seems to have occurred mainly in RGNNV and SJNNV infections, suggesting a poor adaptation to the host.

In order to investigate the mechanisms that modulate the differences in virulence between the reassortant strain and the parental strains, in the first chapter we also analysed the ability of the three betanodavirus strains to infect brain tissue. The replication of betanodavirus is almost entirely restricted to nerve tissue, preferentially in the brain and retina (Nguyen et al., 1996; Skliris y Richards, 1999) and they spread through the nervous system using the synaptic connections (Ikenaga et al., 2002). In our time course study, the two SJNNV-capsid strains reached the brain after 24 h post-infection, as indicated by the RT-qPCR detection of the viral genome, whereas the RGNNV strain was not detected until day 4 p.i. This would confirm the hypothesis that the RGNNV-type strain, unlike the SJNNV-capsid strains, might find some kind of restraint hampering its entry into the brain. Moreover, infective particles were recovered from strains with the SJNNV-capsid in cell culture at 24 h.p.i. in fish challenged with the SJNNV and at 48 h.p.i. in fish challenged with the reassortant. During the first days of the experimental infection both strains showed a similar viral load. Nevertheless, whereas the viral load of the SJNNV strain remained low throughout the experiment, the recombinant strain increased its viral genome copies reaching 10^9 copies/g and a viral titre of 3.2×10^7 TCID₅₀/g of fish at 10 d.p.i. Interestingly, although RGNNV showed a meaningful delay in reaching the brain in comparison with the other strains, it reached the highest viral load (roughly 2 logs higher than that of the reassortant strain) at the end of the experiment.

These results are in contrast with the low viral titers obtained from dead fish infected with this strain, especially from those sampled after the initial mortality phase. Even though data in the first case were obtained from sacrificed fish and in the second from dead fish, it can be concluded that the RGNNV strain must experiment a reduction in its replication capacity over time. This would explain the delay of RGNNV in causing 100% mortality, compared with the reassortant strain.

The replication of the three viral strains over the 10 days of infection was also analysed in internal organs, gills and skin. The viral genome from the three strains was detected in all the samples analysed from non-neuronal organs and, in general, the viral quantification showed values ranging from 10^4 and 10^6 RNA1 copies/g of tissue. The recovery of infective particles was not as prolific as in brain tissue. In gills, infective particles of ERV378 and SJNag93 were recovered at the beginning of the infection (at 24 and 48 h p.i.), suggesting a possible route of entry into the host. Betanodaviruses have been detected in skin, fin and gills (Azad et al., 2006; Chi *et al.*, 2001b; Lopez-Jimena et al., 2011; Nguyen et al., 1997) and in so far as the horizontal transmission of the virus, some authors have suggested the gills or the skin as possible entry gateways (Grotmol et al., 1997; Mézeth et al., 2007). However, infective particles from the reassortant strain were only re-isolated at 3 d.p.i. in this tissue, suggesting that this could not be the route of entry for this strain.

Infective particles of the three strains were recovered in skin at 24 h (SJNNV), 24-48 h (reassortant) and up to 3 d.p.i. (RGNNV). The presence of the virus replicating in the skin has been previously reported and it has been proposed that the virus enters the medial spinal cord through afferent nerves in the skin and then spreads through the nervous tissues (Nguyen et al., 1996). In a similar way, it has been proposed that IPNV enters turbot through the pores of the lateral-line sense organ (Novoa et al., 1995). The differences between the replication of the three strains in the skin could be attributed to a different penetration route. Whereas the reassortant strain seems to enter the fish exclusively through the skin, RGNNV and SJNNV might use two routes: gills and skin. This could explain the lower replication in skin observed in the fish infected with the SJNNV strain (only recovered at 24 h p.i.). However, the RGNNV strain was present in the skin for more time, until day 3 p.i., which could be due to the detrimental viral entry through this route, confirming the initial hypothesis. On the other hand, infective particles of the three genotypes were recovered in the skin of fish analysed at

8, 9 and 10 d.p.i., when the infection was already established in the brain. This is in accordance with the study carried out by Azad *et al.* (2006) in which betanodavirus replication was observed in musculature near the scale pockets and skin, suggesting a possible escape route of the viral particles.

The virus from the three strains was recovered from pools of internal organs at the end of the infection; SJNNV showed a higher presence in these tissues and was recovered from days 3 and 6 p.i. as well. Virus detection in internal organs could be explained by the existence of virus trapped in immune complexes generated by the defence mechanisms of the fish, as a clearance mechanism process (Húsgard *et al.*, 2001). These findings are in accordance with previous results obtained, in which betanodaviruses have been shown to replicate in viscera and gonads (Azad *et al.*, 2006; Banu *et al.*, 2007; Lopez-Jimena *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 1997).

In conclusion, the results obtained in chapter 1 showed that the reassortant strain provoked the most acute symptoms, and more quickly, especially in the bath challenge. It reached the brain quickly and achieved high levels of replication. This was also the isolate producing more infective particles throughout the whole infective process, as displayed by the highest titres obtained from dead fish, and it showed less difference between the number of RNA copies and viral titre. Taken together, all these data indicate that the reassortant strain is more suited for infecting Senegalese sole than the RGNNV or the SJNNV isolates

The viral factors that contribute to the pathogenicity and virulence of betanodavirus have not been clearly characterized yet. It has been reported that host specificity is controlled by RNA2 and/or its encoded coat protein (CP) (Ito *et al.*, 2008; Iwamoto *et al.*, 2004) and the protruding positions in the C-terminal region (residues 238 to 340 in SJNNV) have been considered good candidates for host specificity determinants (Iwamoto *et al.*, 2004). The reassortant isolate exhibits a slightly modified SJNNV CP, with two amino acid substitutions in the C-terminal domain compared to the SJNNV parental genotype (Oliveira *et al.*, 2009). It is known that a small number of amino acid substitutions in the coat proteins can have dramatic effects on the host specificity of different animal viruses (Baranowski, 2001). In addition, previous studies at our laboratory indicate that amino acids at positions 247 and 270 of the capsid of reassortant strains (RGNNV/SJNNV) might be putative determinants that have broadened the spectrum of host fish (Oliveira *et al.*, 2009).

In the second and third chapters, we analysed the role of these two residues (247 and 270) as putative host and virulence determinants of betanodavirus reassortant strains. For that purpose, recombinant betanodaviruses were produced in transfected BSRT7/5 cells by a DNA-based reverse genetics system as previously described (Takizawa *et al.*, 2008b), given that this approach has been widely used to identify the determinants of virulence in RNA viruses such as Influenza virus (Horimoto & Kawaoka, 1994; Lycett *et al.*, 2009), Lujo virus (Bergeron *et al.*, 2012), West Nile virus (Diamond, 2009), alphanodavirus (Ball & Johnson, 1999) and fish RNA viruses (Biacchesi, 2011). Three recombinant viruses harbouring site-specific mutations in the capsid sequence rSs160.03₂₄₇ (Ser→Ala), rSs160.03₂₇₀ (Ser→Asn), and rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ were generated using a reverse genetic system. These recombinant viruses were studied in cell culture and *in vivo* in the natural fish host and later on in turbot.

When the effect of the amino acid substitutions on fish pathogenicity was evaluated in Senegalese sole, as described in the second chapter, typical clinical signs of betanodavirus infection were observed in all groups, questioning that residues 247 and 270 may act as host determinants. However, in the groups infected with the mutant viruses, clinical signs were only observed from day 3 p.i. to days 15-20. p.i., whereas in the fish infected with the wild-type virus, these signs lasted throughout the experiment (35 days). In addition, in the fish challenged with the mutant viruses, when clinical signs disappeared, mortalities ended shortly after and roughly 40% of the fish survived. However, in sole challenged with the wild-type strain, mortalities reached 100%. The lower cumulative percentage of mortality induced by mutant viruses could be due to a slower spread in the fish host, as supported by the data of viral replication in the brain of infected sole. Indeed, throughout the 10 days of the experiment, a gradual and continuous increase of the wild-type virus RNA1 copy number was observed, while the RNA1 copy number for the recombinant viruses reached a plateau at day 5. It has been previously shown that the region from residues 217 to the C-terminus is displayed at the outer surface of the capsid and therefore may be involved in the interaction with the cell surface (Tang *et al.*, 2002). It can be speculated that these amino acid changes (247 and 270) at the viral surface might modify the affinity of the virus for cellular receptors, thus affecting virus spread kinetics. As an example it has been reported that a single residue at position 226 of the hemagglutinin receptor binding domain of influenza virus could change the binding recognition of the sialic receptors (Zhang *et al.*, 2013). Moreover, virus spread efficiency has been reported to be a critical determinant for neurovirulence for different

animal viruses, like polytropic murine retrovirus (Robertson *et al.*, 1997), rabies virus (Dietzschold *et al.*, 1985) and sindbis virus (Lee *et al.*, 2002).

Unfortunately, the *ex vivo* experiments were shown to be insufficient to study the capsid interaction with the host cells. Cell culture experiments performed indicated that there was no effect of the amino acid change on the growth curve of the viruses when compared with the rSs160.03 and the wild strain. Because SSN-1 and E-11 cells are susceptible to the 4 betanodavirus genotypes, no difference would be expected in the replication of rSs160.03₂₄₇, rSs160.03₂₇₀, rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ on E-11 cells, since the change of one or two amino acids makes Ss160.03 more similar to the SJNNV genotype. The differences with the *in vivo* experiments might be due to the receptors on the cell surface. It has been reported that sialic acid is involved in the binding of betanodavirus to SSN-1 cells (Liu *et al.*, 2005) and therefore to E-11, which are a clone of SSN-1 (Iwamoto *et al.*, 2000). Although until present there is no data regarding the neuronal receptors that mediate entry of betanodavirus in fish brains, it is quite probable that these neuronal receptors are different to those present in SSN-1, because this cell line was derived from a whole snakehead fry tissue (Frerichs *et al.*, 1991). For example, it has been reported that most of the fixed rabies virus laboratory strains have acquired the ability to use ubiquitous receptors that are present on the surface of non-neuronal cell types, which are different from the neuronal receptors used to propagate within the nervous system (Seganti *et al.*, 1990).

In conclusion, in chapter 2 we demonstrated that two amino acid residues in the C-terminus of the capsid protein of betanodavirus play a major role in betanodavirus pathogenicity. Virulent natural reassortant strains have a Ser at both 247 and 270 residues position, when these amino acids were substituted by an Ala and Asn at 247 and 270 positions, respectively, attenuated recombinant viruses were generated. Nevertheless, other motifs must be involved in virulence because these changes were not sufficient enough to yield a totally attenuated virus. Oliveira *et al.* (2009) described a third change in the capsid protein sequence of the reassortant strains located in the N-terminal region (position 20), that must be considered. This region has been associated with virus assembly and RNA packaging (Tang *et al.*, 2002). We have also observed differences in the 3' non coding region (NCR) of both genomic segments of Ss160.03 with respect to the genotypes SJNNV and RGNNV. It is known that NCRs may play an important role in virulence, presumably through its effects on

genome translation, replication or transcription. The importance of a single change in the 3'NCR has been reported in Influenza A strains and related to regulation of protein expression (Wang & Lee, 2009).

Betanodavirus interspecies transmission has been reported (Korsnes et al., 2012; Manin and Ransangan, 2011) and represents a risk for any susceptible fish species inhabiting the same area as an NNV infected fish. In our area, Senegalese sole is closely related with turbot (*Scophthalmus maximus*) farming. In order to evaluate the possible risk of betanodavirus transmission between sole and turbot, we assessed the susceptibility of turbot to the SpSs-IAusc160.03 isolate originated from Senegalese sole. Experimental infections were carried out in turbot in the third chapter, in which the susceptibility of turbot juveniles to the reassortant strain and to a SJNNV-type strain was assessed at two different temperatures, 16 °C (turbot rearing temperature) and 18 °C (the highest water temperature reached in summer in our area, which is more appropriate for betanodavirus growth). At 18 °C, moderate levels of mortality (up to 50%) were caused by the reassortant strain Ss160.03, whereas low levels of mortality (17%) were observed in the SJNNV-challenged group. Mortality in bath challenged turbot using the same SJNNV strain was not recorded by Húsgard et al. (2001), but differences in fish size (mean 4.3 g versus 2 g) and duration of bath exposure (1 h versus 3 h) could account for the different results. At 16 °C, low mortalities were observed in both groups. These results are in agreement with subsequent observations in sole (chapter 4) and with those reported by Nishizawa et al. (2012) and Tanaka et al. (1998), who observed a decrease in mortality by reducing rearing temperature in different grouper species. The analysis of viral replication indicated that the number of viral copies was always higher in the dead fish challenged with the reassortant strain (almost two logs at 18 °C and 16 °C). However, the results obtained from the survivors showed a similar level of replication of both isolates at both temperatures. It is interesting to note that the reassortant strain, harbouring a SJNNV capsid with slight modifications (2 amino acid substitutions with respect to SJNag93) caused a mortality level 30% higher than that caused by the SJNag93 strain at 18 °C in turbot. In order to study if the differences in the mortality levels were due to the change of the two amino acid positions, experimental infections were performed with the recombinant viruses harbouring the site-specific mutations generated in chapter 3. The results obtained indicated that the mutation of each amino acid (S247A or S270N) had a slight effect on the mortality of turbot juveniles (a 10% reduction in both cases). However, the mutation of both positions

reduced mortality more than half of that observed in fish challenged with the wild strain. These findings are in agreement with the poor initial replication of the recombinant virus harbouring both mutations which was not detected in the brain until 20 d.p.i., whereas the wild strain was detected at 5 d.p.i. In addition, the wild-type strain showed a sustained increase from 5 to 15 d.p.i. reaching up to 1.4×10^9 copies/g (although thereafter it showed a decrease), whilst the viral load of the mutant strain was roughly 10^6 copies/g. In the time course experiment performed at 16 °C, although the difficulties to replicate were evident for all the strains, the wild-type strain was detected at 10 and 15 d.p.i. However, the strain showing both mutations was not detected at any sampling time.

