



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

**DESARROLLO DE UNA RT-PCR EN TIEMPO REAL (qRT-PCR) PARA LA
DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA
(IPNV) EN TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

MARÍA DIANA GUERRERO GARCÍA

COMITÉ DE TUTORES

Dr. César Ortega Santana

Dr. Simón Martínez Castañeda

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México Enero 2013

DEDICATORIA

A mi abuela María Luisa Q.P.D.

A mi padre Raúl Guerrero

A mis hijos Iván, Jaime Francisco y Marisol

RESUMEN

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es un patógeno de gran importancia para la salmicultura mundial, y en México fue diagnosticado por primera ocasión en el año 2000; pero actualmente está presente en varios estados del país. Debido a que las vacunas eficaces o medicamentos antivirales no están disponibles para IPNV, la mejora de métodos de diagnóstico diseñados para cepas regionales es el enfoque más adecuado para el control y prevención de la enfermedad. En este sentido, diversas modalidades de la técnica de PCR han resultado un procedimiento prometedor para el diagnóstico, siendo la PCR en tiempo real (qPCR) el proceso considerado de mayor ventaja por su alta sensibilidad, rapidez y confiabilidad.

Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se realizó la estandarización de las técnicas de PCR punto final, multiplex, anidada, PCR en tiempo real (qPCR) y RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) para el aislamiento mexicano de IPNV, utilizando los iniciadores CIESAIPNV (Barrera *et al.*, 2009), DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001) y DIAint (en este trabajo). La sensibilidad analítica de estos protocolos fue determinada a partir de diluciones de plásmidos recombinantes y diluciones de RNA viral extraído a partir de células CHSE-214 infectadas con IPNV, encontrando que utilizando los iniciadores DIAIPN en una PCR punto final, su sensibilidad analítica fue de hasta 10^4 plásmidos, no así los iniciadores CIESAIPNV los cuales mediante una PCR punto final registraron sensibilidad menor de hasta 10^5 plásmidos. La mayor sensibilidad analítica de los iniciadores DIAIPN pudo ser mejorada mediante una PCR anidada, utilizando los iniciadores internos DIAint (en este trabajo) durante la segunda ronda de amplificación obteniendo un rango de detección de hasta 1 plásmido recombinante.

Mediante el uso de la técnica qPCR con los iniciadores DIAint se registró un rango de detección de 10^7 a 10^3 plásmidos, y mediante una RT-PCR en tiempo real utilizando los iniciadores DIAint y diluciones de RNA obtenido a partir de células CHSE-214 infectadas con IPNV, se obtuvo una sensibilidad analítica de hasta 0.086 pg de RNA. Estos resultados destacan que qPCR fue el método más sensible para detectar el genoma de IPNV ya sea a partir de plásmidos o bien de diluciones de RNA, quedando por determinar su eficiencia a partir de muestras de peces y la ubicación de peces portadores asintomáticos, que permita ofrecer una herramienta fundamental para la toma de decisiones rápidas y oportunas para el control y prevención de IPN.

Palabras clave. IPNV. PCR, qPCR, Diagnóstico

ABSTRACT

The virus of infectious pancreatic necrosis (IPNV) is a pathogen of major importance to global salmon farming. It was first diagnosed in Mexico for the first time in 2000 and is now present in several states. Because effective vaccines or antiviral drugs are not available for IPNV, improved diagnostic methods designed for regional strains are the most appropriate approaches for the control and prevention of the disease. In this regard, various modalities of the PCR technique have proved promising for the diagnosis procedure, with the real-time PCR (qPCR) considered the most advantageous process due to its high sensitivity, speed and reliability.

Considering the previous information, the standardization of endpoint PCR, multiplex, nested real-time PCR (qPCR) and RT-real time PCR (qRT-PCR) for Mexican isolated IPNV, using primers CIESAIPNV (Barrera *et al.*, 2009), DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001) and DIAint (in this paper). The analytical sensitivity of these protocols was determined from dilutions of recombinant plasmids and dilutions of viral RNA extracted from CHSE-214 cells infected with IPNV, finding that using the primers in a PCR DIAIPN endpoint, their analytical sensitivity was up to 10^4 plasmids, not the initiators CIESAIPNV which by endpoint PCR showed lower sensitivity up to 10^5 plasmids. The highest analytical sensitivity DIAIPN initiators could be improved by nested PCR using internal primers DIAint (in this paper) during the second round of amplification to obtain a detection range down to 1 recombinant plasmid.

Using the technique with primers DIAint qPCR was a detection range of 10^7 to 10^3 plasmids, and by RT-PCR in real time using the primers DIAint and dilutions of RNA obtained from cells infected CHSE-214 IPNV, analytical sensitivity was 0.086 pg up RNA. These results highlight that qPCR was the most reasonable method for detecting the IPNV genome either from plasmids or dilutions of RNA, resulting in their efficiency being determined from samples of fish and the location of fish that are asymptomatic carriers, thus enabling them to offer a fundamental tool for making quick and timely decisions for the control and prevention of IPN.

Keywords. IPNV. PCR, qPCR, Diagnosis

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.
- Al Dr. César Ortega Santana por brindarme su confianza, pero sobre todo por su dirección e invaluable apoyo para el desarrollo de este trabajo.
- Al Dr. Simón Martínez Castañeda por su dirección en este trabajo.
- A la Dra. Magda Barrera Mejía por su experiencia y muy especial amistad, así como su guía, mostrándome el trabajo grato y bien hecho en un laboratorio de biología molecular.
- A Alicia López Reyes por su experiencia y apoyo técnico para el desarrollo del cultivo celular.
- A todos los Doctores, personal y amigos del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal UAEM, de quienes recibí amistad y apoyo.
- Al Centro de de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal CIESA, UAEM por mi formación profesional y las facilidades brindadas para llevar a cabo este trabajo.
- A mi abuela María Luisa Domínguez Q.P.D. por su amor y presencia en mi vida.
- A mi padre Raúl Guerrero por su gran ejemplo de vida.
- A mis hijos Iván, Jaime Francisco y Marisol quienes son mi mayor satisfacción; gracias por su paciencia, apoyo y alegría constantes.
- A todas mis amigas y amigos quienes fueron fuente de apoyo y fortaleza en todo momento.

CONTENIDO	<i>Pág.</i>
1.- INTRODUCCION GENERAL	1
2.- REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Necrosis Pancreática Infecciosa.....	3
2.2 El virus de necrosis pancreática infecciosa (IPNV).....	4
2.2.1 Taxonomía y clasificación.....	4
2.2.2 Tamaño, estructura y organización genómica del virus.....	5
2.2.3 Patogénesis de la infección por IPNV.....	6
2.2.4 Replicación del virus.....	8
2.3. Diagnóstico de IPNV.....	9
2.4. PCR para el diagnóstico de IPNV.....	13
2. 4.1 PCR punto final.....	15
2. 4.2 PCR anidada.....	17
2. 4.3 PCR multiplex.....	18
2.4.4 PCR en tiempo real.....	19
3.- JUSTIFICACION	23
4.- HIPOTESIS	25
5.- OBJETIVOS	26
6.- MATERIAL Y METODO	27
7.- LÍMITES DE TIEMPO Y ESPACIO	39

	<i>Pág.</i>
8.- RESULTADOS.....	40
9.- DISCUSIÓN GENERAL.....	47
10.- CONCLUSIONES GENERALES.....	51
11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
FIGURA 1. PCR punto final con iniciadores DIAIPN.....	40
FIGURA 2. PCR punto final con iniciadores CIESAIPNV.....	41
FIGURA 3. PCR multiplex con iniciadores DIAIPN y CIESAIPNV.....	41
FIGURAS 4 y 5. PCR anidada con iniciadores DIAIPN y DIAint.....	42
FIGURAS 6 y 7. Sensibilidad analítica de iniciadores CIESAIPNV.....	43
FIGURA 8. Sensibilidad analítica de iniciadores DIAIPN.....	43
FIGURA 9. Sensibilidad analítica de iniciadores DIAint.....	44
FIGURA 10. PCR en tiempo real con iniciadores DIAint.....	45
FIGURA 11. RT-PCR en tiempo real con iniciadores DIAint.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Pág.</i>
TABLA 1. Iniciadores utilizados.....	31

1.- INTRODUCCION GENERAL

En la piscicultura, al igual que en la producción de animales terrestres existe un gran número de enfermedades de diversa etiología; su diagnóstico es de vital importancia para la prevención o control oportunos, con lo que disminuye el riesgo de diseminación o contagio a otros animales o a la población humana. En el contexto sanitario general, las enfermedades de etiología viral se consideran las de mayor importancia e impacto económicos debido entre otras razones a que carecen de un tratamiento efectivo y pueden transmitirse a través de la progenie (Wolf, 1988); asimismo, el diagnóstico suele ser difícil o laborioso ya que instancias internacionales, tales como la Oficina Internacional de Salud Animal (OIE) establecen que el aislamiento viral en cultivos celulares y la identificación del agente mediante inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y la seroneutralización son las técnicas de diagnóstico convencionales para la confirmación viral (OIE, 2006). No obstante otras pruebas como el inmunoensayo (ELISA) y la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés de *Polymerase chain reaction*) también se utilizan (Taksdal *et al.*; 2001, Blake *et al.*, 2005) cuando son pruebas bien validadas.

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es un agente patógeno de gran importancia para la salmonicultura mundial (Wolf, 1988) y en México fue diagnosticado por primera ocasión en el centro del país en el año 2000; la cepa causal fue caracterizada como Buhl, perteneciente al Serogrupo A de los Birnavirus acuáticos, serotipo West Buxton (A1) (Ortega *et al.*, 2002; Nishizawa *et al.*, 2005); sin embargo, actualmente el virus está presente en varios estados de la República Mexicana (Ortega *et al.*, 2007), y debido a la continua introducción de ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de diversos países, es posible que existan otros serotipos del virus. En este sentido, el hecho de no realizar un diagnóstico oportuno y confiable puede representar un problema para controlar la enfermedad.

Tomando en cuenta que el cultivo de células y la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) son procesos de diagnóstico caros y relativamente tardados, la adecuada implementación de la técnica de PCR puede ser una alternativa viable y real ya que puede realizarse en tiempo corto, presentando alta especificidad (Sellon, 2003). Al respecto se ha informado que la PCR es más sensible que la identificación del antígeno viral mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta, citometría de flujo, inmunoperoxidasa, inmunodot blot (Novoa *et al.*, 1995a, 1995b; Rodríguez *etal.*, 2001).

Parte del éxito del diagnóstico mediante el proceso de PCR se basa en la identificación de moléculas blanco (secuencia de nucleótidos), para lo cual se usan iniciadores 100% complementarios a éstas, los cuales se utilizan para la amplificación de partículas de DNA; el diseño de estos iniciadores requiere conocer la secuencia de nucleótidos de las regiones genómicas del virus que son utilizadas para el diagnóstico (Luque y Herráez, 2001; González y Medina, 2001).

Con objeto de lograr una mayor eficiencia en el diagnóstico utilizando las bondades de la técnica, actualmente se han propuesto varias modificaciones al proceso de PCR, tales como: PCR convencional, PCR anidada, PCR multiplex y PCR en tiempo Real (qPCR), de las cuales, actualmente esta última es considerada una prueba con mayores ventajas sobre las otras debido a que es un método práctico con una alta sensibilidad, rapidez y confiabilidad.

Debido a lo anterior, en este trabajo se propone realizar un protocolo de PCR en tiempo real que permita ofrecer un diagnóstico rápido y oportuno, que aunado a estudios epidemiológicos, permita ofrecer una herramienta para el control y prevención de esta enfermedad.

2.- REVISION DE LITERATURA

2.1 Necrosis Pancreática Infecciosa

La necrosis pancreática infecciosa (IPN) es una enfermedad viral sistémica, aguda y altamente contagiosa, que afecta principalmente a los peces jóvenes de especies de salmónidos que viven en condiciones de producción intensiva. Esta enfermedad afecta además a varias especies de agua dulce y peces marinos, moluscos y crustáceos y hasta ahora no ha sido reconocida en mamíferos y humanos.

La susceptibilidad a la enfermedad disminuye con la edad de los animales afectados, la resistencia clínica en peces salmónidos generalmente se alcanza aproximadamente a los 1.500 grados-día, excepto en los salmones del Atlántico (*Salmo salar*), que pueden ser afectados al pasar de agua dulce a agua salada (OIE, 2006).

IPN es la enfermedad de etiología viral de peces de mayor distribución mundial (OIE, 2006), y pese a no estar incluida en la lista de enfermedades de la OIE, es reconocida como la de mayor impacto en el cultivo de salmónidos en la Unión Europea y Noruega (Smail *et al.*, 2006), y en otros países importantes en el cultivo de salmónidos. Oceanía es considerada la única región libre (OIE, 2006).

Clínicamente los peces afectados por IPN manifiestan natación anormal con movimiento en espiral y agitado, intercalado con ataxia. Observándose a la vez exoftalmia, hiperpigmentación y hemorragias petequiales en la superficie ventral. Las lesiones internas incluyen estómago sin alimento pero con contenido seroso (*Bloat*), petequias en vísceras y ascitis con contenido proteináceo (Swanson *et al.*, 1982).

En las crías las lesiones histológicas son indicativas de infección viral aguda, con extensa y progresiva destrucción de las células acinares pancreáticas, escaso

infiltrado inflamatorio, el tejido endocrino y células adiposas circundantes se presentan normales o con escasa necrosis (Wolf, 1988).

En estómago e intestino anterior se producen procesos variables de degeneración y necrosis (Smail *et al.*, 2006), desprendimiento de mucosa (enteritis catarral) hacia el lumen intestinal, en donde se pueden observar células epiteliales con citoplasma hialino eosinofílico e hinchadas, con núcleo generalmente fragmentado formando acúmulos de material basófilo, distribuido en la periferia celular, indicativas de un proceso de apoptosis (células McKnight) (McKnight y Roberts, 1976). En hígado es posible encontrar áreas de necrosis focal o generalizada, las cuales suelen ser más severas en salmón, mientras que en trucha arco iris son más moderadas o poco significativas (Roberts y Pearson, 2005). En riñón se observa degeneración y necrosis hematopoyética en diferentes grados.