Data provided in chapter 2 demonstrate that capsid modifications displayed by the reassortant strain, putatively linked to the host shift event, allow it to provoke very high mortalities and to replicate better than parental strains in Senegalese sole. In addition, in chapter 3 reassortant virus has been shown to be more pathogenic for turbot than the SJNNV genotype and although the mutation of each amino acid had a slight effect on the mortality of turbot a synergistic effect of both amino acid substitutions was evident and mortality was reduced by more than half of that observed in fish challenged with the wild strain.

It is interesting to note the different effect caused by the mutation of both amino acid substitutions in sole and turbot challenges. In sole, the mutation of both amino acid positions did not lead to a further attenuation of the recombinant virus, whereas a clear attenuation was observed in turbot infection. Both residues are probably located in the surface-protruding domain of the capsid, reported to form 60 protrusions (Tang et al., 2002). The simulation of the secondary structure of the capsid performed in chapter 3 indicated that the substitution at position 247 from serine to alanine caused a shortening in the coil between two β -strands, whereas the substitution at position 270 from serine to asparagine led to a small β -turn, this means that the secondary structure elements combined in a super-secondary structure. It has been postulated that these amino acidic positions, as well others that have been changed in the capsid of the reassortant strain with respect to the SJNag93 capsid, could have favoured sole colonization (Oliveira et al., 2009). Following this hypothesis this modified capsid would provide a better interaction with the sole cells and therefore the substitution of any of the modified amino acids would have a considerable effect on virulence, as demonstrated in chapter 2. However, this interaction seems to be much less efficient in turbot, probably

because the receptors are different which may have had a significant effect in the virulence (moderate mortalities caused by the wt strain up to 50%). In this context, the modification of one amino acidic position does not seem to have a significant effect on virulence and it would be necessary for both positions to be modified in order to cause such effect. It has been postulated that in other neurotropic virus, such as Sindbis virus, the changes in the glycoprotein can affect their ability to invade the nervous system (Lustig et al., 1988). It can be suggested that the mutations have altered the affinity to the cellular receptors in turbot, which is already low, and therefore affecting the kinetics of virus replication, probably leading to a different tropism of the virus. Further studies with detection of the recombinant strains in other tissues could help to clarify this hypothesis.

Other important factors are involved in virus virulence and pathogenicity, so it is interesting to analyse the effect of stress on the replication of the wt strain and the different recombinant strains observed in chapter 3. It has been suggested that stress conditions could favour betanodavirus replication in non-nervous tissues such as gonads (Arimoto et al., 1992), nevertheless so far it was not documented if stress could improve viral replication in the brain. First of all, it is important to note that although 100% mortality was observed in the four groups of infected fish, the group challenged with the recombinant rSs160.03₂₄₇₊₂₇₀ showed acute mortalities in a single day and the virus was not recovered in cell culture, indicating that mortalities were not caused by the viral strain. Regarding the other strains, the replication of the wt strain was clearly favoured by stress because mortalities were first observed in fish challenged with this strain, and although the strain was not recovered from the first pool of dead fish it was re-isolated from the remaining pools. Recombinants rSs160.03₂₄₇ and rSs160.03₂₇₀ also seemed to increase their replication but only to a certain extent, because viral recovery was only achieved from the first pools of dead fish. These results confirm that stress increases the replication of betanodavirus in the nervous tissues, but further studies will be necessary to determine the mechanisms involved and the importance of this factor in betanodavirus replication.

In the fourth chapter, we evaluated the effect of the temperature on betanodavirus infection on sole. Experimental infections of sole juveniles were performed at 22 °C, 18 °C and 16 °C by bath challenge and cohabitation. The results from the bath challenge indicated that the reassortant strain caused 100% mortality at 22 °C, whereas at 18 °C values were slightly

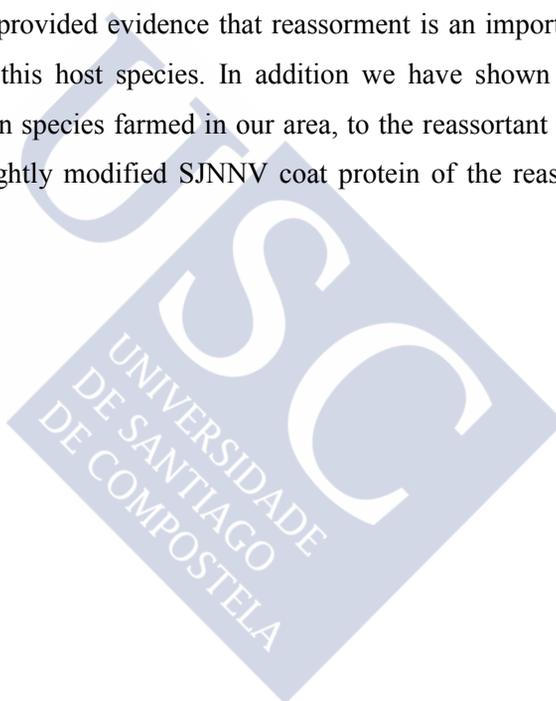
lower, roughly 75-80% and very low mortality was obtained at 16 °C (around 8%). The high susceptibility of Senegalese sole to infection with betanodavirus at 22 °C has been demonstrated in chapters 1 and 2. The observed decrease in the mortality level at 18 °C and 16 °C was consistent with the results obtained previously in different grouper species (Tanaka et al., 1998; Nishizawa et al., 2012), also observed in chapter 3 in turbot infection. The susceptibility of Senegalese sole to betanodavirus infection by cohabitation at the three temperatures tested provided evidence for horizontal transmission in this fish species. Horizontal transmission of VER has been reported in striped jack, brown-marbled grouper and Atlantic halibut in experimental infections (Arimoto et al., 1993; Totland et al., 1999; Manin and Ransangan, 2011) and in sea bass in natural and experimental conditions (Le Breton et al., 1997; Péducasse et al., 1999). Furthermore, interspecies horizontal transmission has been observed between sea bass and sea bream cultured at the same farm (Castric et al., 2001) and in experimental trials between turbot and cod (Korsnes et al., 2012) and between Asian seabass and brown-marbled grouper (Manin and Ransangan, 2011). In the present study, mortality levels recorded in the cohabiting groups at 22 and 18°C were almost identical to those observed in the bath challenged fish, indicating a high effectiveness of horizontal transmission. Levels of mortality reported in other cohabitation experiments ranged from 46% in sea bass (Péducasse et al., 1999) and 56.7% in Asian sea bass (Manin and Ransangan, 2011) to 100% in brown-marbled grouper (Manin and Ransangan, 2011). It is interesting to point out that at 22°C, 100% mortality was achieved in the cohabitants 4 days earlier than in the bath challenged fish. This finding suggests that the virus scattered from infected fish was more virulent than the original tissue culture-grown virus. In the immersion challenges performed in this study at 16 °C a very low level of mortality was obtained and no clinical signs were observed in the surviving fish. Similar results were obtained by Tanaka et al. (1998) in an experimental infection in redspotted grouper and some VER outbreaks have been reported in sea bass at temperatures between 14-15 °C, with the affected fish showing few or no clinical signs (Galeotti et al., 1999; Borghesan et al., 2003). In addition, viral replication was recorded up to 66 d.p.i. (with high viral loads that increased from 10 to 30 d.p.i. up to 1.0×10^{10} and then decreased to 6×10^7 copies/ g tissue). These results suggest the establishment of a subclinical infection in most of the infected fish. The capacity of betanodavirus to cause subclinical infections for long periods of time has been previously reported (Gjessing et al., 2009) and viral infectious particles have been isolated from

apparently healthy infected fish one year after an outbreak (Johansen et al., 2004b). The establishment of a subclinical infection at 16°C is supported by the fact that the fish developed VER after a temperature increase. Infected fish maintained at 16 °C for 30 and 45 days started to show characteristic clinical signs and mortalities before the temperature reached 22 °C. These results are in accordance with the high mortalities obtained in the immersion challenges at 18 °C. It is interesting to note that the virus load in dead fish from groups maintained at 16°C for 5, 15 and 30 days and then subjected to temperature increase up to 22°C (viral load above 10¹⁰ RNA1 copies/g) is comparable with that obtained in fish that died in the trial in which the animals were maintained at 22 °C since the beginning, indicating that even after 30 days at 16°C, when the temperature increases, the virus easily reaches the necessary viral load to cause mortalities. On the other hand, no significant differences were observed in the viral load among the fish that died with signs of the disease at 22°C after spending 45 days at 16°C and those killed after 45 and 66 days at 16°C. These results could indicate that fish fitness was lessened because of the subclinical infection and minimal changes in the viral load could develop the pathology. Similarly, previous reports indicate that subclinical infections can cause lesions in the brain and retina of juvenile Atlantic cod (Gjessing et al., 2009). In chapter 3 we observed that stress favours betanodavirus replication in brain and mortalities in turbot. In the present study, the stress suffered by the fish derived from the temperature increase cannot be ruled out as a co-factor in the mortality. However, it is known that Senegalese sole face great temperature fluctuations in natural conditions (between 13 and 28 °C) (Vinagre et al., 2006), and no mortalities were recorded during the acute thermal shocks undergone in changes of six degrees in an experimental trial (Castro et al., 2012b). Moreover, no remarkable changes were observed in the control groups which underwent the same temperature increases.

Temperature plays an important role in betanodavirus infection (Chi et al., 1999b; Nishizawa et al., 2012; Oh et al., 2013). Some experiments have revealed that temperature has no effect on betanodavirus attachment to host (Chi et al., 1999b; Hata et al., 2010). In fact, our results show that all the challenged fish became infected whatever temperature they were maintained at. Nevertheless, differences were found in the virus replication which support that betanodavirus replication is a temperature-sensitive process, as previously reported (Hata et al. 2010, Panzarin et al 2014). Temperature sensitivity is supposed to be controlled by RNA1 and more specifically by the region encoding the amino acid residues 1-445 (Hata et al.,

2010). The reassortant strain has a RNA1 RGNNV type. RGNNV strains are reported to cause disease at temperatures from 23-25°C (in sea bass) to 28-30°C (in different grouper species) (Maltese and Bovo, 2007) and the reassortant strain causes high mortality in sole from 18 to 22°C. However, the comparative analysis of the coding sequences of the RNA1 of the reassortant strain and the SGWak97 strain (RGNNV type strain) revealed the existence of amino acidic changes (Oliveira et al., 2009), six of them located in the region described by Hata et al. (2010). These changes could be involved in the different temperature sensitivity of the reassortant strain.

To conclude, in this thesis we have demonstrated the high susceptibility of Senegalese sole to betanodavirus infection and provided evidence that reassortment is an important feature in the adaptation of the virus to this host species. In addition we have shown the moderate susceptibility of turbot, the main species farmed in our area, to the reassortant betanodavirus and the involvement of the slightly modified SJNNV coat protein of the reassortant in the infection of this species.





CONCLUSIONES



1. La cepa recombinante natural está mejor adaptada para infectar el lenguado senegalés que las cepas tipo RGNNV o SJNNV porque causó mucho antes el 100% de mortalidad y provocó los signos clínicos más agudos, y más rápido, especialmente en la infección por baño. Además, llegó al cerebro con rapidez y alcanzó altos niveles de replicación. Asimismo, fue el aislado que produjo más partículas infectivas durante todo el proceso infectivo, como indican los altos títulos obtenidos a partir de los peces muertos, y el que mostró menos diferencias entre el número de copias de ARN y título viral.
2. Dos aminoácidos localizados en la región carboxilo terminal de la proteína de la cápside de la cepa recombinante desempeñan un papel fundamental en la virulencia para el lenguado. La sustitución de la Serina en las posiciones 247 y 270, por Alanina y Asparagina, respectivamente, llevó a la obtención de virus recombinantes atenuados. Sin embargo, otros motivos deben de estar implicados en la virulencia, ya que estos cambios no fueron suficientes para provocar una atenuación total.
3. Se ha demostrado la susceptibilidad moderada del rodaballo a la cepa recombinante natural, que fue más virulenta que la cepa del genotipo SJNNV. Las interacciones entre el virus y los receptores celulares parecen ser diferentes en rodaballo y lenguado, porque las mutaciones de los aminoácidos de la cápside implicados en la patogenicidad para lenguado (S247A or S270N) tuvieron sólo un ligero efecto en la mortalidad en rodaballo (reducción del 10% en ambos casos). Sin embargo, la mutación de las dos posiciones redujo la mortalidad más del 50% con respecto a los peces infectados con la cepa salvaje.
4. Se ha demostrado la transmisión horizontal de betanodavirus en lenguado a tres temperaturas (22, 18 y 16 °C).
5. La cepa recombinante natural puede causar una infección persistente en lenguado a bajas temperaturas (16 °C) durante largos períodos de tiempo, y cuando la temperatura se incrementa el virus es capaz de iniciar una infección aguda y provocar altas mortalidades.
6. La temperatura es un factor importante para controlar la infección por betanodavirus tanto en lenguado como en rodaballo, porque en las infecciones experimentales se observa un descenso de la mortalidad al reducir la temperatura.





CONCLUSIONS





1. The reassortant strain is more suited for infecting Senegalese sole than the RGNNV or the SJNNV isolates because it caused 100% mortality earlier and provoked the most acute clinical signs, and more quickly, especially in the bath challenge. It reached the brain quickly and achieved high levels of replication. This was also the isolate producing more infective particles throughout the whole infective process, as displayed by the highest titres obtained from dead fish, and the one showing less difference between the number of RNA copies and viral titre.
2. Two amino acid residues in the C-terminus of the capsid protein of the reassortant strain play a major role in the betanodavirus pathogenicity for sole. Virulent natural reassortant strains have a Serine at both 247 and 270 residues position, when these amino acids were substituted by an Alanine and Asparagine at 247 and 270 positions, respectively, attenuated recombinant viruses were generated. Nevertheless, other motifs must be involved in virulence because these changes were not sufficient enough to yield a totally attenuated virus.
3. Moderate susceptibility of turbot to the reassortant virus has been shown, and this strain has proved to be more pathogenic for turbot than SJNNV genotype. Interactions between virus and fish cell receptors seem to be different in turbot and sole, because mutation of each of the two amino acid positions of the capsid involved in pathogenicity for sole (S247A or S270N) had a slight effect on the turbot mortality (a 10% reduction in both cases). However, mutation of both positions reduced mortality by more than half of that observed in fish challenged with the wild strain.
4. Horizontal transmission of betanodavirus has been demonstrated in Senegalese sole at three temperatures, 22, 18 and 16 °C.
5. The reassortant betanodavirus strain can cause a persistent infection in Senegalese sole at low temperatures (16 °C) for long periods of time, and when temperature increases the virus is able to trigger an acute infection and provoke high mortalities.
6. Temperature is an important factor in controlling betanodavirus infection in both sole and turbot because in the experimental challenges performed with these fish species a decrease in mortality was observed by decreasing the rearing temperature.





BIBLIOGRAPHY



- Aamelfot, M., Dale, O. B. & Falk, K. (2014).** Infectious salmon anaemia-pathogenesis and tropism. *J Fish Dis* **37**, 291–307.
- Achenbach, J. E., Topliff, C. L., Vassilev, V. B., Donis, R. O., Eskridge, K. M. & Kelling, C. L. (2004).** Detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus using real-time quantitative RT-PCR and quantitative competitive RT-PCR assays. *J Virol Methods* **121**, 1–6.
- Adachi, K., Ichinose, T., Watanabe, K., Kitazato, K. & Kobayashi, N. (2008).** Potential for the replication of the betanodavirus redspotted grouper nervous necrosis virus in human cell lines. *Arch Virol* **153**, 15–24.
- Ahlquist, P., Noueir, A. O., Lee, W.-M., Kushner, D. B. & Dye, B. T. (2003).** Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* **77**, 8181–6.
- Ahne, W., Bjorklund, H. V, Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G. & Winton, J. R. (2002).** Spring viremia of carp (SVC). *Dis Aquat Organ* **52**, 261–72.
- Alonso, M. C., Cano, I., Garcia-Rosado, E., Castro, D., Lamas, J., Barja, J. L., Borrego, J. J. & Bergmann, S. M. (2005).** Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot sea bream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich). *J Fish Dis* **28**, 221–8.
- Alonso, M. C., Ferro, P., Garcia-Rosado, E., Cano, I., Lang, T., Bergmann, S. M. & Borrego, J. J. (2007).** Comparison of Lymphocystis Disease Virus (LCDV) isolates obtained from different marine fish species and geographical areas. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* **27**, 157–164.
- Anbalagan, S., Cooper, E., Klumper, P., Simonson, R. R. & Hause, B. M. (2014).** Whole genome analysis of epizootic hemorrhagic disease virus identified limited genome constellations and preferential reassortment. *J Gen Virol* **95**, 434–441.
- Anguis, V. & Cañavate, J. P. (2005).** Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* **243**, 133–145.
- APROMAR. (2014).** La acuicultura en España. *APROMAR – ESACUA – OPP - Fund OESA*.
- Ariel, E., Holopainen, R., Olesen, N. J. & Tapiovaara, H. (2010).** Comparative study of ranavirus isolates from cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Psetta maxima*) with reference to other ranaviruses. *Arch Virol* **155**, 1261–71.

- Arimoto, M., Mori, K., Nakai, T., Muroga, K. & Furusawa, I. (1993).** Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *J Fish Dis* **16**, 461–469.
- Arimoto, M., Maruyama, K. & Furusawa, I. (1994).** Epizootiology of viral nervous necrosis (VNN) in striped jack. *Fish Pathol* **29**, 19–24.
- Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroge, K. & Furusawa, I. (1992).** Detection of Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Fish Pathol* **27**, 191–195.
- Aspehaug, V., Devold, M. & Nylund, A. (1999).** The phylogenetic relationship of nervous necrosis virus from halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* **19**, 196–202.
- Athanassopoulou, F., Billinis, C. & Prapas, T. (2004).** Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp. *Dis Aquat Organ* **60**, 247–52.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. & Struhl, K. (1995).** *Current Protocols in Molecular Biology*. (John Wiley and sons; INC, Ed.). New York, N.Y.
- Azad, I. S., Shekhar, M. S., Thirunavukkarasu, A. R., Poornima, M., Kailasam, M., Rajan, J. J. S., Ali, S. A., Abraham, M. & Ravichandran, P. (2005).** Nodavirus infection causes mortalities in hatchery produced larvae of *Lates calcarifer*: first report from India. *Dis Aquat Organ* **63**, 113–8.
- Azad, I. S., Jithendran, K. P., Shekhar, M. S., Thirunavukkarasu, a. R. & de la Pena, L. . (2006).** Immunolocalisation of nervous necrosis virus indicates vertical transmission in hatchery produced Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch)—A case study. *Aquaculture* **255**, 39–47.
- Ball, L. A., Hendry, D. A., Johnson, J. E., Rueckert, R. R. & Scotti, P. D. (2000).** Family Nodaviridae. In *Virus Taxon Seventh Rep Int Comm Taxon Viruses*, pp. 747–755. Edited by M. Regenmorte, C. Fauquet, D. Bishop, E. Carstens, M. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, M. Mayo, D. McGeoch, y col. San Diego: Academic Press.
- Ball, L. A. & Johnson, K. L. (1999).** Reverse Genetics of Nodaviruses. *Adv Virus Res* **53**, 229–244.
- Ball, L. A. (1997).** Nodavirus RNA Recombination. *Semin Virol* **8**, 95–100.

- Bandín, I., Rivas, C., Noya, M., Cutrín, J. M., Barja, J. L. & Dopazo, C. P. (1995).** Isolation of a new aquareovirus from gilthead sea bream cultured in Galicia (NW Spain). *Bull Eur Ass Fish Pathol* **15**, 157–159.
- Bandín, I., Oliveira, J. G., Borrego, J. J., Dopazo, C. P. & Barja, J. L. (2006).** Susceptibility of the fish cell line SAF-1 to betanodavirus. *J Fish Dis* **29**, 633–636.
- Bandín, I., Souto, S., Cutrín, J. M., López-Vázquez, C., Oliveira, J. G., Esteve, C., Alcaide, E. & Dopazo, C. P. (2014).** Presence of viruses in wild eels *Anguilla anguilla* L, from the Albufera Lake (Spain). *J Fish Dis* **37**, 597–607.
- Bandín, I., Areoso, E., Cutrín, J. M., Oliveira, J. G., Lopez-Vazquez, C., Lago, M., Souto, S. & Dopazo, C. P. (2010).** Occurrence of infectious Pancreatic necrosis virus (IPNV), viral septicaemia haemorrhagic virus (VHSV) and betanodavirus in wild fish from the Galician coastal water (N.W. Spain): a three years study. In *8th Int Symp Viruses Low Vertebr*, pp. 65–66. Santiago de Compostela, Spain.
- Banu, G. R., Mori, K., Arimoto, M., Chowdhury, M. B. R. & Nakai, T. (2004).** Portal entry and progression of betanodavirus causing viral nervous necrosis in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Bangladesh J Vet Med* **2**, 83–87.
- Banu, G. R., Mori, K., Arimoto, M. & Nakai, T. (2007).** Fate of Betanodaviruses in the experimentally infected natural and non-natural host. *Bangladesh J Microbiol* **24**, 100–104.
- Baranowski, E. (2001).** Evolution of cell recognition by viruses. *Science (80-)* **292**, 1102–1105.
- Barja, J. L., Magariños, B., Romalde, J. L. & Toranzo, A. E. (2009).** Present and future aquaculture vaccines against bacterial fish diseases. In *Vet drugs vaccines Mediterr Aquac*, pp. 155–176. Edited by B. Rogers, C. Basurco. Zaragoza : CIHEAM: Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens.
- Barker, D. E., MacKinnon, A.-M., Boston, L., Burt, M. D. B., Cone, D. K., Speare, D. J., Griffiths, S., Cook, M., Ritchie, R. & Olivier, G. (2002).** First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Dis Aquat Organ* **49**, 99–105.

- Baud, M., Cabon, J., Salomoni, A., Toffan, A., Panzarin, V. & Bigarré, L. (2015).** First generic one step real-time Taqman RT-PCR targeting the RNA1 of betanodaviruses. *J Virol Methods* **211**, 1–7.
- Bejar, J., Borrego, J. J. & Alvarez, M. C. (1997).** A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* **150**, 143–153.
- Bellance, R. & Gallet de Gaint-Aurin, D. (1988).** L'encéphalite virale du loup de mer. *Caraibes Med*, **2**, 105–114.
- Bergeron, É., Chakrabarti, A. K., Bird, B. H., Dodd, K. a, McMullan, L. K., Spiropoulou, C. F., Nichol, S. T. & Albariño, C. G. (2012).** Reverse genetics recovery of Lujó virus and role of virus RNA secondary structures in efficient virus growth. *J Virol* **86**, 10759–10765.
- Biacchesi, S., Thoulouze, M. I., Béarzotti, M., Yu, Y. X. & Brémont, M. (2000).** Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes. *J Virol* **74**, 11247–11253.
- Biacchesi, S. (2011).** The reverse genetics applied to fish RNA viruses. *Vet Res* **42**, 12. BioMed Central Ltd.
- Bigarré, L., Cabon, J., Baud, M., Heilmann, M., Body, A., Lieffrig, F. & Castric, J. (2009).** Outbreak of betanodavirus infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in fresh water. *J Fish Dis* **32**, 667–673.
- Bitchava, K., Xylouri, E., Fragkiadaki, E., Athanassopoulou, F., Papanastassopoulou, M. & Sabatakou, O. (2007).** First incidence of clinical signs of nodavirus infection in sea bream, *Sparus auratus* L. *Isr J Aquac* **59**, 3–9.
- Bjørndal, T. & Guillen, J. (2014).** The future of sole farming in Europe: Cost of production and markets. *Aquac Eur* **39**, 5–12.
- Bloch, B., Gravningen, K. & Larsen, J. L. (1991).** Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis Aquat Organ* **10**, 65–70.
- Boonyaratpalin, S., Supamattaya, K., Kasornchandra, J. & Hoffmann, R. W. (1996).** Picorna-like virus associated with mortality and a spongy encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Dis Aquat Org* **26**, 75–80.

- Bootland, L. M. & Leong, J.-A. C. (2011).** Infectious Haematopoietic Necrosis Virus. In *Fish Disease Disord Vol 3 Viral, Bact fungal Infect*, 2nd editio., pp. 66–109. Edited by P. T. K. Woo & D. W. Bruno. CAB International.
- Borghesan, F., Selli, L., Manfrin, A., Mutinelli, F., Quattieri, K., Ormelli, S. & Bovo, G. (2003).** Winter outbreak of viral encephalo-retinopathy in farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Boll Soc It Patol Ittica* **36**, 15–23.
- Böttcher-Friebertshäuser, E., Garten, W., Matrosovich, M. & Klenk, H. D. (2014).** The hemagglutinin: a determinant of pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol* **385**, 3–34.
- Boucher, P. & Baudin-Laurencin, F. (1994).** Sleeping disease of salmonids. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* **14**, 179–180.
- Bovo, G., Nishizawa, T., Maltese, C., Borghesan, F., Mutinelli, F., Montesi, F. & De Mas, S. (1999).** Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Res* **63**, 143–6.
- Le Breton, a, Grisez, L., Sweetman, J. & Ollevier, F. (1997).** Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J Fish Dis* **20**, 145–151.
- Breuil, G. & Romestand, B. (1999).** A rapid ELISA method for detecting specific antibody level against nodavirus in the serum of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): application to the screening of spawners in a sea bass hatchery. *J Fish Dis* **22**, 45–52.
- Breuil, G., Bonami, J. R., Pepin, J. F. & Pichot, Y. (1991).** Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture* **97**, 109–116.
- Buchholz, U. J., Finke, S. & Conzelmann, K. K. (1999).** Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* **73**, 251–259.
- Cann, A. J. (2009).** *Principios de virología molecular*. Editorial Acribia, S.A.
- Cañavate, J. P. (2005).** Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup , 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Boletín del Inst Español Oceanogr* **21**, 147–154.

- Cañavate, P. (2013).** Cultivo de soleidos: el lenguado senegalés. In *Divers especies en la Piscic Mar española*, pp. 249–283. Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura.
- Castric, J., Thiéry, R., Jeffroy, J., de Kinkelin, P. & Raymond, J. C. (2001).** Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Dis Aquat Organ* **47**, 33–38.
- Castro, N., Toranzo, A. E., Devesa, S., González, A., Nuñez, S. & Magariños, B. (2012a).** First description of *Edwardsiella tarda* in Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J Fish Dis* **35**, 79–82.
- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M. & Oliva-Teles, A. (2012b).** Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **163**, 372–378.
- Cepeda, C. & Santos, Y. (2002).** First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bull Eur Assoc FishPathologists* **22**, 388–392.
- Cepeda, C., Rivas, C., Lamas, J., Ledo, A., Dopazo, C. & Toranzo, A. E. (1993).** Pathogenicity study of a new viral agent (paramyxovirus) isolated from turbot (samandrag). In *Fourth Natl Congr Aquac*, pp. 651–655. Edited by A. Cervino, A. Landin, A. DeCoo, A. Guerra & M. Torre. Pontevedra, Vilanova de Arousa, Galicia.: Centro de Investigaciones Marinas.
- Chang, C.-W., Su, Y.-C., Her, G.-M., Ken, C.-F. & Hong, J.-R. (2011).** Betanodavirus induces oxidative stress-mediated cell death that prevented by anti-oxidants and zfcatalase in fish cells. *PLoS One* **6**, e25853.
- Chang, S. ., Ngoh, G. ., Kueh, L. F. ., Qin, Q. ., Chen, C. ., Lam, T. . & Sin, Y. . (2001).** Development of a tropical marine fish cell line from Asian seabass (*Lates calcarifer*) for virus isolation. *Aquaculture* **192**, 133–145.
- Chen, L.-J., Su, Y.-C. & Hong, J.-R. (2009).** Betanodavirus non-structural protein B1: A novel anti-necrotic death factor that modulates cell death in early replication cycle in fish cells. *Virology* **385**, 444–454. Elsevier Inc.
- Chen, S.-P., Yang, H.-L., Her, G. M., Lin, H.-Y., Jeng, M.-F., Wu, J.-L. & Hong, J.-R. (2006).** Betanodavirus induces phosphatidylserine exposure and loss of mitochondrial membrane