2.2 El virus de necrosis pancreática infecciosa (IPNV)

2.2.1 Taxonomía y clasificación

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) fue aislado por primera ocasión en el año de 1957 de la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) en Norteamérica (Wolf, 1988) y desde entonces ha sido considerado un agente infeccioso de gran riesgo en el cultivo de salmónidos.

Este virus pertenece a la familia *Birnaviridae* (Dobos, 1995), la cual presenta tres géneros: *Aquabirnavirus* en el que la especie tipo es IPNV, el género *Aviabirnavirus* donde la especie tipo es el virus de la Bursitis infecciosa (IBDV) que afecta a las aves y el género *Entombirnavirus*, cuya especie tipo es el virus de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Blake *et al.*, 1995; Reno, 1999).

A nivel mundial se han caracterizado más de 200 aislados del IPNV, los cuales se han agrupado en dos serogrupos. El serogrupo A que afecta peces comprende

los serotipos: A1 WB (West Buxton); A2 (Sp); A3 (Ab), A4 (He); A5 TE (Tellina); A6 Can.1; A7 Can.2; A8 Can.3; A9 JA (Jasper); A10 N1. Mientras que el serogrupo B, que no patógeno para peces solo incluye el serotipo TV-1 B1 (Hill y Way, 1995).

2.2.2 Tamaño, estructura y organización genómica del virus

El genoma de la partícula viral madura de IPNV consiste de dos segmentos (A y B) de RNA de doble hebra (dsRNA), contenidos dentro de una cápside icosaédrica sin envoltura de aproximadamente 60 nm de diámetro.

El genoma del segmento A, mide entre 2962 a 3104 nucleótidos (nt) y es funcional y estructuralmente bicistrónico, presenta dos marcos de lectura abiertos (ORF [open Reading frame]); en un ORF mayor presenta 3097 nt que codifican una poliproteína (pp) precursora de 106-kDa, que es cotraduccionalmente escindida por la proteasa viral (VP4) para generar las proteínas mayores de la cápside: pVP2, VP3 y a la propia VP4. (Duncan *et al.*, 1987).

Durante la maduración viral, la pVP2 de 62 kDa es escindida a VP2 (54 kDa) (Villanueva *et al.*, 2004, Song *et al.*, 2005). Las proteínas estructurales VP2 y VP3 integran respectivamente las caras externa e interna de la cápside viral. VP2 es la proteína principal de la cápside externa viral a la cual se dirigen los anticuerpos neutralizantes de tipo específicos, actuando también como proteína de unión a las células (Granzow *et al.*, 1997).

El ORF menor del segmento A, que precede al ORF mayor y lo solapa parcialmente en su extremo aminoterminal, codifica una proteína no estructural de 17 kDa (444 nt), rica en arginina conocida como VP5 por su similitud a la proteína NS de IBDV.

El segmento B de IPNV, presenta un solo ORF de 2731-2784 nt que codifica una sola proteína de 94 kDa, conocida como VP1, que en el virión se encuentra en forma de polipéptido libre (VP1) o covalentemente unida al extremo 5' de ambos

segmentos del RNA genómico (VPg) (Song *et al.*, 2005); que actúa como RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), con función de partidor y polimerasa para la transcripción o síntesis de mRNA y para la multiplicación, participando también en el ensamblaje de la partícula viral (Marver *et al.*, 2003).

2.2.3 Patogénesis de la infección por IPNV

Para establecer la infección, IPNV ingresa a los peces a través de las branquias y la boca, o pasando también por los poros sensoriales del sistema de la línea lateral (Wolf, 1988; Novoa *et al.*, 1995). Recientemente se ha informado que el virus puede ingresar a través de la base de las aletas (Bowers *et al.*, 2008).

Después de un periodo de viremia no detectable, aproximadamente al cuarto día postinfección (pi) se observan áreas de necrosis en páncreas exocrino y otros órganos (Reno, 1999); no obstante, la distribución viral puede ser variable en distintos órganos.

Los peces infectados pueden transmitir virus de forma horizontal mediante fluidos o heces (Billi y Wolf, 1969). La transmisión vertical está comprobada en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y en la trucha café (*Salmo trutta*) (Reno, 1999). Se ha propuesto que la infección vertical también esté asociada a la concentración de partículas virales (Rodríguez *et al.*, 2003).

Durante la enfermedad clínica, la mortalidad es inversamente proporcional a la edad de los animales afectados (Wolf, 1988). En crías que han completado en forma normal la primera alimentación, se pueden alcanzar pérdidas del 70% o más hasta en un periodo de dos meses. Las pérdidas en animales más grandes pueden ser de entre 10% y 20% (Roberts y Pearson, 2005).

Los animales que sobreviven a la enfermedad clínica y los infectados después de los 6 meses de edad se convierten en portadores asintomáticos, representando un riesgo para la salmonicultura y el medio ambiente (Wolf, 1988; OIE, 2006).

En poblaciones naturales de salmónidos, la excreción intermitente del virus de los peces portadores se piensa que es un importante mecanismo por el cual el virus asegura su persistencia endémica. Varios factores, incluyendo la edad, las especies de peces, la temperatura del agua y la cepa el virus, pueden influir en la gravedad de la infección y en el posterior establecimiento del estado portador (McAllister, 1993).

La manifestación clínica de IPN en peces de criaderos se produce principalmente cuando los peces están sometidos a situaciones de estrés asociadas a condiciones adversas del medio ambiente, provocadas por varios mecanismos tales como cambios bruscos de temperatura, mal manejo, densidad de población, deterioro de la calidad del agua (bajo contenido de oxígeno, amonio alto etc.) (Jarp *et al.*, 1994).

Se han demostrado diferencias específicas en la resistencia a las enfermedades entre varias especies de peces y entre los salmónidos. Así, se ha observado que la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) y trucha arco iris son las especies más sensibles a IPN. Además, también se ha reportado que existen variaciones en la resistencia entre variedades cultivadas de trucha arco iris (Hill, 1982; Okamoto *et al.*, 1987 y 1993).

Los aislados de IPNV muestran una amplia variación en el grado de patogenicidad (Wolf *et al.*, 1963). Aislados de alta virulencia causan una mortalidad superior al 90% en alevines de trucha arco iris, pero las cepas no virulentas no causan mortalidad (Sano *etal.*, 1992). El serotipo Sp se considera como el más virulento, mientras que el serotipo Ab muestra un grado de virulencia baja (Jørgensen y Kehlet, 1971). La patogenicidad para el hospedero y el tropismo celular están determinados por la interacción de las proteínas virales (presumiblemente VP2) codificadas por el segmento A del genoma de IPNV (Sano *et al.*, 1992).

2.2.4 Replicación del virus

La multiplicación del virus ocurre en el citoplasma celular; el virus maduro completo o sus proteínas nunca ingresan al núcleo celular (Dobos, 1995). A 22°C de incubación en 16 a 20 horas posinfección (hpi) ocurre un ciclo simple de multiplicación con la manifestación de un efecto citopático (CPE) característico que termina con la destrucción celular (Kuznar *et al.*, 1995).

En células susceptibles, el virus se adhiere en forma específica e inespecífica a polipéptidos de una masa molecular de 100 a 200 kDa de la membrana plasmática celular (Dobos, 1995a), los cuales podrían actuar como receptores del virus (Kuznar *et al.*, 1995). Las partículas saturan estos sitios de unión después de 2 a 3 horas de incubación a 4°C a través de la proteína viral de adhesión VP2 (Dobos, 1995).

La adhesión específica de la partícula viral a los receptores celulares permite su endocitosis. Treinta minutos después de la adsorción, el virus se interna dentro de los compartimentos vesiculares endosomales periféricos de pH ácido (Kuznar *et al.*, 1995). Luego, el ácido nucleico es liberado desde el endosoma al citosol.

Los procesos presentes en los *Birnavirus* después de la endocitosis y previos a la transcripción no son totalmente conocidos. Las moléculas precursoras de la transcripción son capaces de activar las partículas maduras y los complejos de transcripción a través de la cubierta de la cápside, sin un pretratamiento proteolítico previo o degradación del virión (Espinosa y Kuznar, 1997).

Luego de la adsorción, en 2 o 4 hpi se detecta en el medio de cultivo un transcrito intermedio de mRNA viral específico y un ssRNA correspondiente al mRNA. Entre 4 y 6 hpi puede identificarse la progenie viral con dsRNA (Dobos, 1995; Espinoza *et al.*, 2000). El nivel máximo de síntesis de RNA genómico viral en células infectadas se alcanza entre 8 y 10 hpi, correlacionado con la detección del genoma dsRNA. La síntesis de RNA viral disminuye después de 14 a 16 hpi.

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que la proteína VP1 actúa como iniciador y RdRp para que el IPNV realice una transcripción semiconservativa asimétrica sintetizando un RNA de hebra simple (ssRNA), correspondiente al mRNA viral 24S (Dobos, 1995).

En una investigación acerca de la distribución subcelular y temporal de las proteínas VP2 y VP3 en células CHSE-214, Espinoza *et al.* (2000), encontraron que a 6 hpi las proteínas estructurales aparecen distribuidas en el citoplasma, logrando mayor expresión a las 8 hpi.

A las 8 hpi se detecta la partícula primaria o provirión de 66 ± 2 nm de diámetro que corresponde a las formas precursoras inmaduras e incompletamente ensambladas del virus. Esta partícula, que carece de capacidad infectiva es detectada simultáneamente con el RNA de doble hebra y continúa generándose más allá de las 18 hpi, lo cual sugiere que el ensamble del virus inicia tan pronto como la replicación del dsRNA comienza en la célula. Luego de 12 hpi el provirión madura convirtiéndose en virión, esta partícula provista de infectividad reduce su diámetro a 60 nm como parte de los cambios para adquirir una forma compacta y capacidad infectiva (Villanueva *et al.*, 2004).

2.3 Diagnóstico de IPNV

El diagnóstico temprano combinado con estudios de epizootia puede ser una herramienta muy valiosa para controlar las enfermedades virales, evitando el movimiento de las poblaciones infectadas dentro de las granjas, entre las diferentes áreas de un país y entre diferentes países. Dado que las vacunas eficaces o medicamentos antivirales no están aún disponibles para IPNV y para otros virus de peces, la mejora de los métodos de diagnóstico rápidos y sensibles de enfermedades virales es el enfoque más adecuado para evitar la exposición a la infección en las instalaciones de acuicultura (Rodríguez *et al.*, 2003).

El IPNV fue el primer virus que se cultivó *in vitro* en células de tejido de trucha (Wolf *et al.*, 1960). Desde entonces, este procedimiento sigue siendo el más fiable y aceptado para el diagnóstico de las enfermedades virales en peces. Rodríguez *et al.*(2003), indica que los mejores resultados de multiplicación y aislamiento de IPNV son obtenidos en células BF-2 (*Bluegill fry*) y CHSE-214 (*Chinook salmon embryo*).

La OIE en el Manual de Pruebas de Diagnóstico para Animales Acuáticos (2003) valida como Métodos de Análisis Estándar para el diagnóstico de IPNV, el aislamiento del virus en cultivos de células BF-2F, CHSE-214 o RTG-2, seguido de la identificación inmunológica bien por sueroneutralización o inmunoensayo (ELISA) o inmunofluorescencia del virus aislado.

Sin embargo pese a lo anterior y aunque se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico de enfermedades virales, este procedimiento es relativamente costoso y requiere mucho tiempo; no obstante, muchos investigadores todavía consideran que es el método más sensible para el diagnóstico de los virus de peces, con un límite de detección teórica de una partícula viral. Sin embargo, la eficacia de este método, depende de la susceptibilidad de la línea celular (McAllister, 1997).

El método serológico comúnmente utilizado para la identificación del virus es la prueba de neutralización con antisueros policlonales específicos, la cual se considera como una prueba de referencia, ya que es específica, sensible y fácil de interpretar (Lientz y Springer, 1973). Debido a la heterogeneidad de IPNV, se requiere de un antisuero polivalente para su identificación positiva. Sin embargo, para la identificación definitiva de la cepa son necesarios antisueros específicos (Hill *et al.*, 1981). Esta técnica tiene el inconveniente de que no es rápida ya que requiere de 7 a 21 días para obtener resultados confirmatorios (Ahne y Thomsen, 1986).

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) tiene varias ventajas en comparación con las técnicas de aislamiento convencionales, tales como rapidez, especificidad, sensibilidad y reproductibilidad. Sin embargo, es en general

laboriosa y requiere de personal altamente capacitado para la lectura de las muestras teñidas (Rodríguez *et al.*, 2001).

Otros métodos de diagnóstico para IPNV que han sido reportados, incluyen la Técnica de inmunofluorescencia directa, la prueba de la Proteína A-inmunostaphylococcus (ISPA), la prueba de la coagulación, el ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA), inmunoblots y la tinción de células con fosfatasa inmunoperoxidasa (IP) (Rodríguez *et al.*, 2003).

En una evaluación comparativa de cinco métodos serológicos y RT-PCR para la detección de IPNV en peces, Rodríguez *et al.* (2001) indican que la RT-PCR y el análisis de citometría de flujo fueron los métodos más adecuados para la detección de *Birnavirus* de agua dulce y salada en base a su exactitud, rapidez y alta sensibilidad.