- potential in secondary necrotic cells, both of which are blocked by bongkreikic acid. *Virology* **347**, 379–391.
- Chen, S.-P., Wu, J.-L., Su, Y.-C. & Hong, J.-R. (2007).** Anti-Bcl-2 family members, zfBcl-x(L) and zfMcl-1a, prevent cytochrome *c* release from cells undergoing betanodavirus-induced secondary necrotic cell death. *Apoptosis* **12**, 1043–1060.
- Chen, Y.-M., Shih, C.-H., Liu, H.-C., Wu, C.-L., Lin, C.-C., Wang, H.-C., Chen, T.-Y., Yang, H.-L. & Lin, J. H.-Y. (2011).** An oral nervous necrosis virus vaccine using *Vibrio anguillarum* as an expression host provides early protection. *Aquaculture* **321**, 26–33. Elsevier B.V.
- Chérif, N., Gagné, N., Groman, D., Kibenge, F., Iwamoto, T., Yason, C. & Hammami, S. (2010).** Complete sequencing of Tunisian redspotted grouper nervous necrosis virus betanodavirus capsid gene and RNA-dependent RNA polymerase gene. *J Fish Dis* **33**, 231–240.
- Chérif, N., Thiéry, R., Castric, J., Biacchesi, S., Brémont, M., Thabti, F., Limem, L. & Hammami, S. (2009).** Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in Tunisia. *Vet Res Commun* **33**, 345–353.
- Chew-Lim, M., Chong, S. Y. & Yoshimizu, M. (1998).** A Nodavirus Isolated from Grouper (*Epinephelus tauvina*) and seabass (*Lates calcarifer*). *Fish Pathol* **33**, 447–448.
- Chi, S. C., Lo, C. F., Kou, G. H., Chang, P. S., Peng, S. E. & Chen, S. N. (1997).** Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *J Fish Dis* **20**, 185–193.
- Chi, S. C., Lee, K. W. & Hwang, S. J. (2001a).** Investigation of host range of fish nodavirus in Taiwan. In *Dis Fish Shellfish 10th Int Conf Eur Assoc Fish Pathol*, p. 49. Trinity College Dublin, Ireland.
- Chi, S. C., Lo, B. J. & Lin, S. C. (2001b).** Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV). *J Fish Dis* **24**, 3–13..
- Chi, S. C., Shieh, J. R. & Lin, S. J. (2003).** Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis Aquat Organ* **55**, 221–228.

- Chi, S. C., Hu, W. W. & Lo, B. J. (1999a).** Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *J Fish Dis* **22**, 173–182.
- Chi, S.-C., Lin, S.-C., Su, H.-M. & Hu, W.-W. (1999b).** Temperature effect on nervous necrosis virus infection in grouper cell line and in grouper larvae. *Virus Res* **63**, 107–114.
- Chia, T.-J., Wu, Y.-C., Chen, J.-Y. & Chi, S.-C. (2010).** Antimicrobial peptides (AMP) with antiviral activity against fish nodavirus. *Fish Shellfish Immunol* **28**, 434–439.
- Chua, F. H. C., Loo, J. J. & Wee, J. Y. (1995).** Mass mortality in juvenile greasy grouper, *Epinephelus tauvina*, associated with vacuolating encephalopathy and retinopathy. In *Dis Asian Aquac II*, pp. 235–241. Edited by M. Shariff, J. R. Arthur & R. P. Subasinghe. Manila. Philippines.: Asian Fisheries Society.
- Ciulli, S., Galletti, E., Gallina, L., Vaccari, F. & Prosperi, S. (2006a).** Detection and Quantification of Betanodavirus by Real Time PCR. *Vet Res Commun* **30**, 235–238.
- Ciulli, S., Gallardi, D., Scagliarini, a, Battilani, M., Hedrick, R. P. & Prosperi, S. (2006b).** Temperature-dependency of Betanodavirus infection in SSN-1 cell line. *Dis Aquat Organ* **68**, 261–265.
- Ciulli, S., Galletti, E., Grodzki, M., Alessi, A., Battilani, M. & Prosperi, S. (2007).** Isolation and genetic characterization of Betanodavirus from wild marine fish from the Adriatic sea. *Vet Res Commun* **31 Suppl 1**, 221–224.
- Coetzee, P., Van Vuuren, M., Stokstad, M., Myrmel, M., van Gennip, R. G. P., van Rijn, P. a. & Venter, E. H. (2014).** Viral replication kinetics and in vitro cytopathogenicity of parental and reassortant strains of bluetongue virus serotype 1, 6 and 8. *Vet Microbiol* **171**, 53–65.
- Coffee, L. L., Casey, J. W. & Bowser, P. R. (2013).** Pathology of tumors in fish associated with retroviruses: a review. *Vet Pathol* **50**, 390–403.
- Comps, M. & Raymond, J. C. (1996).** Virus-like particles in the retina of the sea bream, *Sparus aurata*. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* **16**, 161–163.
- Comps, M., Pépin, J. F. & Bonami, J. R. (1994).** Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **123**, 1–10.

- Comps, M., Trindade, M. & Delsert, C. (1996).** Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine fishes using DIG-labelled probes. *Aquaculture* **143**, 113–121.
- Cong, Y., Sun, Y., Wang, W., Meng, Q., Ran, W., Zhu, L., Yang, G., Yang, W., Yang, L. & other authors. (2014).** Comparative analysis of receptor-binding specificity and pathogenicity in natural reassortant and non-reassortant H3N2 swine influenza virus. *Vet Microbiol* **168**, 105–115.
- Constenla, M., Padrós, F. & Palenzuela, O. (2014).** *Endolimax piscium* sp. nov. (Amoebozoa), causative agent of systemic granulomatous disease of cultured sole, *Solea senegalensis* Kaup. *J Fish Dis* **37**, 229–40.
- Da Costa, B., Soignier, S., Chevalier, C., Henry, C., Thory, C., Huet, J.-C. & Delmas, B. (2003).** Blotched snakehead virus is a new aquatic birnavirus that is slightly more related to avibirnavirus than to aquabirnavirus. *J Virol* **77**, 719–725.
- Da Costa, B., Sausset, A., Munier, S., Ghounaris, A., Naffakh, N., Le Goffic, R. & Delmas, B. (2015).** Temperature-sensitive mutants in the influenza A virus RNA polymerase: alterations in the PA linker reduce nuclear targeting of the PB1-PA dimer and result in viral attenuation. *J Virol* **89**, 6376–6390.
- Costa, J. Z., Adams, A., Bron, J. E., Thompson, K. D., Starkey, W. G. & Richards, R. H. (2007).** Identification of B-cell epitopes on the betanodavirus capsid protein. *J Fish Dis* **30**, 419–426.
- Crane, M. & Hyatt, A. (2011).** Viruses of fish: an overview of significant pathogens. *Viruses* **3**, 2025–46.
- Curtis, P. a, Drawbridge, M., Iwamoto, T., Nakai, T., Hedrick, R. P. & Gendron, a P. (2001).** Nodavirus infection of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*, cultured in southern California: first record of viral nervous necrosis (VNN) in North America. *J Fish Dis* **24**, 263–271.
- Cutrin, J. M., Oliveira, J. G., Barja, J. L. & Dopazo, C. P. (2000).** Diversity of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish, and other reservoirs in Northwestern Spain. *Appl Environ Microbiol* **66**, 839–843.
- Cutrin, J. M., Dopazo, C. P., Thiéry, R., Leao, P., Oliveira, J. G., Barja, J. L. & Bandín, I. (2007).** Emergence of pathogenic betanodaviruses belonging to the SJNNV genogroup in farmed fish species from the Iberian Peninsula. *J Fish Dis* **30**, 225–232.

- Dalla Valle, L., Zanella, L., Patarnello, P., Paolucci, L., Belvedere, P. & Colom. (2000).** Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *J Fish Dis* **23**, 321–327.
- Dalla Valle, L., Toffolo, V., Lamprecht, M., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P. & Colombo, L. (2005).** Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Vet Microbiol* **110**, 167–179.
- Dalla Valle, L. D., Negrisol, E., Patarnello, P., Zanella, L., Maltese, C., Bovo, G. & Colombo, L. (2001).** Sequence comparison and phylogenetic analysis of fish nodaviruses based on the coat protein gene. *Arch Virol* **146**, 1125–1137.
- Dalton, R. M., Mullin, A. E., Amorim, M. J., Medcalf, E., Tiley, L. S. & Digard, P. (2006).** Temperature sensitive influenza A virus genome replication results from low thermal stability of polymerase-cRNA complexes. *Virol J* **3**, 58.
- Danayadol, Y., Direkbusarakom, S. & Supamattaya, K. (1995).** Viral nervous necrosis in brownspotted grouper, *Epinephelus malabaricus*, cultured in Thailand. In *Dis Asian Aquac II*, pp. 227–233. Edited by M. Schariff, J. R. Arthur & R. . Subasinghe. Manila. Philippines.: Asian Fisheries Society.
- David, R., Tréguier, C., Montagnani, C., Belliard, C., Levy, P., Nédélec, G., Joufoques, V., Remoissenet, G., Gueguen, Y. & Cochennec-Laureau, N. (2010).** Molecular detection of betanodavirus from the farmed fish, *Platax orbicularis* (Forsskal) (Ephippidae), in French Polynesia. *J Fish Dis* **33**, 451–454.
- Delagneau, J.-F. (1970).** Effects of temperature on viral RNA synthesis and RNA polymerase activity in a foot-and-mouth disease virus system. *Arch Gesamte Virusforsch* **32**, 318–328.
- Delsert, C., Morin, N. & Comps, M. (1997).** Fish nodavirus lytic cycle and semipermissive expression in mammalian and fish cell cultures. *J Virol* **71**, 5673–5677.
- Devold, M., Karlsen, M. & Nylund, A. (2006).** Sequence analysis of the fusion protein gene from infectious salmon anemia virus isolates: Evidence of recombination and reassortment. *J Gen Virol* **87**, 2031–2040.
- Diamond, M. S. (2009).** Virus and host determinants of West Nile virus pathogenesis. *PLoS Pathog* **5**, e1000452.

- Dietzschold, B., Wiktor, T. J., Trojanowski, J. Q., Macfarlan, R. I., Wunner, W. H., Torres-Anjel, M. J. & Koprowski, H. (1985).** Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro. *J Virol* **56**, 12–18.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F. & Sarasquete, C. (1999).** A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* **176**, 27–38.
- Directiva 2010/63/UE (2010).** Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *Diario Oficial de la Unión Europea* **276**, 33-79.
- Dobos, P. (1995).** The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annu Rev Fish Dis* **5**, 25–54.
- Dopazo, C. P., Bandín, I., López-Vazquez, C., Lamas, J., Noya, M. & Barja, J. L. (2002).** Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus from Greenland halibut *Reinhardtius hippoglossoides* caught at the Flemish Cap. *Dis Aquat Organ* **50**, 171–179.
- Dopazo, C. P., Rivas, C., Bandín, I., Noya, M., Cutrín, J. M. & Barja, J. L. (1996).** Isolation of an aquareovirus from rainbow trout in N.W. Spain. *FHM/AFS Newsl* **3**, 162–171.
- Dortmans, J. C. F. M., Koch, G., Rottier, P. J. M. & Peeters, B. P. H. (2011).** Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Vet Res* **42**, 122. BioMed Central Ltd.
- Dovas, C. I., Papanastassopoulou, M., Georgiadis, M. P., Chatzinasiou, E., Maliogka, V. I. & Georgiades, G. K. (2010).** Detection and quantification of infectious avian influenza A (H5N1) virus in environmental water by using real-time reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* **76**, 2165–2174.
- Eaton, W. D. & Kent, M. L. (1992).** A Retrovirus in Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) with Plasmacytoid Leukemia and Evidence for the Etiology of the Disease. *Cancer Res* **52**, 6496–6500.
- Eckerle, L. D. & Ball, L. A. (2002).** Replication of the RNA segments of a bipartite viral genome is coordinated by a transactivating subgenomic RNA. *Virology* **296**, 165–176.
- Escriu, F., Fraile, A. & García-Arenal, F. (2007).** Constraints to genetic exchange support gene coadaptation in a tripartite RNA virus. *PLoS Pathog* **3**, e8. Public Library of Science.

- Falsey, A. R., Formica, M. A., Treanor, J. J. & Walsh, E. E. (2003).** Comparison of Quantitative Reverse Transcription-PCR to Viral Culture for Assessment of Respiratory Syncytial Virus Shedding. *J Clin Microbiol* **41**, 4160–4165.
- FAO. (2014).** El estado mundial de la pesca y la acuicultura. *Inf SOFIA*. <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf>
- Fenner, B. J., Thiagarajan, R., Chua, H. K. & Kwang, J. (2006).** Betanodavirus B2 is an RNA interference antagonist that facilitates intracellular viral RNA accumulation. *J Virol* **80**, 85–94.
- Fernández Muñoz, R. & Melero, J. A. (2006).** *Paramyxoviridae*. In *Virus patógenos*, pp. 393–409. Edited by L. Carrasco & J. M. Almendral del Río. Madrid: Editorial Hélice-Fundación BBVA.
- Francki, R. I. B., Fanquet, C. M., Knudson, D. L. & Brown, F. (1991).** Classification and Nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of virus. In *Arch Virol*, pp. 186–199. Edited by R. I. B. Francki, C. M. Fanquet, D. L. Knudson & F. Brown. Wien New York: Springer-Verlag.
- Frerichs, G. N., Morgan, D., Hart, D., Skerrow, C., Roberts, R. J. & Onions, D. E. (1991).** Spontaneously productive C-type retrovirus infection of fish cell lines. *J Gen Virol* **72**, 2537–2539.
- Frerichs, G. N., Rodger, H. D. & Peric, Z. (1996).** Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *sparus*. *J Gen Virol* **77**, 2067–2271.
- Frerichs, G. . N., Tweedie, A., Starkey, W. . G. & Richards, R. . H. (2000).** Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture* **185**, 13–24.
- Fukuda, Y., Nguyen, H., Furuhashi, M. & T, N. (1996).** Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinepheulus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol* **31**, 165–170.
- Furusawa, R., Okinaka, Y. & Nakai, T. (2006).** Betanodavirus infection in the freshwater model fish medaka (*Oryzias latipes*). *J Gen Virol* **87**, 2333–2339.
- Gagné, N., Johnson, S. C., Mackinnon, A. M. & Olivier, G. (2004).** Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the northeastern Atlantic **62**, 181–189.

- Galeotti, M., Beraldo, P., Patarnello, P., Sarli, G. & Volpatti, D. (1999).** Encefalopatia-retinopatia virale (VER-VNN) in giovanili di branzino (*D. labrax*) in assenza di lesioni tipiche di vacuolizzazione cellulare. *Boll Soc It Patol Ittica* **27**, 45–46.
- Garcia, S., Crance, J. M., Billecoq, A., Peinnequin, A., Jouan, A., Bouloy, M. & Garin, D. (2001).** Quantitative real-time PCR detection of Rift Valley fever virus and its application to evaluation of antiviral compounds. *J Clin Microbiol* **39**, 4456–4461.
- García-Rosado, E., Cano, I., Martín-Antonio, B., Labella, A., Manchado, M., Alonso, M. C., Castro, D. & Borrego, J. J. (2007).** Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *Int Microbiol* **10**, 193–9.
- Garnier, J., Gibrat, J.-F. & Robson, B. (1996).** GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* **266**, 540–553.
- Giacopello, C., Foti, M., Bottari, T., Fisichella, V. & Barbera, G. (2013).** Detection of viral encephalopathy and retinopathy virus (VERV) in wild marine fish species of the South Tyrrhenian Sea (Central Mediterranean). *J Fish Dis* **36**, 819–21.
- Gilbert, J. M. & Greenberg, H. B. (1998).** Cleavage of rhesus rotavirus VP4 after arginine 247 is essential for rotavirus-like particle-induced fusion from without. *J Virol* **72**, 5323–5327.
- Gjessing, M. C., Kvellestad, A., Ottesen, K. & Falk, K. (2009).** Nodavirus provokes subclinical encephalitis and retinochoroiditis in adult farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *J Fish Dis* **32**, 421–431.
- Glazebrook, J. S., Heasman, M. P. & Beer, S. W. (1990).** Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *J Fish Dis* **13**, 245–249.
- Glazebrook, J. S. & Campbell, R. S. F. (1987).** Diseases of barramundi (*Lates calcarifer*) in Australia: a review. In *Manag Wild Cult Sea Bass/ Barramundi Lates calcarifer*, pp. 204–206. Edited by J. W. Copland & D. I. Grey. Canberra: ACIAR.
- Godoy, M. G., Suarez, R., Lazo, E. S., Llegues, K. O., Kibenge, M. J. T., Wang, Y. & Kibenge, F. S. B. (2014).** Genetic analysis and comparative virulence of infectious salmon anemia virus (ISAV) types HPR7a and HPR7b from recent field outbreaks in Chile. *Virol J* **11**, 204.

- Gomez, D. K., Sato, J., Mushiake, K., Isshiki, T., Okinaka, Y. & Nakai, T. (2004).** PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J Fish Dis* **27**, 603–608.
- Gomez, D. K., Baeck, G. W., Kim, J. H., Choresca, C. H. & Park, S. C. (2008).** Molecular detection of betanodaviruses from apparently healthy wild marine invertebrates. *J Invertebr Pathol* **97**, 197–202.
- Gomez, D. K., Lim, D. J., Baeck, G. W., Youn, H. J., Shin, N. S., Youn, H. Y., Hwang, C. Y., Park, J. H. & Park, S. C. (2006).** Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *J Vet Sci* **7**, 369–374.
- Gopiesh Khanna, V., Kannabiran, K., Sarath Babu, V. & Sahul Hameed, A. S. (2011).** Inhibition of fish nodavirus by gymnemagenol extracted from *Gymnema sylvestre*. *J Ocean Univ China* **10**, 402–408. SP Science Press.
- Greenbaum, B. D., Li, O. T. W., Poon, L. L. M., Levine, a. J. & Rabadan, R. (2012).** Viral reassortment as an information exchange between viral segments. *Proc Natl Acad Sci* **109**, 3341–3346.
- Grotmol, S., Totland, G. K., Kvellestad, A., Fjell, K. & Olsen, A. B. (1995).** Mass mortality of larval and juvenile hatchery-halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in the central nervous system and retina. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 176–180.
- Grotmol, S., Totland, G. K., Thorud, K. & Hjeltnes, B. K. (1997).** Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Dis Aquat Organ* **29**, 85–97.
- Grotmol, S., Bergh, O. & Totland, G. K. (1999).** Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Dis Aquat Organ* **36**, 95–106.
- Grotmol, S., Nerland, A. H., Biering, E., Totland, G. K. & Nishizawa, T. (2000).** Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus*

- hippoglossus* and design of an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Dis Aquat Organ* **39**, 79–88.
- Grove, S., Faller, R., Soleim, K. B. & Dannevig, B. H. (2006).** Absolute quantitation of RNA by a competitive real-time RT-PCR method using piscine nodavirus as a model. *J Virol Methods* **132**, 104–112.
- Guan, Y., Peiris, J. S. M., Lipatov, A. S., Ellis, T. M., Dyrting, K. C., Krauss, S., Zhang, L. J., Webster, R. G. & Shortridge, K. F. (2002).** Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8950–5.
- Gudding, R. & Van Muiswinkel, W. B. (2013).** A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol* **35**, 1683–8.
- Guo, Y. X., Chan, S.-W. & Kwang, J. (2004).** Membrane association of greasy grouper nervous necrosis virus protein A and characterization of its mitochondrial localization targeting signal. *J Virol* **78**, 6498–508.
- Haddad-Boubaker, S., Bigarré, L., Bouzgarou, N., Megdich, A., Baud, M., Cabon, J. & Chéhida, N. Ben. (2013).** Molecular epidemiology of betanodaviruses isolated from sea bass and sea bream cultured along the Tunisian coasts. *Virus Genes* **46**, 412–422.
- Haenen, O. L. M., Dijkstra, S. G., van Tulden, P. W., Davidse, A., van Nieuwstadt, A. P., Wagenaar, F. & Wellenberg, G. J. (2002).** Herpesvirus anguillae (HVA) isolations from disease outbreaks in cultured European eel, *Anguilla anguilla* in The Netherlands since 1996. *Bull Eur Ass Fish Pathol* **22**, 247–257.
- Hasoon, M. F., Daud, H. M., Abdullah, A. A., Arshad, S. S. & Bejo, H. M. (2011).** Development and partial characterization of new marine cell line from brain of Asian sea bass *Lates calcarifer* for virus isolation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **47**, 16–25.
- Hata, N., Okinaka, Y., Iwamoto, T., Kawato, Y., Mori, K.-I. & Nakai, T. (2010).** Identification of RNA regions that determine temperature sensitivities in betanodaviruses. *Arch Virol* **155**, 1597–1606.
- He, J. G., Wang, S. P., Zeng, K., Huang, Z. J. & Chan, S.-M. (2000).** Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *J Fish Dis* **23**, 219–222.

- Hedrick, R. P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J. V., Marty, G. D., Nordhausen, R. W., Kebus, M. J., Bercovier, H. & Eldar, A. (2000).** A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. *J Aquat Anim Health* **12**, 44–57.
- Hedrick, R. & Sano, T. (1989).** Herpesviruses of fish. In *Viruses Low Vertebr*, pp. 161–171. Edited by W. Ahne & E. Kurstak. Berlin: Springer-Verlag.
- Hegde, A., Teh, H. C., Lam, T. J. & Sin, Y. M. (2003).** Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata*- comparative characterization and pathogenicity studies. *Arch Virol* **148**, 575–586.
- Hellberg, H., Kvellestad, A., Dannevig, B., Bornø, G., Modahl, I., Haldorsen, R. N., Vik-Mo, F., Ottesen, K., Saetre, E. M. & Sindre, H. (2010).** Outbreaks of viral nervous necrosis in juvenile and adult farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., in Norway. *J Fish Dis* **33**, 75–81.
- Hendry, D. A., Johnson, J. E., Rueckert, R. R., Scotti, P. D., Ball, L. A., Hendry, D. A., Johnson, J. E., Rueckert, R. R. & Scotti, P. D. (1995).** Family *Nodaviridae*. In *Virus Taxon Sixth Rep Int Comm Taxon Viruses*, pp. 368–371. Edited by F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo & M. D. Summers. Vienna & New York: Academic Press.
- Hick, P. & Whittington, R. J. (2010).** Optimisation and validation of a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of betanodavirus. *J Virol Methods* **163**, 368–377.
- Hodneland, K., García, R., Balbuena, J. a, Zarza, C. & Fouz, B. (2011).** Real-time RT-PCR detection of betanodavirus in naturally and experimentally infected fish from Spain. *J Fish Dis* **34**, 189–202.
- Hope, K. M., Casey, R. N., Groocock, G. H., Getchell, R. G., Bowser, P. R. & Casey, J. W. (2010).** Comparison of quantitative RT-PCR with cell culture to detect viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) IVb infections in the Great Lakes. *J Aquat Anim Health* **22**, 50–61.
- Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (1994).** Correlation of hemagglutinin cleavability and Reverse Genetics Provides Direct Evidence for a Correlation of Hemagglutinin Cleavability and Virulence of an Avian Influenza A Virus. *J Virol* **68**, 3120–3128.

- Húsgard, S., Grotmol, S., Hjeltnes, B. K., Rødseth, O. M. & Biering, E. (2001).** Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Dis Aquat Organ* **45**, 33–44.
- Ichinose, T., Musyoka, T. M., Watanabe, K. & Kobayashi, N. (2013).** Evaluation of antiviral activity of Oligonol, an extract of *Litchi chinensis*, against betanodavirus. *Drug Discov Ther* **7**, 254–260.
- ICTV. (2014).** Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. International Committee on Taxonomy of Viruses. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- Ikenaga, T., Tatecho, Y., Nakai, T. & Uematsu, K. (2002).** *Betanodavirus as a novel transneuronal tracer for fish. Neurosci Lett* **331**, 55–59.
- Imsland, A. K., Foss, A., Dinis, M. T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P. & White, P. (2003).** A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev Fish Biol Fish* **13**, 379–407.
- Ito, Y., Okinaka, Y., Mori, K.-I., Sugaya, T., Nishioka, T., Oka, M. & Nakai, T. (2008).** Variable region of betanodavirus RNA2 is sufficient to determine host specificity. *Dis Aquat Organ* **79**, 199–205.
- Iwamoto, R., Hasegawa, O., LaPatra, S. & Yoshimizu, M. (2002).** Isolation and characterization of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) lymphocystis disease virus. *J Aquat Anim Health* **14**, 114–123.
- Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M. & Furusawa, I. (2000).** Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis Aquat Organ* **43**, 81–89.
- Iwamoto, T., Mise, K., Mori, K., Arimoto, M., Nakai, T. & Okuno, T. (2001a).** Establishment of an infectious RNA transcription system for Striped jack nervous necrosis virus, the type species of the betanodaviruses. *J Gen Virol* **82**, 2653–2662.
- Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M., Mise, K & Furusawa, I. (2001b).** Transfection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) RNA into fish cells. *J. Fish Dis.* **24**, 185–188.

- Iwamoto, T., Okinaka, Y., Mise, K., Mori, K.-I., Arimoto, M., Okuno, T. & Nakai, T. (2004).** Identification of host-specificity determinants in betanodaviruses by using reassortants between striped jack nervous necrosis virus and sevenband grouper nervous necrosis virus. *J Virol* **78**, 1256–1262.
- Iwamoto, T., Mise, K., Takeda, A., Okinaka, Y., Mori, K.-I., Arimoto, M., Okuno, T. & Nakai, T. (2005).** Characterization of Striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *J Gen Virol* **86**, 2807–2816.
- Jithendran, K., Shekhar, M., Kannappan, S. & Azad, I. (2011).** Nodavirus infection in freshwater ornamental fishes in India: diagnostic histopathology and nested RT-PCR. *Asian Fish Soc* **24**, 12–9.
- Johansen, R., Ranheim, T., Hansen, M. K., Taksdal, T. & Totland, G. K. (2002).** Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodavirus. *Dis Aquat Organ* **50**, 161–169.
- Johansen, R., Sommerset, I., Tørud, B., Korsnes, K., Hjortaas, M. J., Nilsen, F., Nerland, a H. & Dannevig, B. H. (2004a).** Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J Fish Dis* **27**, 591–601.
- Johansen, R., Grove, S., Svendsen, a K., Modahl, I. & Dannevig, B. (2004b).** A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy. *J Fish Dis* **27**, 327–341.
- Johnson, K. N. & Ball, L. A. (2001).** Recovery of infectious pariacoto virus from cDNA clones and identification of susceptible cell lines. *J Virol* **75**, 12220–7.
- Johnson, S. C., Sperker, S. A., Leggiadro, C. T., Groman, D. B., Griffiths, S. G., Ritchie, R. J., Cook, M. D. & Cusack, R. R. (2002).** Identification and characterization of a piscine neuropathy and nodavirus from juvenile atlantic cod from the Atlantic Coast of North America. *J Aquat Anim Health* **14**, 124–133.
- Joklik, W. K., Roner, M. R. & Wolfgang K. Joklik, M. R. R. (1995).** What reassorts when reovirus genome reassort? *J Biol Chem* **270**, 4181–4184.
- Kai, Y.-H. & Chi, S.-C. (2008).** Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine* **26**, 1450–1457.