La PCR es una técnica de gran alcance diagnóstico usada para amplificar regiones específicas de DNA (PCR) o RNA (RT-PCR) que pueden detectarse fácilmente en geles de agarosa o con sondas de ácidos nucleicos. Esta técnica utiliza dos iniciadores que abarcan la secuencia de un ácido nucleico de interés y una polimerasa termoestable para aumentar exponencialmente la cantidad de ácido nucleico a través de ciclos repetidos de síntesis. Varios autores han demostrado que la RT-PCR es un método de diagnóstico fiable, rápido, sensible y práctico (Novoa *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 2001), que inclusive puede lograr la detección e identificación del virus directamente en tejidos de peces, evitando la necesidad de aislamiento viral. Sin embargo, también se han considerado varias desventajas, como es la optimización de la extracción del ácido nucleico viral de los tejidos y la eliminación de los inhibidores que interfieren con la técnica molecular (Wiedbrauk y Farkas, 1995).

Aunque la OIE en el Manual de pruebas de Diagnóstico para Animales Acuáticos (2006) incluye varios protocolos con sondas de ácido nucleico y PCR como métodos de diagnóstico y confirmativos, este organismo especifica que siempre que sea posible se utilicen como métodos estándar de análisis, técnicas bien

establecidas (por ejemplo el aislamiento del virus). Cuando se empleen estas nuevas técnicas moleculares deberán realizarse cuidadosamente y con especial atención a la inclusión de controles positivos y negativos adecuados.

La mayoría de los ensayos de PCR descritos han sido desarrollados para detectar el gen de la proteína pVP2 de IPNV, ya que es la proteína mayor de la cápside y probablemente el mejor objetivo para la amplificación y detección. La selección de los iniciadores específicos ha sido posible ya que la secuencia de nucleótidos del segmento A del genoma ha sido determinada para la cepa Jasper de IPNV (Duncan y Dobos, 1987), la cepa Sp (Manson, 1992) y la cepa N1 (Havarstein *et al.*, 1990).

La PCR puede detectar el genoma del virus incluso en concentraciones por debajo del límite de detección del cultivo de células y asegura que el virus se detecta incluso si las células sensibles no están disponibles o cuando la muestra es demasiado pequeña para el cultivo celular (Dopazo y Barja, 2002). Una de las principales ventajas de la PCR es la sensibilidad del método, que es teóricamente capaz de detectar una molécula diana única (Clewey, 1989). La sensibilidad para la detección de IPNV se ha demostrado en repetidas ocasiones ser tan alta como 15 fg a 10 pg (López-Lastra *et al.*, 1994; Rimstad *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1997).

Sin embargo, la alta sensibilidad de la PCR también lleva graves inconvenientes, ya que incluso cantidades insignificantes de ácidos nucleicos contaminantes pueden producir falsos positivos. Otros pasos críticos que influyen en la eficacia de la RT-PCR son las siguientes (1) el procedimiento de extracción de RNA viral, (2) la selección de iniciadores adecuados con el fin de garantizar la detección que requiere el serotipo de IPNV y (3) la elección de los protocolos y kits de RT-PCR (Rodríguez *et al.*, 2003).

Los resultados positivos de PCR podrían también no ser concluyentes como diagnóstico en base a que no se garantiza la detección de la presencia de virus infeccioso, pero puede detectar ácidos nucleicos virales desnudos no infecciosos (Alonso *et al.*, 1999). Así mismo el diagnóstico se puede complicar cuando se

considera la vacunación contra el virus con anterioridad (Leong y Fryer, 1993), y en el caso de cuando se aplica en una política de salud de los peces.

Las técnicas de diagnóstico molecular de los peces, deben considerarse en el contexto de la epizootiología de la enfermedad infecciosa, teniendo en cuenta el concepto de la enfermedad y la relación de causalidad (Rodríguez *et al.*, 2003). En este sentido la técnica de PCR resulta ser un procedimiento prometedor para el diagnóstico de la necrosis pancreática infecciosa y otras enfermedades de peces causadas por virus. La técnica muestra por lo menos la misma sensibilidad que el aislamiento en cultivos celulares y se puede aplicar para la identificación de virus previamente aislados o incluso en monocapas infectadas antes de la visualización del CPE, o para la detección del virus directamente en tejidos de peces infectados (Rodríguez *et al.*, 2003).

2.4 PCR para el diagnóstico de IPNV

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue desarrollada por Kary Mullis en 1983, desde entonces ha tenido muchas aplicaciones, una de las principales utilidades ha sido su uso con fines de diagnóstico de enfermedades de distinta etiología, actualmente se usa como una herramienta básica en cualquier laboratorio de diagnóstico, y en ocasiones se ha intentado sustituir a otros métodos convencionales de diagnóstico por este procedimiento relativamente nuevo.

Para el caso de enfermedades de peces, la PCR se ha utilizado para el diagnóstico de la mayoría de los agentes implicados en procesos infecciosos de importancia para esta actividad, incluyendo a la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), existiendo registros de trabajos realizados en diferentes especies y lugares, utilizando variantes en su procedimiento.

Rodríguez *et al.* (2003) mencionan que aunque el uso de la RT-PCR todavía no es utilizado con fines de diagnóstico en virología de peces, su uso es cada vez

mayor para la detección de *Birnavirus* acuáticos (Alonso *et al.*, 1999; Blake *et al.*, 1995; López Lastra *et al.*, 1994; McAllister *et al.*, 1991; Pryde *et al.*, 1993). Respecto de lo anterior, varios investigadores han utilizado la técnica de PCR para identificar virus aislados en cultivos celulares y para confirmar la etiología de los aislados identificados por la prueba de neutralización (Alonso *et al.*, 1999).

Pocos estudios comparativos de métodos de diagnóstico de IPNV se han realizado, Rodríguez *et al.* (2001) evaluó comparativamente seis métodos de diagnóstico utilizando seroneutralización como método de control. Los resultados obtenidos mostraron que solo RT-PCR tuvo una sensibilidad similar a la detección de seroneutralización en los títulos virales más bajos probados (1×10^1 TCID₅₀/ml) y fue aplicado con éxito para el diagnóstico de 83 aislados de IPNV.

Kerr y Kunningam (2006) realizaron un interesante trabajo denominado "*El diagnóstico molecular llevado a la aplicación clínica: un caso de estudio utilizando el virus de la necrosis pancreática infecciosa Serotipo A*". Recurriendo a un método de RT-PCR para la detección de IPNV en salmón del Atlántico como modelo, en este estudio analizaron la optimización y validación requerida para proporcionar un método adecuado para la detección de IPNV a partir de tejido de peces. Concluyendo que se requiere, una extensa optimización para diseñar una PCR para la detección de patógenos de peces a partir de métodos diseñados en el laboratorio. El estudio demostró algunas de las muchas variables que deben ser optimizadas antes de que un ensayo pueda ser completamente validado e ilustra la certificación que se requiere para cumplir con los requisitos de la OIE, siendo de interés para los laboratorios que realizan pruebas clínicas.

Stortsetet *et al.* (2006) llevaron a cabo una comparación entre laboratorios para la detección en reproductores de IPNV mediante métodos de diagnóstico molecular y convencional. Las pruebas de cultivo celular requieren más de tres semanas antes de que los huevos puedan ser liberados de la cuarentena lo que incurre en graves problemas de logística y costos. La viabilidad del método de la prueba de PCR fue evaluada según lo ofrecido por varios laboratorios, dando resultados dispares

entre los laboratorios implicados, llegando a la conclusión de que es necesario estandarizar la conservación de la muestra, el procedimiento de extracción de RNA y la técnica de amplificación, para estimar la sensibilidad y especificidad del método y para validar el rendimiento y robustez del mismo, apoyando así las medidas de control de enfermedades en el cultivo del salmón

2.4.1 PCR punto final

A través del tiempo han sido desarrolladas varias técnicas de PCR, encontrándose entre éstas, la PCR convencional (o punto final), la cual se caracteriza por utilizar un par de cebadores para amplificar una pequeña parte del genoma del agente infeccioso. La sensibilidad analítica es relativamente alta, con un mínimo de 100 a 1.000 copias del genoma detectable. La especificidad analítica también es bastante alta, y tanto la sensibilidad como la especificidad pueden mejorarse mediante la aplicación de la PCR anidada (OIE, 2006).

Blake *et al.* (1995) propusieron un ensayo de PCR con un conjunto de iniciadores que amplifican un segmento de 173 pb de cDNA dentro de la región genómica que codifica para VP3. Los autores la describen como una prueba de diagnóstico rápida (24-48 h) para la detección rutinaria de *Birnavirus* acuáticos directamente en muestras de tejidos de peces con un nivel de precisión y sensibilidad comparable al procedimiento de aislamiento del virus en cultivo celular.

Posteriormente, Novoa *et al.* (1995) aplicaron el mismo protocolo con éxito en homogenizados de riñón de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) infectados experimentalmente con una cepa de Birnavirus originalmente aislados de la misma especie.

Wang *et al.* (1997) detectaron IPNV con una RT-PCR ininterrumpida en un solo tubo, con una sensibilidad de 15 fg de purificado de RNA de IPNV, lo cual correlacionaron a 200 partículas virales.

Taksdal *et al.*(2001) establecieron un protocolo de RT-PCR para la detección de IPNV en portadores asintomáticos de salmón del Atlántico, concluyendo que este método fue más sensible que el aislamiento en cultivo celular, y Ortega *et al.* (2002) utilizaron una RT-PCR para identificar el primer caso detectado en México de IPNV en granjas de trucha arcoíris.

Dopazo y Barja (2002) demostraron que PCR puede detectar virus incluso en concentraciones por debajo del límite de detección del cultivo de células y aseguraron que el virus se detecta incluso si las células sensibles no están disponibles o cuando el tamaño de la muestra es demasiado pequeña para el cultivo celular.

Se ha mencionado que una de las principales ventajas de la PCR es la sensibilidad del método que es teóricamente capaz de detectar una molécula diana única (Clewely, 1989).La sensibilidad para la detección de IPNV se ha demostrado en repetidas ocasiones ser tan alta como 15 fg o 10 pg (López – Lastra *et al.*, 1994; Rimstand *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1997).

Gregory *et al.* (2007) detectaron IPNV mediante una RT-PCR en muestras de agua y sedimentos del medio ambiente en torno de granjas infectadas de salmón del Atlántico en Escocia.

En México Guerrero *et al.*(2008) realizaron un trabajo para la detección y genotipificación de IPNV en trucha arco iris en instalaciones de México. Los aislados fueron identificados inicialmente por microscopía electrónica, y confirmados por ELISA y RT-PCR, uno de estos aislados se obtuvo a partir de truchas asintomáticas.

2.4.2 PCR anidada

Los protocolos de PCR anidada se caracterizan por utilizar dos ciclos de amplificación empleando cuatro cebadores, denominados cebadores externos e internos, donde la primera secuencia es blanco para la segunda. La sensibilidad

analítica típica es de < 10 copias de genoma del agente infeccioso, y la especificidad analítica también aumenta porque, en la PCR anidada cuatro oligonucleótidos tienen que unirse específicamente a las dianas seleccionadas para producir una reacción positiva (OIE, 2006).

La principal desventaja de este protocolo de amplificaciones anidadas es la probabilidad de la contaminación durante la transferencia de los productos de la reacción de la primera ronda al segundo tubo de reacción. Lo anterior se puede evitar ya sea por la separación física en el mismo tubo de la segunda mezcla de PCR de la primera reacción por una capa de aceite mineral, o mediante el diseño de oligonucleótidos con temperaturas de alineación sustancialmente diferentes.

Rimstand *et al.* (1990) desarrollaron una PCR anidada para detectar IPNV en salmónidos. El RNA se extrajo de cultivos celulares y se utilizó para la síntesis de cDNA. Este cDNA obtenido fue utilizado como molde en una PCR anidada donde los iniciadores fueron marcados. La sensibilidad de esta PCR anidada fue de aproximadamente 0.8 pg de RNA de doble cadena. La detección de niveles de 1 pg fueron reportados por López-Lastra *et al.* (1994) en un estudio donde los autores informaron que la PCR anidada detecto peces portadores asintomáticos en muestras de campo, mostrando una sensibilidad de hasta 1 pg de purificado de RNA.

Suzuki *et al.*(1997) mostró una PCR más sensitiva que el aislamiento en cultivo celular. Moya *et al.*(2000) declaró que la PCR anidada es el método más sensitivo para la detección de IPNV en Taksdalet *et al.*(2001).

Pérez-Prieto *et al.* (2001) desarrollaron una PCR anidada que aumentó la sensibilidad de la detección no letal del virus directamente de leucocitos de truchas arco iris portadoras. Posteriormente Rodríguez *et al.* (2003) mencionaron que el acoplamiento de una prueba de amplificación por PCR anidada, utilizando los productos de la primera ronda de amplificación como plantillas, podría mejorar la sensibilidad.

2.4.3 PCR multiplex

La PCR multiplex es una reacción de amplificación en la que dos o más conjuntos de iniciadores específicos para diferentes objetivos se introducen en un mismo tubo. Por lo tanto más de una secuencia única de DNA diana de una muestra, puede ser amplificada al mismo tiempo.

Los iniciadores utilizados en la reacción multiplex deben ser cuidadosamente diseñados para tener temperaturas similares de recocido, lo cual requiere de amplias pruebas empíricas.

En este sentido McAllister *et al.*(1991)demostraron el potencial de una sola RT-PCR para la detección simultánea de diferentes virus de peces (IPNV, VHSV e IHNV). Utilizando esta técnica Williams *et al.*(1999) reportaron sensibilidades de 100,1, y 32 TCID₅₀/ml para la detección simultánea de IPNV, IHNV y VSHV, respectivamente.

Yoshira *et al.* (1998) encontraron un límite de detección de 10⁴ TCID₅₀ml⁻¹ con una RT-PCR multiplex para la detección simultánea de IHNV e IPNV. Alonso *et al.* (1999) demostraron que la PCR es una técnica adecuada para la identificación de dos infecciones virales, IPNV se detectó siempre, pero la amplificación de RNA de IHNV (Necrosis Hematopoyética Infecciosa) no se logró con la misma facilidad en Rodríguez *et al.* (2003).Más recientemente la RT-PCR se ha utilizado para el estudio de interferencia viral IPNV-IHNV en co- infecciones de salmónidos.