- Kai, Y.-H., Su, H.-M., Tai, K.-T. & Chi, S.-C. (2010).** Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. *Vaccine* **28**, 996–1001.
- Kara, H. M., Chaoui, L., Derbal, F., Zaidi, R., de Boisséson, C., Baud, M. & Bigarré, L. (2014).** Betanodavirus-associated mortalities of adult wild groupers *Epinephelus marginatus* (Lowe) and *Epinephelus costae* (Steindachner) in Algeria. *J Fish Dis* **37**, 273–8.
- Kasornchandra, J., Engelking, H. M., Lannan, C. N., Rohovec, J. S. & Fryer, J. L. (1992).** Characteristics of three rhabdoviruses from snake-head fish *Ophicephalus striatus*. *Dis Aquat Organ* **13**, 89–94.
- Kibenge, F. S. B., Godoy, M. G., Fast, M., Workenhe, S. & Kibenge, M. J. T. (2012).** Countermeasures against viral diseases of farmed fish. *Antiviral Res* **95**, 257–281.
- Kimura, T., Yoshimizu, M. & Gorie, S. (1986).** A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder) *Paralichthys olivaceus* and ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis Aquat Organ* **1**, 209–217.
- Kirsanovs, S., Klempa, B., Franke, R., Lee, M. H., Schönrich, G., Rang, A. & Kruger, D. H. (2010).** Genetic reassortment between high-virulent and low-virulent Dobrava-Belgrade virus strains. *Virus Genes* **41**, 319–328.
- Korsnes, K., Karlsbakk, E., Devold, M., Nerland, a H. & Nylund, A. (2009).** Tissue tropism of nervous necrosis virus (NNV) in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., after intraperitoneal challenge with a virus isolate from diseased Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J Fish Dis* **32**, 655–665.
- Korsnes, K., Karlsbakk, E., Nylund, A. & Nerland, A. H. (2012).** Horizontal transmission of nervous necrosis virus between turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic cod *Gadus morhua* using cohabitation challenge. *Dis Aquat Organ* **99**, 13–21.
- Krishnan, K., Khanna, V. G. & Hameed, S. (2010).** Antiviral activity of dasyscyphin C extracted from *Eclipta prostrata* against fish nodavirus. *J Antivirals Antiretrovir* **2**, 29–32.
- Kuo, H.-C., Wang, T.-Y., Chen, P.-P., Chen, Y.-M., Chuang, H.-C. & Chen, T.-Y. (2011).** Real-time quantitative PCR assay for monitoring of nervous necrosis virus infection in grouper aquaculture. *J Clin Microbiol* **49**, 1090–1096.

- Kvellestad, A., Dannevig, B. H. & Falk, K. (2003).** Isolation and partial characterization of a novel paramyxovirus from the gills of diseased seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *J Gen Virol* **84**, 2179–2189.
- Lai, Y.-S., Murali, S., Chiu, H.-C., Ju, H.-Y., Lin, Y.-S., Chen, S.-C., Guo, I.-C., Fang, K. & Chang, C.-Y. (2001a).** Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), brain tissue. *J Fish Dis* **24**, 299–309.
- Lai, Y.-S., Chiu, H.-C., Murali, S., Guo, I.-C., Chen, S.-C., Fang, K. & Chang, C.-Y. (2001b).** In vitro neutralization by monoclonal antibodies against yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) and immunolocalization of virus infection in yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *J Fish Dis* **24**, 237–244.
- Lai, Y.-X., Jin, B.-L., Xu, Y., Huang, L.-J., Huang, R.-Q., Zhang, Y., Kwang, J., He, J.-G. & Xie, J.-F. (2014).** Immune responses of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, against virus-like particles of betanodavirus produced in *Escherichia coli*. *Vet Immunol Immunopathol* **157**, 87–96.
- Lang, V., Marjuki, H., Krauss, S. L., Webby, R. J. & Webster, R. G. (2011).** Different incubation temperatures affect viral polymerase activity and yields of low-pathogenic avian influenza viruses in embryonated chicken eggs. *Arch Virol* **156**, 987–94.
- Lee, N.-S., Kobayashi, J. & Miyazaki, T. (1999).** Gill filament necrosis in farmed Japanese eels, *Anguilla japonica* (Temminck & Schlegel), infected with Herpesvirus anguillae. *J Fish Dis* **22**, 457–463.
- Lee, P., Knight, R., Smit, J. M., Wilschut, J. & Griffin, D. E. (2002).** A single mutation in the E2 glycoprotein important for neurovirulence influences binding of sindbis virus to neuroblastoma cells. *J Virol* **76**, 6302–6310.
- Lepa, a. & Siwicki, a. K. (2011).** Retroviruses of wild and cultured fish. *Pol J Vet Sci* **14**, 703–709.
- Liang, H.-R., Li, Y.-G., Zeng, W.-W., Wang, Y.-Y., Wang, Q. & Wu, S.-Q. (2014).** Pathogenicity and tissue distribution of grass carp reovirus after intraperitoneal administration. *Virol J* **11**, 178.

- Lin, C.-C., Lin, J. H.-Y., Chen, M.-S. & Yang, H.-L. (2007).** An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture* **268**, 265–273.
- Liu, H., Teng, Y., Zheng, X., Wu, Y., Xie, X., He, J., Ye, Y. & Wu, Z. (2012).** Complete sequence of a viral nervous necrosis virus (NNV) isolated from red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) in China. *Arch Virol* **157**, 777–782.
- Liu, W., Hsu, C.-H., Hong, Y.-R., Wu, S.-C., Wang, C.-H., Wu, Y.-M., Chao, C.-B. & Lin, C.-S. (2005).** Early endocytosis pathways in SSN-1 cells infected by dragon grouper nervous necrosis virus. *J Gen Virol* **86**, 2553–2561.
- Liu, W., Hsu, C.-H., Chang, C.-Y., Chen, H.-H. & Lin, C.-S. (2006).** Immune response against grouper nervous necrosis virus by vaccination of virus-like particles. *Vaccine* **24**, 6282–7.
- Liu, Y., Wimmer, E. & Paul, A. V. (2009).** Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 495–517.
- Lopez-Jimena, B., Cherif, N., García-Rosado, E., Infante, C., Cano, I., Castro, D., Hammami, S., Borrego, J. J. & Alonso, M. C. (2010a).** A combined RT-PCR and dot-blot hybridization method reveals the coexistence of SJNNV and RGNNV betanodavirus genotypes in wild meagre (*Argyrosomus regius*). *J Appl Microbiol* **109**, 1361–1369.
- Lopez-Jimena, B., García-Rosado, E., Infante, C., Cano, I., Manchado, M., Castro, D., Borrego, J. J. & Alonso, M. C. (2010b).** Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from asymptomatic redbanded seabream, *Pagrus auriga* Valenciennes, and common seabream, *Pagrus pagrus* (L.), using a non-destructive procedure. *J Fish Dis* **33**, 311–319.
- Lopez-Jimena, B., Alonso, M. D. C., Thompson, K. D., Adams, A., Infante, C., Castro, D., Borrego, J. J. & García-Rosado, E. (2011).** Tissue distribution of Red Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) genome in experimentally infected juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Vet Microbiol* **154**, 86–95. Elsevier B.V.
- Lopez-Jimena, B., García-Rosado, E., Thompson, K. D., Adams, A., Infante, C., Borrego, J. J. & Alonso, M. C. (2012).** Distribution of red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) antigens in nervous and non-nervous organs of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) during the course of an experimental challenge. *J Vet Sci* **13**, 355–362.

- López-Muñoz, A., Sepulcre, M. P., García-Moreno, D., Fuentes, I., Béjar, J., Manchado, M., Álvarez, M. C., Meseguer, J. & Mulero, V. (2012).** Viral nervous necrosis virus persistently replicates in the central nervous system of asymptomatic gilthead seabream and promotes a transient inflammatory response followed by the infiltration of IgM+ B lymphocytes. *Dev Comp Immunol* **37**, 429–437.
- López-Vázquez, C., Dopazo, C. P., Oliveira, J. G., Barja, J. L. & Bandín, I. (2006).** Development of a rapid, sensitive and non-lethal diagnostic assay for the detection of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Virol Methods* **133**, 167–174.
- López-Vázquez, C., Conde, M., Dopazo, C. P., Barja, J. L. & Bandín, I. (2011).** Susceptibility of juvenile sole *Solea senegalensis* to marine isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus from wild and farmed fish. *Dis Aquat Organ* **93**, 111–116.
- Lu, M.-W., Liu, W. & Lin, C.-S. (2003).** Infection competition against grouper nervous necrosis virus by virus-like particles produced in *Escherichia coli*. *J Gen Virol* **84**, 1577–1582.
- Lu, M.-W., Chao, Y.-M., Guo, T.-C., Santi, N., Evensen, O., Kasani, S. K., Hong, J.-R. & Wu, J.-L. (2008).** The interferon response is involved in nervous necrosis virus acute and persistent infection in zebrafish infection model. *Mol Immunol* **45**, 1146–1152.
- Lupiani, B., Dopazo, C. P., Ledo, A., Fouz, B., Barja, J. L., Hetrick, F. M. & Toranzo, A. E. (1989).** New Syndrome of Mixed Bacterial and Viral Etiology in Cultured Turbot *Scophthalmus maximus*. *J Aquat Anim Health* **1**, 197–204. Taylor & Francis Group.
- Lustig, S., Jackson, a C., Hahn, C. S., Griffin, D. E., Strauss, E. G. & Strauss, J. H. (1988).** Molecular basis of Sindbis virus neurovirulence in mice. *J Virol* **62**, 2329–2336.
- Lycett, S. J., Ward, M. J., Lewis, F. I., Poon, A. F. Y., Kosakovsky Pond, S. L. & Leigh Brown, A. (2009).** Detection of mammalian virulence determinants in highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: multivariate analysis of published data. *J Virol* **83**, 9901–9910.
- Maeno, Y., de la Peña, L. D. & Cruz-Lacierda, E. (2002).** Nodavirus infection in hatchery-reared Orange-Spotted Grouper *Epinephelus coioides*: first record of viral nervous necrosis in the Philippines. *Fish Pathol* **37**, 87–89.
- Magariños, B., Devesa, S., González, A., Castro, N. & Toranzo, A. E. (2011).** Furunculosis in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) cultured in a recirculation system. *Vet Rec* **168**, 431b.

- Maltese, C. & Bovo, G. (2007).** Viral encephalopathy and retinopathy. *Ittiopatologia* **4**, 93–146.
- Manin, B. O. & Ransangan, J. (2011).** Experimental evidence of horizontal transmission of Betanodavirus in hatchery-produced Asian seabass, *Lates calcarifer* and brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* fingerling. *Aquaculture* **321**, 157–165.
- Marino, G. & Azzuro, E. (2001).** Nodavirus in dusky grouper (*Epinephelus marginatus* Lowe 1834) of the natural marine reserve of Ustica, south thyrrenian sea. *Biol Mar Mediteranea* **8**, 837–841.
- Markussen, T., Jonassen, C. M., Numanovic, S., Braaen, S., Hjortaas, M., Nilsen, H. & Mjaaland, S. (2008).** Evolutionary mechanisms involved in the virulence of infectious salmon anaemia virus (ISAV), a piscine orthomyxovirus. *Virology* **374**, 515–27.
- Mazelet, L., Dietrich, J. & Rolland, J. L. (2011).** New RT-qPCR assay for viral nervous necrosis virus detection in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): application and limits for hatcheries sanitary control. *Fish Shellfish Immunol* **30**, 27–32. Elsevier Ltd.
- McDonald, S. M. & Patton, J. T. (2011).** Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends Microbiol* **19**, 136–44.
- Mézeth, K. B., Nylund, S., Henriksen, H., Patel, S., Nerland, A. H. & Szilvay, A. M. (2007).** RNA-dependent RNA polymerase from Atlantic halibut nodavirus contains two signals for localization to the mitochondria. *Virus Res* **130**, 43–52.
- Miller, D. J. & Ahlquist, P. (2002).** Flock house virus RNA polymerase is a transmembrane protein with amino-terminal sequences sufficient for mitochondrial localization and membrane insertion. *J Virol* **76**, 9856–9867.
- Millet, J. K. & Whittaker, G. R. (2014).** Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res* **202**, 120–34.
- Mladineo, I. (2003).** The immunohistochemical study of nodavirus changes in larval, juvenile and adult sea bass tissue. *J Appl Ichthyol* **19**, 366–370.
- Moody, N. J. G., Horwood, P. F., Reynolds, a., Mahony, T. J., Anderson, I. G. & Oakey, H. J. (2009).** Phylogenetic analysis of betanodavirus isolates from Australian finfish. *Dis Aquat Organ* **87**, 151–160.

- Moreno, P., Oliveira, J. G., Labella, A., Cutrín, J. M., Baro, J. C., Borrego, J. J. & Dopazo, C. P. (2014).** Surveillance of viruses in wild fish populations in areas around the Gulf of Cadiz (South Atlantic Iberian Peninsula). *Appl Environ Microbiol* **80**, 6560–71.
- Mori, K., Nakai, T., Nagahara, M., Muroga, K., Mekuchi, T. & Kanno, T. (1991).** A Viral Disease in Hatchery-reared Larvae and Juveniles of Redspotted Grouper. *Fish Pathol* **26**, 209–210.
- Mori, K., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K. & Furusawa, I. (1992).** Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology* **187**, 368–371.
- Mori, K., Mangyoku, T., Iwamoto, T., Arimoto, M., Tanaka, S. & Nakai, T. (2003).** Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis Aquat Organ* **57**, 19–26.
- Morick, D., Faigenbaum, O., Smirnov, M., Fellig, Y., Inbal, A. & Kotler, M. (2015).** Mortality caused by bath exposure of zebrafish (*Danio rerio*) larvae to nervous necrosis virus is limited to the fourth day postfertilization. *Appl Environ Microbiol* **81**, 3280–7.
- Munday, B. L., Kwang, J. & Moody, N. (2002).** Betanodavirus infections of teleost fish : a review. *J Fish Dis* **25**, 127–142.
- Munday, B. L., Langdon, J. S., Hyatt, A. & Humphrey, J. D. (1992).** Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture* **103**, 197–211.
- Muroga, K. (1995).** Viral and bacterial diseases in larval and juvenile marine fish and shellfish: a review. *Fish Pathol* **30**, 71–85.
- Nagai, T. & Nishizawa, T. (1999).** Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus. *J Gen Virol* **80**, 3019–3022.
- Nakai, T., Nguyen, H., Nishizawa, T., Muroga, K., Arimoto, M. & Ootsuki, K. (1994).** Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer. *Fish Pathol* **29**, 177–182.
- Névarez, L., Cozien, J. & Thiéry, R. (2005).** Analyse phylogénétique comparée des gènes de la protéine de capsid et de l'ARN polymérase des nodavirus de poissons. A52. VIIèmes Journées francophones de Virologie, 28–29 Avril 2005 Paris. *Virologie* **9**, 115–166 (In French.)

- Nguyen, H. D., Nakai, T. & Muroga, K. (1996).** Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Dis Aquat Organ* **24**, 99–105.
- Nguyen, H. D., Mushiake, K., Nakai, T. & Muroga, K. (1997).** Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Dis Aquat Org* **28**, 87–91.
- Nishizawa, T., Mori, K., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I. & Muroga, K. (1995).** Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J Gen Virol* **76** (Pt 7), 1563–1569.
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T. & Muroga, K. (1997).** Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1633–1636.
- Nishizawa, T., Takano, R. & Muroga, K. (1999).** Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped jack nervous necrosis virus. *J Gen Virol* **80** (Pt 11), 3023–7.
- Nishizawa, T., Takami, I., Kokawa, Y. & Yoshimizu, M. (2009).** Fish immunization using a synthetic double-stranded RNA Poly (I:C), an interferon inducer, offers protection against RGNNV, a fish nodavirus. *Dis Aquat Organ* **83**, 115–122.
- Nishizawa, T., Mori, K., Nakai, T., Furusawa, I. & Muroga, K. (1994).** Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis Aquat Organ* **18**, 103–107.
- Nishizawa, T., Gye, H. J., Takami, I. & Oh, M.-J. (2012).** Potentiality of a live vaccine with nervous necrosis virus (NNV) for sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* at a low rearing temperature. *Vaccine* **30**, 1056–1063. Elsevier Ltd.
- Novoa, B., Barja, J. L. & Figueras, A. (1995b).** Entry and sequential distribution of an aquatic birnavirus in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* **131**, 1–9.
- Nylund, a, Karlsbakk, E., Nylund, S., Isaksen, T. E., Karlsen, M., Korsnes, K., Handeland, S., Martinsen, R., Mork Pedersen, T. & Ottem, K. F. (2008).** New clade of betanodaviruses detected in wild and farmed cod (*Gadus morhua*) in Norway. *Arch Virol* **153**, 541–547.

- Oh, M., Takami, I., Nishizawa, T., Kim, W., Kim, C., Kim, S. & Park, M. (2012).** Field tests of Poly(I:C) immunization with nervous necrosis virus (NNV) in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *J Fish Dis* **35**, 187–191.
- Oh, M.-J., Jung, S.-J., Kim, S.-R., Rajendran, K. ., Kim, Y.-J., Choi, T.-J., Kim, H.-R. & Kim, J.-D. (2002).** A fish nodavirus associated with mass mortality in hatchery-reared red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* **211**, 1–7.
- Oh, M.-J., Gye, H. J. & Nishizawa, T. (2013).** Assessment of the sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* with a live nervous necrosis virus (NNV) vaccine at natural seawater temperature. *Vaccine* **31**, 2025–2027.
- OIE, Office International des Epizooties/World Animal Health Organization (2013).** Chapter 2.3.11 Viral encephalopathy and retinopathy. in *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. OIE, Paris, pp. 1–19.
- OIE, Office International des Epizooties/World Animal Health Organization (2012).** Chapter 2.3.4 Infectious haematopoietic necrosis in *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. OIE, Paris, pp. 300–313.
- Okinaka, Y. & Nakai, T. (2008).** Comparisons among the complete genomes of four betanodavirus genotypes. *Dis Aquat Organ* **80**, 113–21.
- Olveira, J. G., Souto, S., Dopazo, C. P., Thiéry, R., Barja, J. L. & Bandín, I. (2009).** Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *J Gen Virol* **90**, 2940–2951.
- Olveira, J. G., Souto, S., Dopazo, C. P. & Bandín, I. (2013).** Isolation of betanodavirus from farmed turbot *Psetta maxima* showing no signs of viral encephalopathy and retinopathy. *Aquaculture* **406**, 125–130.
- Olveira, J. G., Soares, F., Engrola, S., Dopazo, C. P. & Bandín, I. (2008).** Antemortem versus postmortem methods for detection of betanodavirus in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *J Vet Diagn Invest* **20**, 215–219.
- Panzarin, V., Patarnello, P., Mori, A., Rampazzo, E., Cappellozza, E., Bovo, G. & Cattoli, G. (2010).** Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Arch Virol* **155**, 1193–1203.

- Panzarin, V., Fusaro, A., Monne, I., Cappelozza, E., Patarnello, P., Bovo, G., Capua, I., Holmes, E. C. & Cattoli, G. (2012).** Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infect Genet Evol* **12**, 63–70.
- Panzarin, V., Cappelozza, E., Mancin, M., Milani, A., Toffan, A., Terregino, C. & Cattoli, G. (2014).** In vitro study of the replication capacity of the RGNNV and the SJNNV betanodavirus genotypes and their natural reassortants in response to temperature. *Vet Res* **45**, 56.
- Patel, S. & Nerland, A. H. (2014).** Vaccination against diseases caused by betanodavirus. In *Fish Vaccin*, First Edit., pp. 341–351. Edited by R. Gudding, A. Lillehaug & Ø. Evensen. JohnWiley & Sons, Ltd.
- Patel, S., Korsnes, K., Bergh, Ø., Vik-Mo, F., Pedersen, J. & Nerland, A. H. (2007).** Nodavirus in farmed Atlantic cod *Gadus morhua* in Norway. *Dis Aquat Organ* **77**, 169–173.
- Péducasse, S., Castric, J., Thiéry, R., Jeffroy, J., Le Ven, A. & Baudin Laurencin, F. (1999).** Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. *Dis Aquat Organ* **36**, 11–20.
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., Galán, J. C., Palero, F. & González-Candelas, F. (2015).** Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infect Genet Evol* **30**, 296–307.
- Pirarat, N., Ponpornpisit, A., Traithong, T., Nakai, T., Katagiri, T., Maita, M. & Endo, M. (2009a).** Nodavirus associated with pathological changes in adult spotted coralgroupers (*Plectropomus maculatus*) in Thailand with viral nervous necrosis. *Res Vet Sci* **87**, 97–101.
- Pirarat, N., Katagiri, T., Maita, M., Nakai, T. & Endo, M. (2009b).** Viral encephalopathy and retinopathy in hatchery-reared juvenile thread-sail filefish (*Stephanolepis cirrhifer*). *Aquaculture* **288**, 349–352.
- Purcell, M. K., Hart, S. A., Kurath, G. & Winton, J. R. (2006).** Strand-specific, real-time RT-PCR assays for quantification of genomic and positive-sense RNAs of the fish rhabdovirus, Infectious hematopoietic necrosis virus. *J Virol Methods* **132**, 18–24.
- Purcell, M. K., Laing, K. J. & Winton, J. R. (2012).** Immunity to fish rhabdoviruses. *Viruses* **4**, 140–166.

- Qin, Q. W., Wu, T. H., Jia, T. L., Hegde, A. & Zhang, R. Q. (2006).** Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus. *J Virol Methods* **131**, 58–64.
- Racaniello, V. R. & Baltimore, D. (1981).** Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* **214**, 916–9.
- Ransangan, J. & Manin, B. O. (2010).** Mass mortality of hatchery-produced larvae of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), associated with viral nervous necrosis in Sabah, Malaysia. *Vet Microbiol* **145**, 153–157.
- Ransangan, J., Manin, B. O., Abdullah, A., Roli, Z. & Sharudin, E. F. (2011).** Betanodavirus infection in golden pompano, *Trachinotus blochii*, fingerlings cultured in deep-sea cage culture facility in Langkawi, Malaysia. *Aquaculture* **315**, 327–334.
- Real Decreto 526/2014, B. (n.d.).** Lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria.
- Reed, L. & Muench, H. (1938).** A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* **27**, 493–497.
- Reese, S. M., Blitvich, B. J., Blair, C. D., Geske, D., Beaty, B. J. & Black, W. C. (2008).** Potential for La Crosse virus segment reassortment in nature. *Virol J* **5**, 164.
- Renault, T., Haffner, P., Laurencin, F., Breuil, G. & Bonami, J. . (1991).** Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* **11**, 68–73.
- Robertson, S. J., Hasenkrug, K. J., Chesebro, B. & Portis, J. L. (1997).** Neurologic disease induced by polytropic murine retroviruses: neurovirulence determined by efficiency of spread to microglial cells. *J Virol* **71**, 5287–5294.
- Rodríguez, S., Vilas, M. P., Gutierrez, M. C., Pérez-Prieto, S. I., Sarasquete, M. C. & Rodríguez, R. B. (1997).** Isolation and Preliminary Characterization of a Birnavirus from the Sole *Solea senegalensis* in Southwest Spain. *J Aquat Anim Health* **9**, 295–300.
- Romero-Brey, I., Bandín, I., Cutrín, J. M., Vakharia, V. N. & Dopazo, C. P. (2009).** Genetic analysis of aquabirnaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus. *J Fish Dis* **32**, 585–95.

- Roner, M. R., Bassett, K. & Roehr, J. (2004).** Identification of the 5' sequences required for incorporation of an engineered ssRNA into the Reovirus genome. *Virology* **329**, 348–160.
- Rosenbergova, K., Lany, P., Pospisil, Z., Kubicek, O., Celer, V. & Molinkova, D. (2009).** Quantification of avian influenza virus in tissues of mute swans using TaqMan real time qRT-PCR. *Vet Med* **9**, 435–443.
- Roulston, A., Marcellus, R. C. & Branton, P. E. (1999).** Viruse and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* **53**, 577–628.
- Sambrook, J. F. & Russell, D. W. (2001).** Protocol 26: Transformación of *E. coli* by Electroporation. In *Mol Cloning A Lab Man*, 3rd edn., pp. 1119–1122. Edited by C. S. H. Laboratory. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sano, M., Nakai, T. & Fijan, N. (2011).** Viral diseases and agents of warmwater fish. In *Fish Disord Vol 3 Viral, Bact fungal Infect*, pp. 189–198. Edited by P. T. K. Woo & D. W. Bruno. CAB Internationa.
- Schrauwen, E. J. A., de Graaf, M., Herfst, S., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. (2014).** Determinants of virulence of influenza A virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**, 479–90.
- Seganti, L., Superti, F., Bianchi, S., Orsi, N., Divizia, M. & Panà, A. (1990).** Susceptibility of mammalian, avian, fish, and mosquito cell lines to rabies virus infection. *Acta Virol* **34**, 155–63.
- Sepulcre, M. P., Muñoz, I., Roca, F. J., López-Muñoz, A. & Mulero, V. (2010).** Molecular strategies used by fish pathogens to interfere with host-programmed cell death. *Dev Comp Immunol* **34**, 603–610.
- Shetty, M., Maiti, B., Shivakumar Santhosh, K., Venugopal, M. N. & Karunasagar, I. (2012).** Betanodavirus of marine and freshwater fish: distribution, genomic organization, diagnosis and control measures. *Indian J Virol* **23**, 114–123.
- Simon-Loriere, E. & Holmes, E. C. (2011).** Why do RNA viruses recombine? *Nat Rev Microbiol* **9**, 617–26.

- Skall, H. F., Olesen, N. J. & Møllgaard, S. (2005).** Prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus in Danish marine fishes and its occurrence in new host species. *Dis Aquat Organ* **66**, 145–51.
- Skliris, G. P., Krondiris, J. V., Sideris, D. C., Shinn, a P., Starkey, W. G. & Richards, R. H. (2001).** Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Res* **75**, 59–67.
- Skliris, G. . & Richards, R. . (1999).** Induction of nodavirus disease in seabass, *Dicentrarchus labrax*, using different infection models. *Virus Res* **63**, 85–93.
- Smail, D. A. & Snow, M. (2011).** Viral Haemorrhagic Septicaemia. In *Fish Dis Disord Vol 3 Viral, Bact fungal Infect*, 2nd editio., pp. 110–142. Edited by P. T. K. Woo & D. W. Bruno. CAB International.
- Sohn, S., Park, M., Oh, M. & Chun, S. (1991).** Studies on the mass mortality of the cultured grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *J Fish Pathol* **4**, 87–94.
- Sommerset, I. & Nerland, A. H. (2004).** Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *Dis Aquat Organ* **58**, 117–125.
- Sommerset, I., Lorenzen, E., Lorenzen, N., Bleie, H. & Nerland, A. H. (2003).** A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine* **21**, 4661–4667.
- Sommerset, I., Skern, R., Biering, E., Bleie, H., Fiksdal, I. U., Grove, S. & Nerland, A. H. (2005).** Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol* **18**, 13–29.
- Song, H., Santi, N., Evensen, O., Vakharia, V. N. & Evensen, Ø. (2005).** Molecular Determinants of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Virulence and Cell Culture Adaptation. *J Virol* **79**, 9206–9216.
- Souto, S., Lopez-Jimena, B., Alonso, M. C., García-Rosado, E. & Bandín, I. (2015).** Experimental susceptibility of European sea bass and Senegalese sole to different betanodavirus isolates. *Vet Microbiol* **177**, 53–61.