A partir de estudios anteriores, se ha establecido que un solo ciclo de replicación de IPNV tarda aproximadamente 24 hrs a 15°C en células CHSE-214 (Villanueva *et al.*, 2004). En vista de ello, algunos investigadores han recomendado el uso del sobrenadante del cultivo celular para RT-PCR después de 24 hpi para lograr el 100% de la sensibilidad en una concentración viral de 1 x10³TCID₅₀/ml (Rodríguez *et al.*, 2001).

De acuerdo a ello, Barrera *et al.*(2009) desarrollaron un método para la detección de IPNV a partir de un cultivo celular de 72 hrs con células CHSE-214 seguido de

una RT-PCR multiplex utilizando tres pares de *primers* en una sola reacción, identificando correctamente concentraciones del virus de 1×10^2 TCID₅₀/ml a las 24 hpi y hasta una concentración de 1×10^{-2} TCID₅₀/ a las 72 hpi, obteniendo un mejor resultado que CPE e IFAT en el mismo periodo de tiempo.

2.4.4 PCR en tiempo real

Una vez que la fiabilidad de la prueba de PCR como herramienta de diagnóstico se demostró, varios estudios han participado en los protocolos de pruebas para evitar la amplificación del virus mediante cultivos celulares. Así, en la última década, se han realizado importantes investigaciones para IPNV, basadas tanto en las técnicas convencionales, como en las nuevas tecnologías como lo es PCR en Tiempo Real (qPCR).

La PCR convencional es una técnica poderosa que permite la amplificación exponencial de secuencias de DNA, sin embargo, después de la amplificación, se utiliza un gel de electroforesis para analizar los productos amplificados, y esto hace que el proceso consuma tiempo, ya que la reacción debe terminar previa al análisis, para determinar la presencia o ausencia de la secuencia blanco, y no siendo este análisis de tipo cuantitativo.

Por su parte, la PCR en tiempo real supera este problema, debido a su capacidad para medir los amplicones de la PCR desde los estadios tempranos de la reacción y ellos son acumulables en una “*Detección en tiempo Real*” de modo que los productos de PCR son medidos en la reacción desde que se encuentra en la fase exponencial.

La PCR en tiempo real permite la detección y medición cuantitativa de los productos generados durante cada ciclo del proceso de PCR que son directamente proporcionales a la cantidad del ADN molde presentes en la muestra antes del inicio del proceso de PCR. El principio químico requiere el uso de un método para detectar el producto formado en cada ciclo y de un termociclador que está

adaptado para registrar los resultados obtenidos encada amplificación-ciclo de una manera en tiempo real. Esto se hace a través del uso de fluorocromos no específicos como lo es SYBR® Green I o bien de sondas moleculares dependientes de la secuencia.

La técnica de PCR en tiempo real se ha utilizado en los últimos tiempos para IPNV con varios fines, como son los estudios de las relaciones filogenéticas, la expresión genética, la respuesta inmune del hospedero, el desarrollo de vacunas génicas entre otros temas; sin embargo, esta técnica se ha incorporado escasamente al diagnóstico, a pesar de sus grandes ventajas de ser un método confiable, con óptima sensibilidad, rápido y práctico, que no involucra los problemas de contaminación de la PCR convencional.

Bowers *et al.* (2007) desarrollaron una qRT-PCR altamente sensible y específica usando el colorante SYBR® Green I para la detección y cuantificación de IPNV en trucha arcoíris, los iniciadores utilizados fueron basados en la proteína no estructural NS o VP4. El virus fue detectado con éxito en aleta pectoral, bazo y muestras de tejido de riñón. La carga viral de IPNV en tejido de aleta pectoral fue comparable a la de bazo y riñón, lo que indicó que este podría ser utilizado como un método no letal para la detección o cuantificación de IPNV.

Hope *et al.* (2011) realizaron una *“Comparación de la RT-PCR cuantitativa con cultivos celulares para detectar infecciones del Virus de la septicemia hemorrágica (VHSV) IV en los Grandes Lagos”*; el ensayo se realizó con un RNA de entrada de 50 a 1.000 ng por ensayo y funcionó con igual eficiencia con RNA obtenido a partir de una columna o basado en el método fenol-cloroformo.

En peces capturados en la naturaleza, el 97% de los casos se encontró que qRT-PCR es tres órdenes de magnitud más sensible que cuando se utiliza cultivo de celular. De 1.428 peces de los Grandes Lagos en los Estados Unidos de Norteamérica probados entre 2006 y 2007, el 24% fueron positivos por qRT-PCR, mientras que sólo el 5% fueron positivos por cultivo celular. Todos los peces que fueron positivos por cultivo celular también fueron positivos por qRT-PCR. Lo

anterior indica que el ensayo de qRT-PCR es particularmente valioso para preselección rápida y de alto rendimiento de los peces antes de las pruebas de confirmación por cultivo celular o la secuenciación derivadas de amplicones de tejido y especialmente en la detección de la infección en los peces que no presenten signos clínicos de VHS.

Eissler *et al.* (2011) desarrollaron un método para la “*Detección y cuantificación de cepas chilenas del virus de la necrosis pancreática infecciosa por una RT-PCR en tiempo real usando el segmento B como objetivo*”. Con los iniciadores utilizados fue posible detectar aislados virales pertenecientes a los genogrupos 1 y 5, provenientes de distintas localidades relacionadas con el cultivo de peces, logrando detectar virus pertenecientes a genogrupos de *Aquabirnavirus* distantes.

La aplicación de la PCR depende de la secuenciación de los genes, las regiones escogidas para la producción de los iniciadores complementarias deben ser únicas dentro de la gama genotípica del patógeno; en muchas ocasiones estos cebadores o el protocolo completo han sido desarrollados para cepas o agentes de otros lugares distintos a donde son aplicados. Se ha demostrado que existen diferencias de sensibilidad del diagnóstico utilizando distintos protocolos de PCR, incluso cuando se trabaja con un mismo microorganismo, siendo necesario en ocasiones implementar procesos o protocolos encaminados a realizar el diagnóstico de cepas regionales y del laboratorio donde es aplicado.

Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se desarrolló y se estandarizó una qRT-PCR utilizando SYBER green I, para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en la cepa de referencia de México Buhl Serogrupo A serotipo West Buxton (A1)(Ortega *et al.*, 2002; Nishizawa *et al.*, 2005), para contribuir a la rápida detección del virus, como a la detección de bajos títulos virales, y contribuir así en la implementación de programas de bioseguridad y en el control de la enfermedad en la truiticultura de México.

3.- JUSTIFICACIÓN

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es responsable de causar una enfermedad que típicamente afecta a especies salmonídeas, la cual se ha convertido en la enfermedad más importante para la acuicultura en México. Esta patología y el virus fueron identificados y confirmados inicialmente en el año 2000 (Ortega *et al.*, 2002), y posteriormente han sido diagnosticados de manera frecuente en varias regiones productoras de trucha del país (Guerrero *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2007).

El diagnóstico de IPNV está bien estandarizado en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la UAEM, basado en los procedimientos de diagnóstico del Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos de la Oficina internacional de salud animal (OIE, 2006), en donde se establece que la prueba estándar consiste en el aislamiento del virus en cultivos de células, seguido de la identificación inmunológica, por sueroneutralización, inmunofluorescencia o por inmunoensayo (ELISA), un procedimiento que se considera que es relativamente caro y tardado.

Recientemente, la OIE ha estimado que la técnica de PCR también puede ser considerada como una técnica de diagnóstico confirmatoria cuando esté bien validada, ofreciendo gran sensibilidad, y con la ventaja de tener mayor rapidez para el diagnóstico oportuno. Sin embargo, el uso de esta técnica a partir de tejido ha mostrado variaciones, por lo que es necesario desarrollar una técnica confiable, que permita la detección inclusive de bajos títulos virales, como se presentan en el caso de animales en estado de portador. El éxito en la implementación de este procedimiento de diagnóstico puede revelar a tiempo los factores de riesgo en forma temprana, permitiendo así establecer y ejecutar medidas sanitarias de control y prevención oportunas.

Siendo necesario además, realizar protocolos que sean eficientes para los agentes regionales, asegurando su detección mediante la validación de la sensibilidad y especificidad de los iniciadores utilizados, así como las condiciones del ensayo y equipo.

Una alternativa para el diagnóstico de IPNV es la técnica de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR), la cual presenta varias ventajas sobre otras técnicas de diagnóstico, como es su alta sensibilidad, su facilidad de empleo, la mayor rapidez y lectura al momento, además de representar menor riesgo de contaminación, por lo que a nivel global este proceso está ofreciendo una mejor alternativa que el RT-PCR convencional para el diagnóstico precoz de IPNV y otras enfermedades de distinta etiología y en distintas especies animales. Dadas sus bondades, es necesario implementar el protocolo de qRT-PCR para atender la demanda de un servicio rápido y confiable en apoyo al método convencional, establecido por la OIE para diagnóstico de enfermedades virales de peces.

4.- HIPÓTESIS

El proceso de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) ofrece una mayor sensibilidad que la RT-PCR punto final para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

5.- OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar un protocolo de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) utilizando los iniciadores DIAint (*en este trabajo*) para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en células de cultivo *Chinook salmon embryo*(CHSE-214) infectadas con la cepa de referencia de México de IPNV.

Objetivos Específicos

- Analizar la sensibilidad analítica de los protocolos de PCR punto final con los iniciadores CIESAIPNV (Barrera *et al* 2009), DIAINP (Taksdal *et al.*, 2001) y PCR anidada con los iniciadores DIAint (*en este trabajo*).
- Determinar la sensibilidad analítica de qPCR desarrollada a partir de diluciones de plásmidos, conteniendo un inserto de 223 pb correspondiente a la región del genoma NS-VP3 de IPNV, utilizando los iniciadores DIAint.
- Estandarizar un protocolo de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) con SYBR Green I utilizando los iniciadores DIAint (*en este trabajo*), diseñados para reconocer un segmento de 136 pb dentro del segmento A del virus IPNV.
- Determinar la sensibilidad analítica de qRT-PCR desarrollada a partir de diluciones de RNA obtenido a partir del sobrenadante de cultivo celular con células CHSE-214 inoculadas con IPNV, utilizando los iniciadores DIAint.

6.- MATERIAL Y MÉTODO

Material Biológico

- Células de cultivo.-Línea celular (CHSE-214) *Chinook salmon embryo*.
- Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).- cepa de referencia de México, correspondiente a la cepa Buhldel Serogrupo A, serotipo West Buxton (A1) (Ortega *et al.*, 2002; Nishizawa *et al.*, 2005).
- Muestras biológicas obtenidas de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de distintos lugares del país.
- Células competentes JM109de *Escherichia coli*Promega

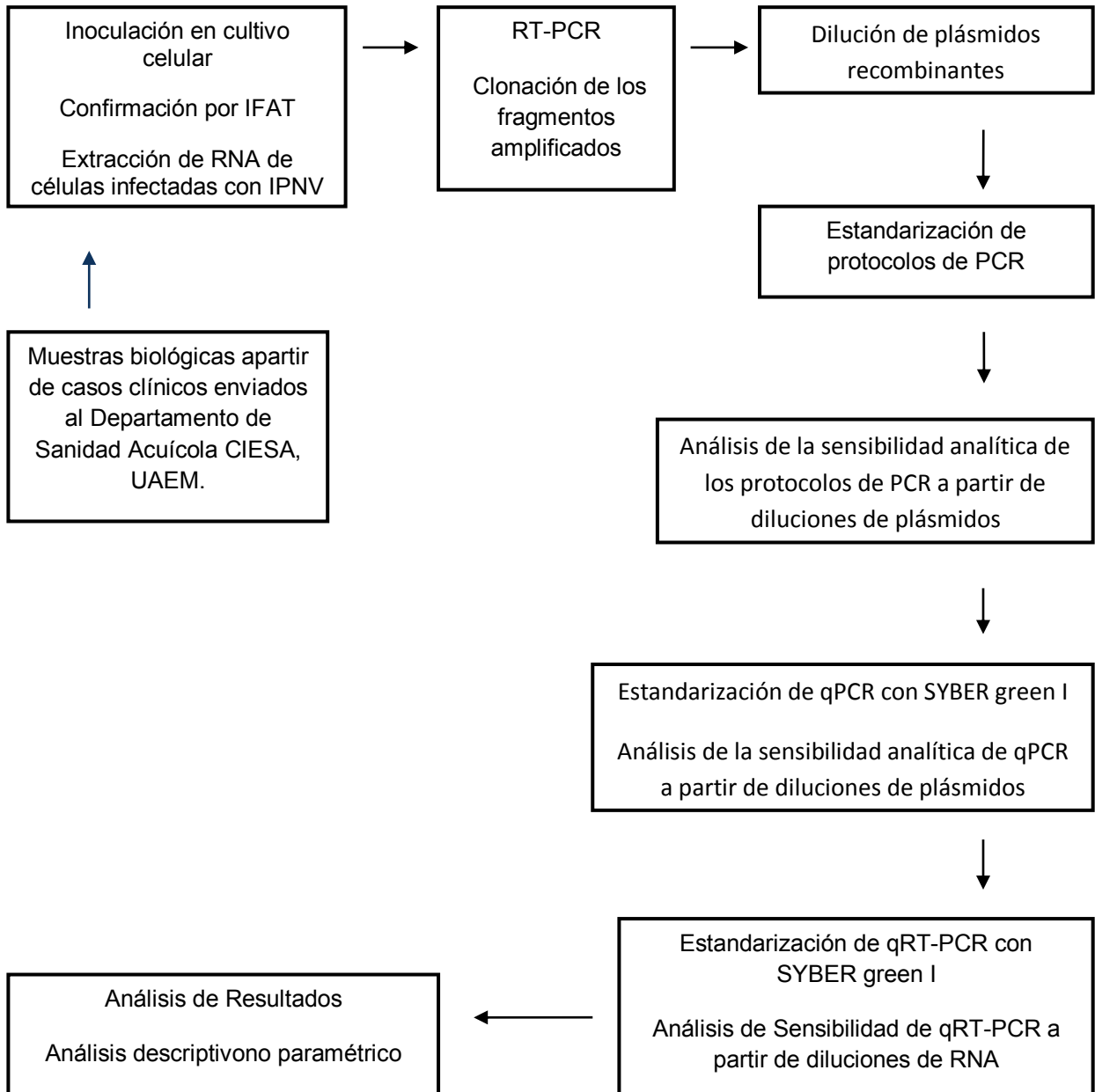
Reactivos

- Medio de cultivo Luria Bertani (LB)
- Ampicilina-estreptomicina Gibco
- Aislamiento del DNA plasmídico Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System
- Medio MEM (Minimum Essential Medium) Gibco
- Suero fetal bovino (FBS) Gibco
- Kit para diagnóstico de IPNV por Inmunofluorescencia indirecta. Indirected-IPNV-Fluorescent Kit (BIOSCHILE; Santiago de Chile, Chile)
- Kit de extracción de RNA. RiboPure™ Kit Ambion®

- RT-PCR.- Kit AccessQuick RT-PCR System (Promega)
- Kit de purificación de productos de PCR, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- Vector de clonación pGEM®-T (Promega)
- PCR *GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega)*
- qRT-PCR.- Kit GoTaq 1-Step RT- PCR System (Promega)
- qPCR.- Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- Iniciadores (indicados en Tabla No.1)
- Agarosa (Promega)

Método

La ejecución del presente trabajo se llevó a cabo de acuerdo a las siguientes etapas:



Muestras biológicas

Las muestras biológicas de truchas arco iris fueron obtenidas a partir de casos clínicos provenientes de granjas acuícolas de diferentes lugares del país, y enviados al Departamento de Sanidad Acuícola del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), UAEM. De estos peces se obtuvieron los siguientes órganos: hígado, riñón y bazo, los cuales fueron mezclados para obtener 1 g de muestra que fue colectada en tubos conteniendo 9 ml de medio de cultivo *Minimum Essential médium* (MEM), suplementado con sales de *Earle's*, 2% de FBS, 400-IU/ml de penicilina y 400 mg/ml de estreptomicina (Gibco) en una dilución 1:10 (muestra: medio). Posteriormente, las muestras fueron maceradas en mortero con arena estéril, centrifugadas a 2000-4000 X de gravedad por 15 min a 5°C, y filtradas a través de una membrana de 2.0 µm (milipore)(Anexo1).

Células de cultivo

Para el estudio, se utilizaron células inmortalizadas de la línea celular *Chinook salmon embryo* (CHSE-214) tanto para el aislamiento, identificación, propagación y cuantificación de los virus. Las células se cultivaron en medio MEM suplementado con sales de Eagle y un 10% de suero fetal bovino (FBS) ,100 unidades internacionales (UI) de penicilina/ml, y 100 mg de estreptomisina/ mL a 20°C en microplacas de 24 pozos (Anexo 2).

Inoculación del IPNV

Las diferentes soluciones filtradas fueron diluidas 1:10 y 1:100, y posteriormente 100 µl de cada dilución se inoculó en los pozos de las microplacas conteniendo monocapas de células con un 90% de confluencia. Para esto, el medio de cultivo

fue retirado de cada pocillo y se depositaron 100 µl de muestra y se dejó en adsorción a 15°C durante una hora; pasado este tiempo a cada pozo se le añadió 1 mL de medio de mantenimiento, continuando la incubación a 15°C hasta completar el efecto citopático (CPE). Se inocularon también muestras de control positivas y negativas para cada etapa del trabajo.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT)

Para comprobar que el efecto citopático(CPE)observado en los cultivos de células inoculadas con el aislado correspondió a infección por IPNV, se realizó la identificación inmunológica por medio de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) utilizando el Kit Indirected-IPNV-Fluorescent (BIOSCHILE; Santiago de Chile, Chile), de acuerdo a las instrucciones del fabricante(Anexo 3)

Iniciadores

Para este trabajo se utilizaron tres pares de iniciadores conforme a la siguiente tabla:

Tabla No. 1.- Iniciadores utilizados en este estudio para estandarizar y analizar los protocolos de PCR para IPNV.

Primers	Secuencia (5´-3´)	Largo del Fragmento (pb)	Posiciónen el genoma	Región codificada	Fuente
CIESAIPNV	F:GACATCGTGA ACTCCACAAC R: AACTATGCCAAGATGATCC	516	F:810-829 R:1308-1326	VP2	(Barrera <i>et al.</i> , 2009)
DIAIPN	F: ATCTGCGGTGTAGACATCAAAG R: TGCAGTTCTCGTCCATCCC	223	F:2121-2142 R:2325-2344	NS-VP3	(Taksdal <i>et al.</i> , 2001)
DIAInt	F: CCATGAACACGGGCTGCCCC R: AGAGCGGAGCCCTACCAAGTGC	136	F:2154-2174 R:2258-2237	NS-VP3	(<i>en este trabajo</i>)

El par de iniciadores CIESAIPNV Barrera *et al.*,(2009) amplifican para un fragmento de 516 pb del gen *VP2** del segmento A del genomaviral y están basados en la secuencia de nucleótidos del aislado mexicano prototipo de IPNV (GenBank número de acceso AF537289), clasificado dentro del serotipo A de los *Birnavirus* acuáticos serotipo West Buxton(A1). La secuencia del iniciador Forward es 5'-GACATCGTGAAGTCCACAAC-3' entre la posición 810 y 829 del gen, y la secuencia del iniciador Reverse 5'-AACTATGCCAAGATGATCC-3' entre la posición 1308 y 1326.

Los iniciadores DIAIPN reportados por Takasdal *et al.*, (2001) amplifican un fragmento de 223 pb del gen *NS/VP3** del segmento A del genoma. La secuencia del iniciador Forward es 5'-ATCTGCGGTGTAGACATCAAAG-3' entre la posición 2121y 2142y del iniciadorReverse5'-TGCAGTTCCTCGTCCATCCC-3' entre la posición 2325 y 2344.

Los iniciadores DIAint (en este trabajo) fueron diseñados para el presente trabajo, y amplifican un fragmento de 136 pb ubicados entre *NS/VP3** en una secuencia interna al fragmento de los iniciadores DIAIPN Taksdal *et al.*, (2001). La secuencia del iniciador Forward es 5'-CCATGAACACGGGCTGCCCC-3' entre la posición 2154 y 2174 y del iniciador Reverse 5'-AGAGCGGAGCCCTACCAGTGC-3' entre la posición 2258 y 2237.

Extracción de RNA viral.

La extracción de RNA a partir del sobrenadante de cultivo celular con células CHSE-214 inoculadas con IPNV, se realizó con la técnica de Trizol LS (INVITROGEN) (Anexo 2), y mediante RT-PCR fue obtenido el cDNA para su clonación. La extracción de RNA para realizar el análisis de sensibilidad de la qRT-PCR se obtuvotambién a partir del sobrenadante de cultivo celular con células CHSE-214 inoculadas con IPNV,y para ello fue utilizado elQIAamp Viral RNA Mini Kit de QUIAGEN (Anexo 4) de acuerdo a instrucciones del fabricante.

RT-PCR punto final

La RT-PCR punto final se realizó con el Kit Access Quick™ RT-PCR System de Promega, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando los iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001) e iniciadores CIESAIPNV (Barrera *et al.*, 2009) y las siguientes condiciones: 25µl de Access Quick Master Mix 2x, 1µl (10Mm) de cada iniciador, 1 µl (5 unidades) de RT del virus de la mieloblastosis aviar, 5 µl (0.5 µg) de RNA y Agua libre de nucleasas añadida para obtener un volumen final de 50µl. Esta reacción fue corrida en un termociclador marca Techne TC-312 utilizando las siguientes condiciones: 45°C por 45 min, 94°C por 10 min, 30 ciclos de 94°C por 4 s, 57°C por 45 s y 72°C por 60 s; y un ciclo final de 72°C por 5 min (Anexo 5).

Construcción de plásmidos con regiones genómicas del IPNV

Una vez amplificados los fragmentos de interés, se extrajeron del gel de agarosa y se purificaron con el KitQI Aquick Gel Extracción (Anexo6)y posteriormente se clonaron molecularmente utilizando pGEM®-T Vector Systems de Promega de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo7)y fueron transformadas en células competentes incluidas en el Kit. Los plásmidos recombinados fueron purificados utilizando el sistema de purificación Wizard® Plus Minipreps DNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Obtención de las condiciones de amplificación para cada par de iniciadores por PCR punto final

Los protocolos de PCR punto final fueron estandarizados con el KitGoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) definiendo en esta etapa las concentraciones óptimas de los reactivos y condiciones del equipo.

Utilización de los iniciadores DIAIPN

Utilizando los iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001), y como DNA blanco plásmidos conteniendo el fragmento de 223 de los iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001), las condiciones óptimas para la reacción de PCR fueron estandarizadas realizando ensayos con las concentraciones 0.5, 1.0 1.5 y 2 μl de MgCl_2 , 1 y 2 μl de DNA y 28 y 30 ciclos de amplificación.

Quedando las concentraciones óptimas como sigue: 5 μl (0.5 μg) de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, 1.5 μl de solución de MgCl_2 , 1 μl de Mix de nucleotidos PCR, 1 μl (10mM) de cada iniciador, 0.25 μl de GoTaq® DNA Polymerase, 1 μl solución de plásmidos conteniendo el inserto de DNA y Agua libre de nucleasas añadida para producir un volumen final de 25 μl ; y las condiciones en termociclador marca Techne TC-312 fueron: 95°C por 45 min, 28 ciclos de 95°C por 45 s, 57°C por 45 s y 72°C por 45 s; y un ciclo final de 72°C por 10 min.

Utilización de los iniciadores CIESAIPNV

Utilizando los iniciadores CIESAIPNV (Barrera *et al.*, 2009), y como DNA blanco plásmidos conteniendo el inserto de 516 pb de los iniciadores CIESA (Barrera *et al.*, 2009), las condiciones óptimas para la reacción de PCR fueron estandarizadas realizando ensayos con concentraciones de 0.5, 1.0 1.5 y 2 μl de MgCl_2 , 0.5, 1 y 2 μl de DNA y temperaturas de alineación de 54°, 55°, 56°, 57°, 58° y 59°C.

Las concentraciones fueron optimizadas como sigue: 5 μl (0.5 μg) de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, 1.5 μl de solución de MgCl_2 , 1 μl de Mix de nucleotidos PCR, 1 μl (10mM) de cada iniciador, 0.25 μl de GoTaq® DNA Polymerase, 1 μl solución de plásmidos conteniendo el inserto de DNA y Agua libre de nucleasas añadida para producir un volumen final de 25 μl . Y las siguientes condiciones en el termociclador marca Techne TC-312 fueron: 95°C por 10 min, 30 ciclos de 95°C por 45 s, 55°C por 45 s y 72°C por 45 s; y un ciclo final de 72°C por 10 min.

Utilización de los iniciadores DIAIPN y CIESAIPNV

Utilizando los iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001) y CIESAIPNV (Barrera *et al.*, 2009) y como DNA blanco plásmidos conteniendo el inserto del fragmento de 223 pb los iniciadores DIAIPN y plásmidos conteniendo el inserto de 516 pb de los iniciadores CIESAIPN. Se llevaron a cabo los siguientes ensayos para estandarizar una PCR Multiplex con ambos pares de iniciadores: uso de las concentraciones de 3 y 4 μ l de $MgCl_2$ y 1 y 2 μ l de DNA.

Las concentraciones fueron optimizadas como sigue: 5 μ l (0.5 μ g) de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, 4 μ l de solución de $MgCl_2$, 1 μ l de Mix de nucleótidos PCR, 1 μ l (10mM) de cada iniciador DIAIPNV, 1 μ l (10mM) de cada iniciador CIESAIPNV, 0.25 μ l de GoTaq®DNA Polymerase, 1 μ l de la solución con plásmidos conteniendo el inserto de DIAIPN, 1 μ l de la solución con plásmidos conteniendo el inserto de DIAIPN y Agua libre de nucleasas añadida para producir un volumen final de 25 μ l. Y las siguientes condiciones en el termociclador marca Techne TC-312 fueron: 95°C por 10 min, 30 ciclos de 95°C por 45 s, 57°C por 45 s y 72°C por 45 s; y un ciclo final de 72°C por 10 min.

Utilización de iniciadores DIAint

Utilizando el producto de la primera amplificación de PCR con los iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001), como DNA blanco para la segunda ronda de amplificación con los iniciadores DIAint (en este trabajo). Las condiciones óptimas para la reacción de PCR anidada fueron estandarizadas realizando los siguientes ensayos: 1.5 μ l $MgCl_2$, 1.2 y 3 μ l DNA con 63°C de temperatura de alineación y 30 ciclos de amplificación. Con 1.0 μ l $MgCl_2$, 2 μ l de DNA de la primera amplificación con las diluciones 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35 μ l y 63°C de temperatura de alineación y 30 ciclos de amplificación.

Resultando las condiciones estandarizadas como sigue: 5 μ l (0.5 μ g) de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, 1.5 μ l de solución de $MgCl_2$, 1 μ l de Mix de nucleótidos

PCR, 1 μ l (10mM) de cada iniciador, 0.25 μ l de GoTaq® DNA Polymerase, 1 μ l de la dilución 1:35 del producto de la primera amplificación y Agua libre de nucleasas añadida para producir un volumen final de 2 μ l. La reacción fue corrida en un termociclador utilizando las siguientes condiciones: 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 63°C por 30 s y 72°C por 30 s; y un ciclo final de 72°C por 5 min.