- Starkey, W. G., Ireland, J. H., Muir, K. F., P Shinn, A., Richards, R. H. & Ferguson, H. W. (2000).** Isolation of nodavirus from Scottish farmed halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L). *J Fish Dis* **23**, 418–422.
- Starkey, W. G., Ireland, J. H., Muir, K. F., Jenkins, M. E., Roy, W. J., Richards, R. H. & Ferguson, H. W. (2001).** Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK. *Vet Rec* **149**, 179–181.
- Stobart, C. C. & Moore, M. L. (2014).** RNA virus reverse genetics and vaccine design. *Viruses* **6**, 2531–50.
- Stoker, M. & Macpherson, I. (1964).** Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives. *Nature* **203**, 1355–7.
- Su, Y.-C. & Hong, J.-R. (2010).** Betanodavirus B2 causes ATP depletion-induced cell death via mitochondrial targeting and complex II inhibition in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **285**, 39801–39810.
- Su, Y.-C., Wu, J.-L. & Hong, J.-R. (2009).** Betanodavirus non-structural protein B2: A novel necrotic death factor that induces mitochondria-mediated cell death in fish cells. *Virology* **385**, 143–154.
- Su, Y.-C., Wu, J.-L. & Hong, J.-R. (2011).** Betanodavirus up-regulates chaperone GRP78 via ER stress: roles of GRP78 in viral replication and host mitochondria-mediated cell death. *Apoptosis* **16**, 272–287.
- Subramaniam, K., Shariff, M., Omar, A. R. & Hair-Bejo, M. (2012).** Megalocytivirus infection in fish. *Rev Aquac* **4**, 221–233.
- Suthindhiran, K., Sarath Babu, V., Kannabiran, K., Ishaq Ahmed, V. P. & Sahul Hameed, A. S. (2011).** Anti-fish nodaviral activity of furan-2-yl acetate extracted from marine *Streptomyces* spp. *Nat Prod Res* **25**, 834–43.
- Takizawa, N., Adachi, K., Ichinose, T. & Kobayashi, N. (2008a).** Efficient propagation of betanodavirus in a murine astrocytoma cell line. *Virus Res* **136**, 206–210.
- Takizawa, N., Adachi, K. & Kobayashi, N. (2008b).** Establishment of reverse genetics system of betanodavirus for the efficient recovery of infectious particles. *J Virol Methods* **151**, 271–276.

- Tan, C., Huang, B., Chang, S. F., Ngoh, G. H., Munday, B., Chen, S. C. & Kwang, J. (2001).** Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *J Gen Virol* **82**, 647–653.
- Tanaka, S., Aoki, H. & Nakai, T. (1998).** Pathogenicity of the Nodavirus Detected from Diseased Sevenband Grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathol* **33**, 31–36.
- Tanaka, S., Mori, K., Arimoto, M., Iwamoto, T. & Nakai, T. (2001).** Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J Fish Dis* **24**, 15–22.
- Tanaka, S., Kuriyama, I., Nakai, T. & Miyazaki, T. (2003).** Susceptibility of cultured juveniles of several marine fish to the sevenband grouper nervous necrosis virus. *J Fish Dis* **26**, 109–115.
- Tang, L., Lin, C.-S., Krishna, N. K., Yeager, M., Schneemann, A. & Johnson, J. E. (2002).** Virus-like particles of a fish nodavirus display a capsid subunit domain organization different from that of insect nodaviruses. *J Virol* **76**, 6370–6375.
- Thiery, R., Raymond, J. C. & Castric, J. (1999).** Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Res* **63**, 11–7.
- Thiéry, R., Cozien, J., Cabon, J., Lamour, F., Baud, M. & Schneemann, A. (2006).** Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *J Virol* **80**, 10201–10207.
- Thiéry, R., Johnson, K. L., Nakai, T., Schneemann, A., Bonami, J. R. & Lightner, D. . (2011).** Family *Nodaviridae*. In *Ninth Rep Int Comm Taxon Viruses*, pp. 1061–1067. Edited by A. M. Q. King, M. J. Adams & E. J. Lefkowitz. Elsevier Academic Press.
- Thiéry, R., Arnauld, C. & Delsert, C. (1999).** Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *J Fish Dis* **22**, 201–207.
- Thiéry, R., Cozien, J., de Boisséson, C., Kerbart-Boscher, S. & Névarez, L. (2004).** Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity. *J Gen Virol* **85**, 3079–3087.
- Thorud, K. E. & Djupvik, H. O. (1988).** Infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 109–111.

- Toffolo, V., Negrisolo, E., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., Colombo, L. & Valle, L. D. (2007).** Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Mol Phylogenet Evol* **43**, 298–308.
- Toranzo, A., Avendaño, R., López-Vázquez, C., Magariños, B., Dopazo, C., Romalde, J. & Barja, J. (2003).** Principales patologías bacterianas y víricas en lenguado cultivado: caracterización de los agentes etiológicos. In *IX Congr Nac Acuic*, 12-16 May, Cadiz, p. 356.
- Tordo, N., Benmansour, A., Calisher, C., Dietzgen, R. G., Fang, R. X., Jackson, A. O., Kurath, G., Nadin-Davis, S., Tesh, R. B. & Walker, P. J. (2005).** Family *Rhabdoviridae*. In *Virus Taxon eighth Rep Int Comm Taxon viruses*, pp. 623–644. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. Academic Press; San Diego; CA.
- Totland, G. K., Grotmol, S., Morita, Y., Nishioka, T. & Nakai, T. (1999).** Pathogenicity of nodavirus strains from striped jack *Pseudocaranx dentex* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, studied by waterborne challenge of yolk-sac larvae of both teleost species. *Dis Aquat Organ* **38**, 169–75.
- Ucko, M., Colorni, A. & Diamant, A. (2004).** Nodavirus infections in Israeli mariculture. *J Fish Dis* **27**, 459–469.
- Vendramin, N., Toffan, A., Mancin, M., Cappellozza, E., Panzarin, V., Bovo, G., Cattoli, G., Capua, I. & Terregino, C. (2014).** Comparative pathogenicity study of ten different betanodavirus strains in experimentally infected European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J Fish Dis* **37**, 371–383.
- Vendramin, N., Patarnello, P., Toffan, A., Panzarin, V., Cappellozza, E., Tedesco, P., Terlizzi, A., Terregino, C. & Cattoli, G. (2013).** Viral Encephalopathy and Retinopathy in groupers (*Epinephelus* spp.) in southern Italy: a threat for wild endangered species? *BMC Vet Res* **9**, 20.
- Venter, P. A. & Schneemann, A. (2008).** Recent insights into the biology and biomedical applications of Flock House virus. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2675–87.
- Vinagre, C., Fonseca, V., Cabral, H. & Costa, M. J. (2006).** Habitat suitability index models for the juvenile soles, *Solea solea* and *Solea senegalensis*, in the Tagus estuary: Defining variables for species management. *Fish Res* **82**, 140–149.

- Wang, L. & Lee, C.-W. (2009).** Sequencing and mutational analysis of the non-coding regions of influenza A virus. *Vet Microbiol* **135**, 239–247.
- Wang, Y.-D., Kung, C.-W. & Chen, J.-Y. (2010).** Antiviral activity by fish antimicrobial peptides of epinecidin-1 and hepcidin 1-5 against nervous necrosis virus in medaka. *Peptides* **31**, 1026–1033.
- Watanabe, K. I., Nishizawa, T. & Yoshimizu, M. (2000).** Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis Aquat Organ* **41**, 219–23.
- Weston, J., Villoing, S., Brémont, M., Castric, J., Pfeffer, M., Jewhurst, V., McLoughlin, M., Rødseth, O., Christie, K. E. & other authors. (2002).** Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease virus and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection. *J Virol* **76**, 6155–63.
- Whittington, R. J., Kearns, C., Hyatt, A. D., Hengstberger, S. & Rutzou, T. (1996).** Spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch (*Perca fluviatilis*) in southern Australia. *Aust Vet J* **73**, 112–4.
- Wi, G. R., Hwang, J. Y., Kwon, M.-G., Kim, H. J., Kang, H. A. & Kim, H.-J. (2015).** Protective immunity against nervous necrosis virus in convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* following vaccination with virus-like particles produced in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Vet Microbiol* **177**, 214–8.
- Wolf, K. & Darlington, R. W. (1971).** Channel catfish virus: a new herpesvirus of ictalurid fish. *J Virol* **8**, 525–33.
- Wolf, K., Snieszko, S. F., Dunbar, C. E. & Pyle, E. (1960).** Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc Soc Exp Biol Med* **104**, 105–108.
- Wu, H.-C., Chiu, C.-S., Wu, J.-L., Gong, H.-Y., Chen, M.-C., Lu, M.-W. & Hong, J.-R. (2008).** Zebrafish anti-apoptotic protein zBcl-xL can block betanodavirus protein alpha-induced mitochondria-mediated secondary necrosis cell death. *Fish Shellfish Immunol* **24**, 436–49.

- Yamashita, H., Mori, K. & Nakai, T. (2009).** Protection conferred against viral nervous necrosis by simultaneous inoculation of aquabirnavirus and inactivated betanodavirus in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *J Fish Dis* **32**, 201–210.
- Yamashita, Y., Fujita, Y., Kawakami, H. & Nakai, T. (2005).** The efficacy of inactivated virus vaccine against viral nervous necrosis (VNN) **40**, 15–21.
- Yoshikoshi, K. & Inoue, K. (1990).** Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J Fish Dis* **13**, 69–77.
- Yuasa, K., Koesharyani, I., Roza, D., Mori, K., Katata, M. & Nakai, T. (2002).** Immune response of humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes) injected with the recombinant coat protein of betanodavirus. *J Fish Dis* **25**, 53–56.
- Yuasa, K., Koesharyani, I. & Mahardika, K. (2007).** Effect of high water temperature on betanodavirus infection of fingerling humpback grouper *Cromileptes altivelis*. *Fish Pathol* **42**, 219–221.
- Zafran, Koesharyani, I., Johnny, F., Yuasa, K., Harada, T. & Hatai, K. (2000).** Viral nervous necrosis in humpback grouper larvae *Chromileptes altivelis* and juveniles. *Fish Pathol* **35**, 95–96.
- Zhang, H., Hale, B. G., Xu, K. & Sun, B. (2013).** Viral and host factors required for avian H5N1 influenza A virus replication in mammalian cells. *Viruses* **5**, 1431–1446.
- Zhong, W. & Rueckert, R. R. (1993).** Flock house virus: down-regulation of subgenomic RNA3 synthesis does not involve coat protein and is targeted to synthesis of its positive strand. *J Virol* **67**, 2716–22.
- Zorriehzahra, M. J., Nakai, T., Sharifpour, I., Gomes, D. K., Chi, S.-C., Soltani, M., Mohd, D., Hj, H., Sharif, R. M. & Saidi, A. A. (2005).** Mortality wild golden mullet (*Liza auratus*) in Iranian waters of the Caspian Sea, associated with viral nervous necrosis like agent. *Iran J Fish Sci* **45**, 43–58.
- Zorrilla, I., Arijo, S., Chabrillon, M., Diaz, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M. C. & Moriñigo, M. A. (2003).** *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *J Fish Dis* **26**, 103–8.

Zorrilla, I., Balebona, M. C., Mori.igo, M. A., Sarasquete, C. & Borrego, J. J. (1999). Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. piscicida, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J Fish Dis* **22**, 167–172.





APÉNDICE





A. CLONACIÓN

I. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

i. Solución Stock ampicilina (50 mg/ml)

Disolver 2,5 g de ampicilina en 50 ml de agua desionizada.

Filtrar

Alicuotar y mantener a -20°C

ii. Preparación de medio LB (1L)

Triptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

Ajustar pH a 7.0

Autoclavar

iii. Placas LB (500 ml)

Preparar medio LB (500 ml)

Triptona 5 g

Extracto de levadura 2,5 g

NaCl 5 g

Agar 10 g

Ajustar pH a 7.0

Autoclavar

Dejar enfriar medio hasta 55°C.

Añadir 1 ml de ampicilina alicuotada (50 mg/ml)

Repartir en las placas

II. OBTENCIÓN DE BACTERIAS *E. COLI* DH5 ELECTROCOMPETENTES.

i. Crecer un cultivo de *E. coli* a 37 °C con agitación vigorosa (200 rpm) utilizando un inóculo saturado fresco (incubado *overnight*) al 1% hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5-0,6.

ii. Después de incubar las bacterias en hielo durante 5 min centrifugar 3.000 × g durante 20 min a 4 °C.

- iii. Vaciar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender en agua bidestilada estéril manteniendo las bacterias en todo momento en hielo. Centrifugar de nuevo.
- iv. Resuspender de nuevo en agua bidestilada y centrifugar.
- v. Vaciar el sobrenadante y resuspender las bacterias en glicerol estéril al 10% a 4 °C.
- vi. Realizar alícuotas de 50 μ l y almacenar a -80 °



B. PREPARACIÓN DE VIRUS SEMIPURIFICADO

I. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

i. Agua bidestilada-DEPC

Añadir al agua bidestilada DEPC (dietil pirocarbonato) al 0.1%.

Incubar en agitación un mínimo de 12h

Autoclavar dos veces

ii. SSC 1×-DEPC a 4 °C

Disolver 5 ml de SSC 20× en 100 ml de agua bidestilada-DEPC

Solución stock de SSC-1 20×, pH 7, (100 ml):

8,8 g Citrato de sodio

17.5 g NaCl

Ajustar pH 7.0

i. Sacarosa 30% en tampón SSC1-DEPC

En matraz aforado se pesan 30 g de sacarosa

Enrasar hasta 100 ml con SSC

Agitar hasta completa disolución

II. SEMIPURIFICACIÓN

- i. Recoger el medio de frascos de E-11 con ECP es extensivo. Realizar dos ciclos de congelación y descongelación.
- ii. Centrifugar a $1.500 \times g$ durante 20 min a 4 °C.
- iii. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y mantener a 4 °C hasta su uso.
- iv. Resuspender el material precipitado con SSC 1×-DEPC y sonicar 3 pulsos de 10 segundos en hielo.
- v. Centrifugar a $1.500 \times g$ durante 20 min a 4 °C, transferir el sobrenadante al tubo del paso iii.
- vi. Ultracentrifugar a $100.000 \times g$ durante 1h a 4 °C en un rotor SW32 Ti (Beckman Coulter).
- vii. Vaciar el sobrenadante, secar las paredes del tubo y resuspender el precipitado en 500 μ l de SSC 1×-DEPC
- viii. Cargar la muestra en un tubo de centrifuga con un lecho de 5 ml de sacarosa 30%

- ix. Centrifugar a $175.000 \times g$ durante 1 h a 4°C en el rotor SW55Ti (Beckman Coulter).
- x. Vaciar el sobrenadante, secar las paredes y resuspender el precipitado en $200\ \mu\text{l}$ de tampón SSC $1\times$ -DEPC, transferir a un tubo nuevo y mantener a -20°C hasta su uso.