Determinación de la sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica de la PCR fue establecida a través de diluciones de plásmidos recombinantes de acuerdo al método de Cale *et al.*, (1998). El cual se basa en que cada uno de los plásmidos posee un fragmento clonado del virus y es considerado como una partícula viral, debido que existe al menos un blanco para la hibridación de iniciadores; obteniéndose a partir de ello diluciones que contenían desde una posible partícula viral, 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ y 10¹⁰ partículas virales. Se realizó en cada dilución los protocolos de PCR punto final con los iniciadores CIESAIPN (Barrera *et al.*, 2009) y DIAIPNV (Taksdal *et al.*, 2001), llevando a cabo el análisis de la sensibilidad analítica y el rango de detección. El análisis de la sensibilidad analítica de la PCR anidada se efectuó realizando la segunda ronda de amplificación con los iniciadores DIAint, a partir de los productos de las PCR puntos finales realizadas en las diluciones 1 a 10¹⁰ con los iniciadores DIAIPN.

Geles de Electroforesis

Los productos del proceso de PCR punto final se amplificaron para su evidencia, análisis y cuantificación mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y 3%, conteniendo bromuro de etidio (1 μ g/mL). Los geles conteniendo las muestras fueron sometidos a 120 Voltios por 35 min, y después de esto fueron examinados con un transiluminador de luz ultravioleta marca MiniBIS Pro DNR Bio- Imaging

System para evidenciar su presencia y cantidad relativa de los fragmentos buscados.

PCR en tiempo real (qPCR)

Para la determinación de la sensibilidad analítica de la PCR en tiempo real (qPCR) utilizando SYBR Green I, y con los iniciadores DIAint a partir de diluciones de plásmidos, la reacción fue en una primera parte optimizada utilizando el Kit Power SYBR® Green PCR Master Mix de Applied Biosystemsconteniendo:15 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (2X),1 µl iniciador *Forward*,1 µl iniciador *Reverse*, 1 µl de DNA (plásmidos en diluciones 10^{10} a 1 conteniendo el inserto de 223 pb los iniciadores DIAIPN),agua libre de nucleasas para un volumen final de 25 µl. Las amplificaciones fueron corridas en un Termociclador marca Line-gene K Real-time PCR; el perfil utilizado fue 96°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 96°C por 30 s, 63°C por 30 s y 72° por 30 s. Posteriormente la sensibilidad analítica fue probada a partir de la serie de diluciones de plásmidos de 10^{10} a 1, conteniendo el inserto de 223 pb de los iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001).

Para la estandarización de la qRT-PCR conSYBR Green I, se utilizó el Kit GoTaq 1-Step RT-q PCR System de Promegay la reacción fue ajustada a partir de RNA de IPNV obtenido a partir del sobrenadante del cultivo celular con células CHSE-214, como sigue: 25µl deGoTaq® qPCR Master Mix2X, 5µl del iniciador *Forward*,5µl del iniciador *Reverse*, 5µl GoScript™ RT Mix for 1-StepRT-qPCR, 50X, 10µl de RNA y Agua libre de nucleasas para un volumen final de 50µl.

La sensibilidad analítica de la qRT-PCR fue medida utilizando RNA obtenido a partir de las siguientes concentraciones decrecientes (en diez órdenes de magnitud cada vez): 8559 pg, 850.5 pg, 85.5 pg, 8.5 pg, 0.85 pg y 0.085 pg, las concentraciones de RNA fueron determinadas utilizando un espectrofotómetro marca Quawell Q5000 UV- Visspectrophotometer

Análisis de resultados

Los resultados fueron evaluados en las PCR en punto final por la presencia o ausencia de la amplificación de la región genómica de interés, y analizados de forma descriptiva. En la PCR en tiempo real (qPCR) de acuerdo a los valores de las intersecciones de los ciclos de umbral Ct (*Cyclethreshold*), las cuales representan el punto de cruce de las curvas con el umbral de detección, permitiendo la cinética determinar un Ct para cada concentración, y en la RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) se establecieron las curvas de amplificación de las distintas concentraciones de RNA.

7.- LÍMITES DE TIEMPO Y ESPACIO

El presente trabajo se llevó a cabo a partir de la aprobación del Protocolo, en los meses de enero de 2011 a junio de 2012, como a continuación se detalla:

ACTIVIDAD	AÑO	PERIODO
Elaboración de Protocolo	2010	Agosto-Diciembre
<ul style="list-style-type: none">• Estandarización de protocolos de PCR punto final.• Evaluación de la sensibilidad Analítica a partir de diluciones de plásmidos.	2011	Enero-Junio
<ul style="list-style-type: none">• Estandarización de PCR en Tiempo Real (qPCR).• Evaluación de la sensibilidad Analítica a partir de diluciones de plásmidos.	2011	Agosto-Diciembre
<ul style="list-style-type: none">• Estandarización de RT-PCR en Tiempo Real (qRT-PCR).• Evaluación de la sensibilidad Analítica a partir de diluciones de RNA. Elaboración de Tesis y Artículo	2012	Enero-Junio
Examen de Grado	2013	Enero

Este trabajo se realizó en los Departamentos de Sanidad Acuícola y de Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México. (Km 14.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca. Ciudad, Toluca, México).

8.- RESULTADOS

PCR punto final

Los resultados obtenidos a partir de los procesos de PCR punto final utilizando los iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2009) y CIESAIPNV (Barrera *et al.*, 2009) para la amplificación de plásmidos recombinantes de IPNV, indican que ambos protocolos logran una buena amplificación cuando se usan de forma individual.

En la figura 1 se muestra el producto de 223 pb amplificado eficientemente por las iniciadores DIAIPN; mientras que los iniciadores CIESAIPNV también muestran eficiencia para amplificar un producto de 516 pb (Fig2). Sin embargo al utilizar ambos pares de iniciadores en forma simultánea en una PCR multiplex (Fig. 3), en forma semicuantitativa se observó que la banda generada por los iniciadores DIAIPN es de mayor expresión que la que es producto del proceso con los iniciadores CIESAIPNV que amplifican una banda de 516 pb.

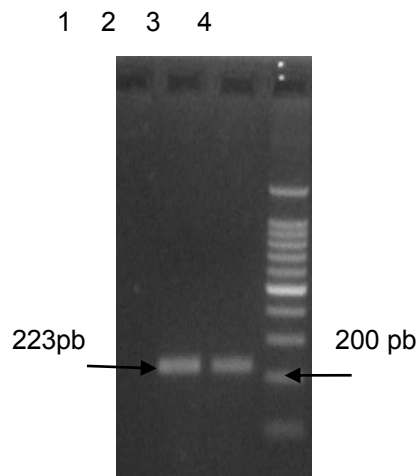


Fig. 1.- Gel de agarosa al 3% que representa en líneas 2 y 3 el producto de una PCR estandarizada del aislado mexicano de IPNV utilizando los iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001) que amplifica un fragmento de 223 pb. Línea 1 el control negativo y línea 4 el marcador de peso molecular.

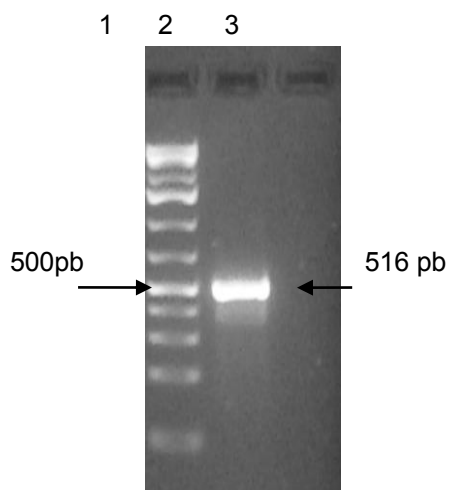


Fig. 2.- Gel de agarosa al 2% representa en línea 2 el producto de una PCR estandarizada del aislado mexicano de IPNV utilizando los iniciadores CIESAIPNV (Barrera *et al.*, 2009) que amplifica un fragmento de 516 pb. Línea 1 el marcador de peso molecular y línea 3 el control negativo.

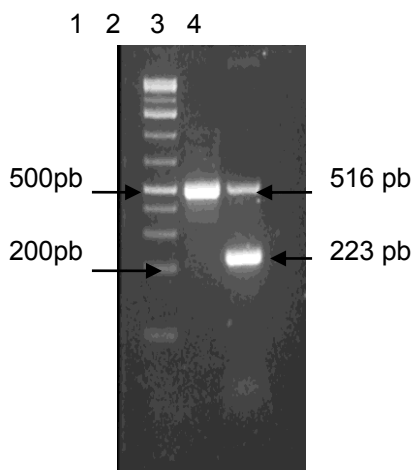


Fig. 3.- Gel de agarosa al 2% representa en línea 2 el fragmento de 516 pb de los iniciadores CIESAIPNV en una PCR punto final. Línea 3 una PCR multiplex estandarizada del aislado mexicano de IPNV utilizando los iniciadores CIESAIPNV (Barrera *et al.*, 2009) que amplifican un fragmento de 516 pb y los iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001) que amplifican un fragmento de 223 pb. Línea 1 el marcador de peso molecular y línea 4 el control negativo.

Para la PCR anidada, la cual se realizó utilizando en la primera ronda de amplificación los iniciadores DIAIPN (Takdal *et al.*, 2001), se obtuvo una banda de 223 pb, y en la segunda ronda de amplificación con los iniciadores DIAint (en este trabajo) se obtuvo una banda de 136 pb (Figs. 4 y 5).

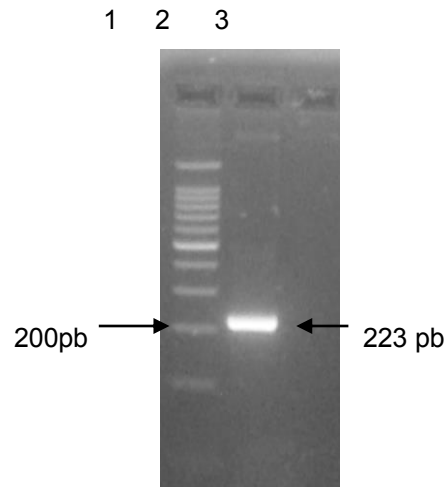


Fig. 4.- Gel de agarosa al 3% representa en línea 2 la primera ronda de amplificación de una banda de 223 pb utilizando los iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001) de una PCR del aislado mexicano de IPNV. Línea 1 el marcador de peso molecular y línea 3 el control negativo.

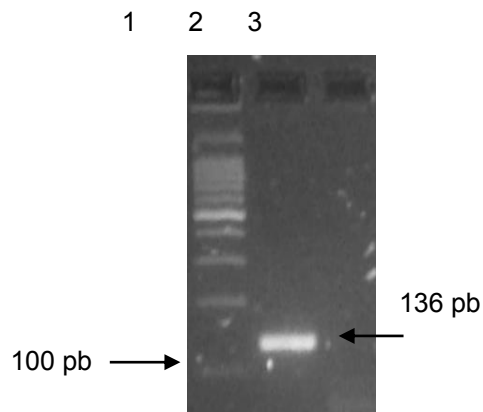
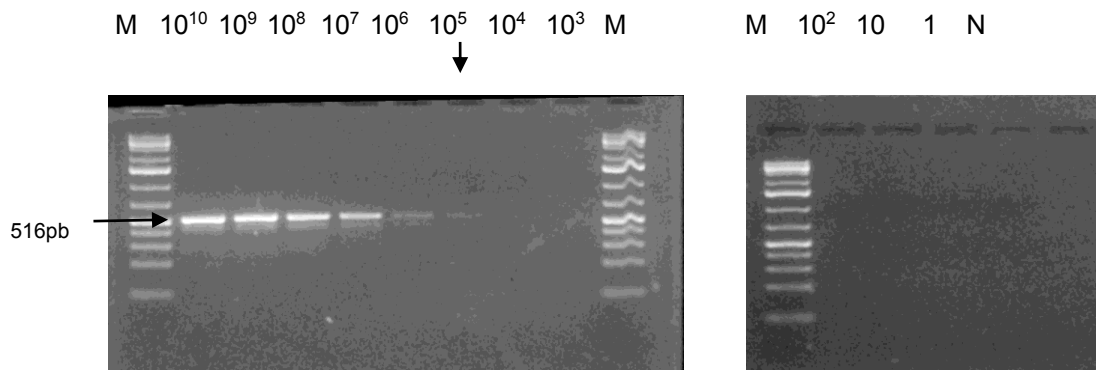


Fig. 5.- PCR anidada. Gel de agarosa al 3 % representa en línea 2 la segunda ronda de amplificación, utilizando los iniciadores DIAint (en este trabajo) que amplifican un fragmento de 136 pb. Línea 1 el marcador de peso molecular y línea 3 el control negativo.

En referencia al análisis de la sensibilidad analítica de la PCR punto final, con los iniciadores CIESAIPNV Barrera *et al.*, (2009) se obtuvo una sensibilidad de detección de hasta 10^5 plásmidos (Figs. 6 y 7); y para los iniciadores DIAIPN Taksdal *et al.*, (2001) una sensibilidad de detección de hasta 10^4 plásmidos (Fig.8); ambos ensayos fueron realizados a doble ciego. Estos resultados mostraron una mayor sensibilidad analítica de los iniciadores DIAIPNV (Taksdal *et al.*, 2001) para la detección del aislado mexicano de IPNV.



Figs. 6 y 7.- Geles de agarosa al 2% mostrando los productos amplificados de los plásmidos recombinantes en el rango de 10^{10} copias a una copia, conteniendo el inserto de 516 pb del gen que codifica para la proteína VP2 del virus IPNV del aislado mexicano y analizado con los iniciadores CIESAIPNV (Barrera *et al.*, 2009). En ellos se muestra una sensibilidad analítica de hasta 10^5 copias del plásmido con esta PCR convencional.

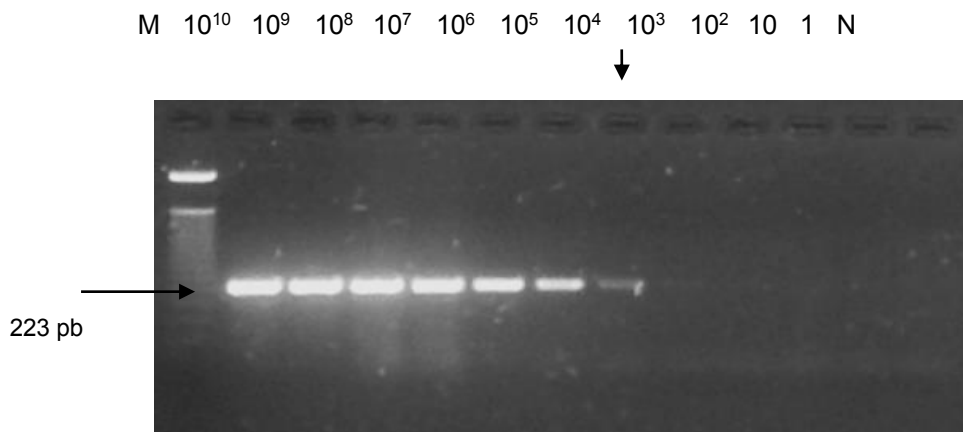


Fig. 8.- Gel de agarosa al 3% mostrando los productos amplificados de los plásmidos recombinantes en el rango de 10^{10} copias a una copia, conteniendo el inserto de 223 pb del gen que codifica para la proteína VP3 de IPNV del aislado mexicano y analizado con los iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001). En él se muestra una sensibilidad analítica de esta PCR convencional hasta 10^4 copias del plásmido.

Sin embargo, al realizar la segunda ronda de amplificación de la PCR anidada a partir de los productos obtenidos de la serie de diluciones de plásmidos con los iniciadores DIAPN (Fig. 9); utilizando los iniciadores DIAint (en este trabajo) se obtuvo una sensibilidad analítica de hasta 1 plásmido (Fig. 8). Lo cual confirma la mayor sensibilidad de la PCR anidada, reportada en trabajos precedentes realizados en otros países, para la detección de IPNV (Rimstand *et al.*,1990; López-Lastra *et al.*, 1994; Pérez-Prieto *et al.*,2001; Rodríguez *et al.*, 2001).

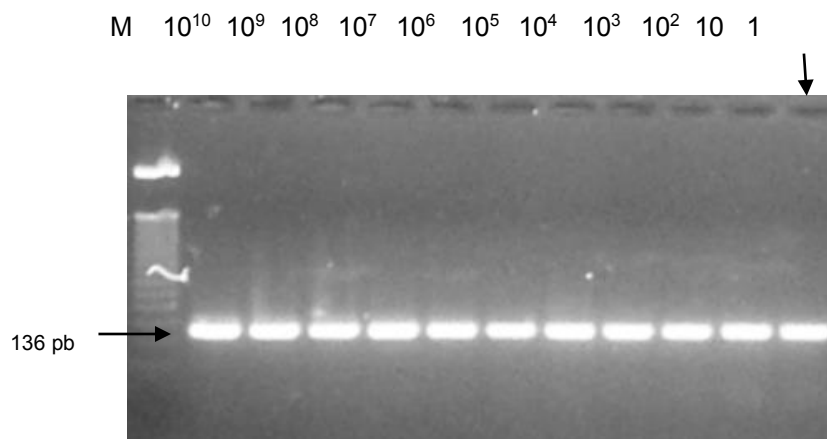


Fig. 9.- Gel de agarosa al 3% mostrando los productos amplificados de 136 pb del genoma de IPNV obtenidos con los iniciadores DIAint, a partir de los productos de PCR de la primera ronda de amplificación con los iniciadores DIAIPN utilizando los plásmidos recombinantes en el rango de 10¹⁰ copias a una copia. En él se muestra una sensibilidad analítica de esta PCR anidada de hasta 1 plásmido.

PCR en tiempo real (qPCR)

La sensibilidad analítica de los iniciadores internos DIAint utilizados en la PCR anidada punto final, fue probada en una PCR en tiempo real (qPCR) con SYBR Green I, a partir de las diluciones de plásmidos recombinantes en concentraciones de 10^{10} a 1, conteniendo el inserto de 223 de los iniciadores DIAIPN Taksdal *et al.*,(2001) Fig. 10. Obteniéndose un patrón de curvas más adecuado en las concentraciones de plásmidos de 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 ; así como las siguientes *Cyclethreshold* (Ct): 10^7 : Ct18, 10^6 : Ct20, 10^5 : Ct21, 10^4 : Ct 22 y 10^3 : Ct23.

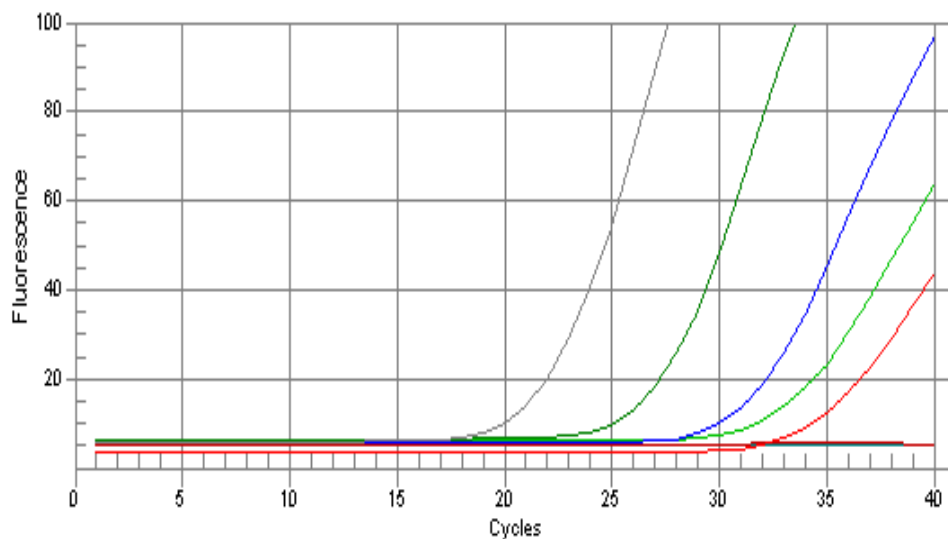


Fig 10.- Curvas generadas por SYBR Green I en PCR a tiempo real y los iniciadores DIAint, para cinco diluciones de plásmidos recombinantes con el segmento de 223 pb obtenido con los iniciadores DIAIPN. Las curvas son: 10^7 : gris, 10^6 : verde, 10^5 : azul, 10^4 : verde claro, 10^3 : rojo. Umbral del Ct línea roja.

RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR)

La sensibilidad de una RT-PCR en Tiempo Real (qRT-PCR) con SYBR Green I, estandarizada a partir de RNA total obtenido de células CHSE-214 infectadas con IPNV. Fue analizada a partir de diluciones de RNA de 8559 pg, 850.5 pg, 85.5 pg, 8.5 pg y 0.085 pg. Esta qRT-PCR con los iniciadores DIAint presentó una sensibilidad analítica del RNA de IPNV de hasta 0.085 pg (Fig. 11) mayor a la reportada por Rimstand *et al.*, (1990) mediante una RT-PCR anidada punto final la cual presentó una sensibilidad de 0.8 pg y a una RT-PCR anidada punto final realizada por López-Lastra *et al.*, (1994) los cuales obtuvieron una sensibilidad de 1 pg.

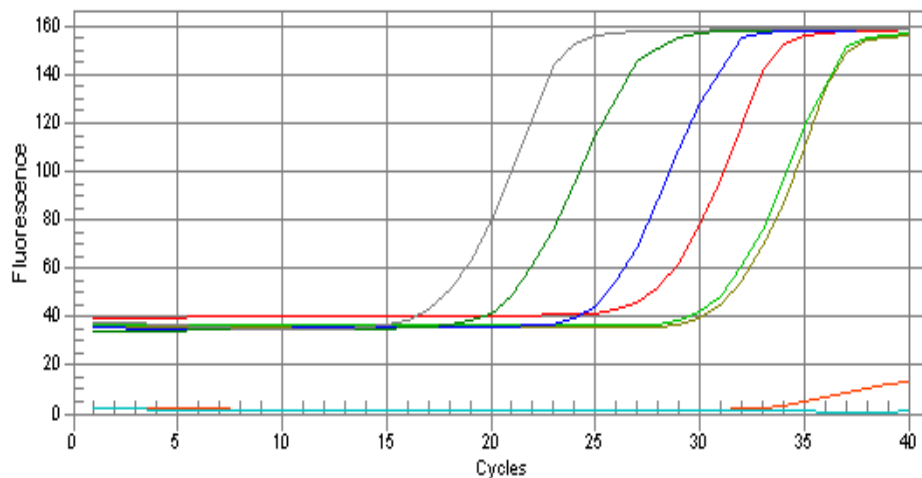


Fig 11.- Curvas generadas por SYBR Green en RT-PCR en tiempo real para utilizando los iniciadores DIAint a partir las siguientes concentraciones decrecientes de RNA, en diez órdenes de magnitud cada vez: 8559 pg, 850.5 pg, 85.5 pg, 8.5 pg, 0.85 pg y 0.085 pg. Las curvas son: 8559 pg: gris, 850.5 pg: verde, 85.5 pg: azul, 8.5 pg: rojo, 0.85 pg: verde claro, 0.085 pg: verde hoja. Umbral de Ct línea roja.

9.- DISCUSIÓN GENERAL

El diagnóstico oportuno y la implementación de estudios epizootiológicos son herramientas fundamentales para el control de enfermedades virales de peces y para impedir su diseminación a poblaciones de animales susceptibles (Rodríguez *et al.* 2003).

El Manual de pruebas de diagnóstico de enfermedades de animales acuáticos de la oficina internacional de salud animal (OIE, 2003), recomienda como método de análisis estándar para el diagnóstico de IPNV, el aislamiento de virus en cultivos de células, seguido de la identificación inmunológica. Muchos laboratorios consideran a este método como el más sensible con un límite de detección teórica de una partícula viral; sin embargo, el proceso es relativamente costoso y tardado; su eficacia puede depender de la susceptibilidad de la línea celular (McAllister, 1997). Debido a lo anterior, se han reportado otros métodos de diagnóstico, incluyendo pruebas moleculares para detectar ácidos nucleicos, y donde el cultivo viral se utiliza como control.

Durante las últimas décadas varios trabajos han propuesto a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método confirmativo de diagnóstico para el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), ya que han demostrado ser un método fiable, rápido, sensible y práctico (Rodríguez *et al.*, 2003). Dopazo y Barja (2002) reportan que la técnica de PCR puede detectar el virus incluso por debajo del límite de detección del cultivo celular, y también puede ser aplicable para detección directamente de tejidos de peces infectados. Asimismo, su alta sensibilidad representa una herramienta de utilidad para detectar portadores asintomáticos cuyos títulos virales son bajos.

Posterior, a la creación del procedimiento estándar de PCR se han desarrollado numerosas modificaciones que amplían su capacidad de diagnóstico, y han aumentado su utilidad en el laboratorio clínico. De esta manera, encontramos las siguientes técnicas: PCR punto final, multiplex y anidada, y más recientemente la

PCR tiempo real, que ofrece ventajas sobre las anteriores, como son su alta sensibilidad, rapidez, simplicidad y menor riesgo de contaminación; permitiendo así la oportuna toma de decisiones para el control y prevención de IPN. En el presente trabajo se llevó a cabo un análisis de los procesos de PCR convencional, anidada, qPCR y qRT-PCR para detección del aislado mexicano de IPNV

Como se muestra en los resultados, los protocolos han podido realizarse de manera eficiente en el laboratorio, estando disponibles para utilizarse ante situaciones específicas, por ejemplo, la PCR multiplex ha sido utilizada en estudios de co-infecciones de diferentes virus que afectan salmónidos (McAllister *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1999, Yoshira *et al.*, 1998; Alonso *et al.*, 1999), y en este estudio se utilizó para diferentes segmentos del genoma de IPNV. Por su parte, el protocolo de PCR anidada se ha utilizado con éxito para detección de portadores asintomáticos (López-Lastra *et al.*, 1994; Pérez-Prieto *et al.*, 2001), y en este estudio mostró la mejor sensibilidad. Sin embargo, para su eficiente desempeño, los protocolos deben estandarizarse, ya que variables como las concentraciones de MgCl₂, cantidad de templado, temperaturas de alineación y ciclos de amplificación pueden incidir en la especificidad y el rendimiento de la reacción de PCR (Pestana *et al.*, 2010).

La sensibilidad analítica de los distintos procesos de PCR, fue analizada a partir de una serie de diluciones de 1 a 10¹⁰ plásmidos recombinantes. Encontrando que el par de iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001) utilizados en pruebas de PCR punto final para el diagnóstico molecular confirmativo en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) UAEM, y que amplifican para una región de NS/VP3 de IPNV, presentan una sensibilidad de detección mayor de 10⁴ plásmidos recombinantes comparado con los iniciadores CIESAIPNV los cuales que tuvieron sensibilidad de hasta 10⁵ plásmidos, y que amplifican para una región de VP2. La mayor sensibilidad de los iniciadores DIAINP (Taksdal *et al.*, 2001), al parecer no coincide con lo afirmado por Guaita *et al.*, (2003) quienes afirman que para el diseño de una técnica fiable de diagnóstico por PCR, la selección de cebadores en la región de la VP2 es óptima, mientras que las zonas del genoma

en las confluencias VP2-NS y NS-PV3 son adecuadas para el estudio de la variabilidad genética de los aislados de un país o área geográfica.

Acorde a las diferentes sensibilidades encontradas, al utilizar ambos pares de iniciadores en una PCR multiplex, la banda generada por los iniciadores DIAIPN fue de mayor expresión que la de los iniciadores CIESAIPNV, ya que de acuerdo a lo reportado, los iniciadores pueden competir entre sí en la misma mezcla reactiva (OIE, 2006).

En este trabajo también se determinó que la sensibilidad de los iniciadores DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001) puede ser mejorada considerablemente realizando una PCR anidada punto final, utilizando como iniciadores externos los DIAIPN (Taksdal *et al.*, 2001) en la primera ronda de amplificación y como iniciadores internos los DIAint en la segunda amplificación, presentando una sensibilidad de detección de hasta 1 plásmido recombinante. En este sentido, varios autores han demostrado que este proceso es el más sensible dentro de los protocolos de PCR. Rimstand *et al.* (1990) obtuvieron una sensibilidad de 0.8 pg de RNA de doble cadena; y López-Lastra *et al.* (1994) reportaron niveles de detección de 1 pg; y ambos reportes indican que la PCR anidada detectó peces portadores. Sin embargo, autores también reportan que su principal desventaja es la probabilidad de contaminación al transferir los productos de la primera reacción al segundo tubo de reacción (Yi-Wei Tang *et al.*, 1997). En este sentido la PCR en tiempo real puede ser una alternativa de un método confiable, con óptima sensibilidad, rápido y práctico.

La qPCR utilizando SYBR Green I con los iniciadores DIAint, presentó una detección mayor de hasta 10^3 plásmidos recombinantes conteniendo el inserto de 223 pb del genoma de IPNV. Las concentraciones de 10^2 , 10 y 1 no fueron registradas en el patrón de curvas de la qPCR debido a que es difícil manejar eficientemente bajas concentraciones durante la elaboración de las mezclas.

La qRT-PCR con Sybr Green I, y los iniciadores DIAint presentó una sensibilidad analítica del RNA de IPNV de hasta 0.085 pg, mayor a las RT-PCR anidadas

punto final reportadas por Rimstand *et al.*, (1990), la cual presentó una sensibilidad de 0.8 pg y de López-Lastra *et al.*, (1994), que obtuvieron una sensibilidad de 1 pg.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede proponer que esta última técnica es la más adecuada, por su sencillez, rapidez y alta sensibilidad. Sin embargo, también es difícil comparar la sensibilidad obtenida con trabajos previos, ya que en el presente estudio, la sensibilidad fue medida en base a la concentración de plásmidos; mientras que la mayoría de trabajos previos se han realizado utilizando TCID₅₀. Con base a lo anterior, se deberán continuar los trabajos tendientes a su optimización y establecimiento como técnica de diagnóstico confirmativa.

En el presente trabajo se han implementado distintos protocolos de PCR, destacando que efectivamente, qRT-PCR fue el método más sensible para detectar el genoma de IPNV ya sea a partir de plásmidos o bien de diluciones de RNA, quedando por determinar su eficiencia a partir de muestras de peces. Con respecto a los iniciadores utilizados, es evidente que los DIAIPN muestran mayor eficiencia que aquellos diseñados a partir de la secuencia del aislado mexicano, por lo que se recomienda considerar el uso de ambos durante el proceso de diagnóstico con PCR punto final.

10.- CONCLUSIONES GENERALES

Los iniciadores CIESAIPNV (Barrera *et al.* 2009) diseñados para el aislado mexicano de IPNV utilizados en una PCR punto final tienen una sensibilidad analítica de hasta 10^5 plásmidos. Sin embargo, los iniciadores DIAIPNV (Taksdal *et al.* 2001) utilizados en una PCR convencional tienen una sensibilidad analítica mayor de 10^4 plásmidos para este aislado.

Utilizando una PCR anidada punto final, empleando en la primera ronda de amplificación los iniciadores DIAIPNV y en la segunda ronda los iniciadores DIAint (en este trabajo) la sensibilidad se ve incrementada hasta 1 plásmido. No obstante el riesgo de contaminación de la reacción también aumenta, coincidiendo con lo reportado por otros autores.

Una PCR en tiempo real (qPCR) utilizando SYBR Green y los primers DIAint, obtuvo una sensibilidad analítica de 10^7 a 10^3 plásmidos, indicando que las concentraciones de plásmidos menores no fueron registradas en el patrón de curvas.

Así también, fue realizada una RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) utilizando SYBR Green y los primers DIAint, obteniéndose una sensibilidad analítica del RNA de IPNV de 8559 pg a 0.085 pg. Esta RT-PCR en tiempo real presentó una sensibilidad mayor que las RT-PCR anidadas punto final reportadas por Rimstand *et al.* (1990) quienes reportaron una sensibilidad de 0.8 pg y por López –Lastra *et al.* (1994) los cuales obtuvieron una sensibilidad de 1 pg.

Por lo anterior se recomienda continuar con los trabajos requeridos para establecer esta técnica de qRT-PCR como un método de diagnóstico confirmativo en el CIESA - UAEM, permitiendo en un futuro la detección de bajos títulos virales a partir de tejidos, y la ubicación de peces portadores asintomáticos, ofreciendo así una valiosa herramienta para la toma de decisiones rápidas y oportunas para el control y prevención de IPN.

11. -REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ahne, W., and Thomsen, I. (1986): Infectious pancreatic necrosis: Detection of virus and antibodies in rainbow trout IPNV-carrier (*Salmo gairdneri*). Zentralbl.Veterinarmed. B 33:552–554.

Alonso, M., Rodríguez, S., and Pérez-Prieto S.I. (1999): Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus. J. Virol. Methods 81:1-9.

Barrera M. M., Martínez J.S., Salgado M.C., Vega F. and Ortega c. (2009): Development and Validation of a Short-Time Cell culture and Multiplex Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Assay for Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Mexican Farm-Sampled Rainbow Trout. Journal of Aquatic Animal Health 21:167-172.

Billi J.L., Wolf K. (1969): Quantitative comparison of peritoneal washes and feces for detecting infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in carrier brook trout. J. Fish. Res. Board. Can. 26: 1459-1465.

Blake S.L., Schill W.B., McAllister P.E., Lee M.K., Singer J.T- and Nicholson B.L. (1995): Detection and identification of Aquatic Birnaviruses by PCR assay. Clinical Microbio.33:835-839.

Bowers M.R., Lapatra S.E., Dhar A.K. (2008): Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. Journal of Virological Methods 147: 226-234.

Cale J.M., Shaw C.E., Bird I.M. (1998): Optimization of a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) mass assay for low-abundance mRNA. Mol. Biol. 105:351-371.

Clewely, J. P. (1989): The polymerase chain reaction, a review of the practical limitations for human immunodeficiency virus diagnosis. *J. Virol. Methods* 25:179–187.

Cohen J. (1975): Ribonucleic acid polymerase activity in purified infectious pancreatic necrosis virus of trout. *Biochem Biophys Res Comm* 62, 689-695.

Cutrín. J. M., Barja J.L., Nicholson B.L., Bandín I., Blake, S., and Dopazo C. P. (2004): Restriction Fragment Length Polymorphisms and Sequence Analysis: an Approach for Genotyping Infectious Pancreatic Necrosis Virus Reference Strains and Other Aquabirnaviruses Isolated from Northwestern Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 1059–1067.

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

Dopazo, C. P., and Barja, J. L. (2002): Diagnosis and identification of IPNV in salmonids by molecular methods. In *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases* (C. O. Cunningham, ed.), pp. 23–48. Kluwer Academic, Publishers, Amsterdam.

Duncan R., Nagy E., Krell P.J., Dobos P. (1987): Synthesis of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J. Virol* 61, 3655-3664.

Espinoza J.C., Hjalmarsson, Evertt E., Kuznar J. (2000): Temporal and sub cellular localization of infectious pancreatic necrosis virus structural proteins. *Arch Virol* 145, 739-748.

Espinoza J.C., Kuznar J. (1997): Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) does not require acid compartments for entry into cell. *Arch Virol* 142, 2303-2308. from tissues of some lower vertebrates. *Science* 132:1890–1891.

González B.J.M., Medina J.J.M. (2001): *Patología Molecular*. Mc Graw Hill-Interamericana de España S.A.U. España.

Granzow H., Weiland F., Fichter D., Enzmann P.J. (1997): Studie of ultraestructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. J. Fish Dis. 20, 1-10.

Gregory A., Munro L.A., Wallace I.S., Bain N., Raynard R.S. (2007): Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from the environment in the vicinity of IPNV-infected Atlantic salmon farms in Scotland. Journal of Fish Diseases. Vol 30 621-630.

Guaita L., Rodríguez S., Borrego J.J., Pérez-Prieto S. (2003): Virulencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en trucha común (*Salmo trutta*). Aspectos moleculares e implicaciones diagnósticas. IX Congreso Nacional de Acuicultura Libro de Resúmenes pp. 365-367.

Guerrero L., Herrera E., Salinas J., Torres J., Montero A.B., and Barrón B. (2008): Detection and genotyping of an infectious pancreatic necrosis virus from asymptomatic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) facilities in Mexico. Intervirology 51:285–292.

Hill B.J., Way K. (1995): Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. Annu. Rev. Fish Dis. 5:55-77.

Hill B.J., Williams R.F. and Finlay J. (1981): Preparation of antisera against fish virus disease agents. In: Proceeding of the International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines (D.P. Anderson and W. Hennessen, eds.), pp.209-218. National Fish Health Research Laboratory, Karger, Basel.

Hill B. J. (1982): Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In "Microbial Diseases of Fish" (R.J. Roberts ed.) pp 91-114. Academic Press New York.

Jarp J., Gjevre A.G., Olesen A.B. and Bruheim T. (1994): Risk factors for furunculosis, infectious pancreatic necrosis and mortality in post-smolt of Atlantic salmon, *Salmo salar*. J. Fish Dis. 18:67-78.

Jørgensen P.E.V. and Kehlet N.P. (1971): Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout: Their serological and pathogenic properties. Nord. Vet. Med. 23: 568-575.

Kelly R.K., Souter B.W., Miller H.R. (1978): Fish cell lines; comparisons of CHSE-214, FHM and RTG-2 in assaying IHN and IPN viruses. J. Fish Res Board Can; 35:1009-1011.

Kerr C.R.C. and Cunningham (2004): Moving molecular diagnostics from laboratory to clinical application: a case study using infectious pancreatic necrosis virus serotype A. Letters in Applied Microbiology ISSN 0266-8254.

Kuznar J., Soler M., Farias G., Espinoza J.C. (1995): Attachment and entry of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) into CHSE-214 cells, Arch Virol 140, 1833-1840.

Leong J. C. and Fryer J.L. (1993): Viral vaccines for aquaculture. Annu. Rev. Fish Diseases, 225-240.

Lientz, J.C., and Springer, J.E. (1973): Neutralization tests of infectious pancreatic necrosis virus with polyvalent antiserum. J. Wildlife Dis. 9:120–124.

López –Lastra M., Gonzalez M., Jashes M., and Sandino A.M. (1994): A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) base on reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) J.Fish Dis. 17:269-282.

Luque C.J., Herráez S.A. (2001): Biología Molecular e ingeniería genética. Harcourt. Madrid, España.

Marver A., Oña A., Abaitua F., González D., Clemente R., Ruíz- Díaz J.A., Castón J.R., Pazos F., Rodríguez J.F. (2003): The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. J. Virol 77, 6438-6449.

McAllister P.E., Schill W.B., and Owes W.J., Hodge D.L. (1993): Determining the prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in asymptomatic brook trout *Salvelinus fontinalis*: A study of clinical sample and processing methods. Dis. Aquat. Org. 15:157:162.

McBeath A.J.A., Snow M., Secombes C.J., Ellis A.E., Collet B. (2007): Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. Fish & Shellfish Immunology 22: 230-241.

McKintosh J., Roberts R.J. (1976): The pathology of infectious pancreatic necrosis. I. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. Br Vet J 132, 76-85.

Miller T.A., Rapp J., Wastlhuber U., Hoffmann R.W., Enzmann P.J. (1998): Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. Dis. Aquat. Org. 34, 13-20.

Novoa B., Blake S., Nicholson B.L., Figueras A. (1995b): Comparisons of different procedures for serotyping aquatic birnavirus. Appl. Environ. Microbiol. 61:2925-2929.

Novoa B. Blake S., Nicholson B.L. and Figueras A. (1995a): Application of 3 techniques for diagnosing birnavirus infection turbot. Vet. Res. 26: 493-498.

OIE, Oficina Internacional de Epizootias. (2006): Manual of Diagnostics Tests for Aquatic Animals (5° Ed.). Paris, Francia.

Okamoto N., Tanaka M., Fukuda H., Sususki S., Yasuda Y., Sano T. (1987): A select strain (RT-101) of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, highly sensitive to IPN virus, Bull Eur Ass Fish Pathol 7:2-5.

Okamoto N., Tanaka M., Fukuda H., Sususki S., Yasuda Y., Sano T. (1993): Resistance of a rainbow trout strain to infectious pancreatic necrosis, *Aquaculture* 117: 71-76.

Ortega C., Montes de Oca R., Groman D. Yanson C. Nicholson B, Blake S. (2002): Case Report: Viral Infectious Pancreatic Necrosis in Farmed Rainbow Trout from Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health* 14:305-310.

Ortega C. (2008): Evaluación de la virulencia de 3 aislados chilenos del virus de la necrosis pancreática infecciosa y su capacidad de inducir apoptosis y expresión de interferón tipo I y MX3. Tesis Doctoral. Facultad Austral de Chile: 1-96.

Ortega C., Enríquez R. (2007): Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) Revisión Bibliográfica. *Arch. Med. Vet.* 39, N°1.

Pestana E.A., Belak S., Diallo A., Crowther J.R., Viljoen J.G. (2010): Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics – Real Time PCR Applications. Joint FAO/IAEA Programme, Ed. Springer, 310 pp.

Pryde A., Melvin W.T and Munro A.L.S. (1993): Nucleotide sequence analysis of the serotype-specific epitope of infectious pancreatic necrosis virus. *Arch. Virology* 129:287-293.

Reno, P.W. (1999): Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: *Fish Diseases and Disorders. Viral, Bacterial and fungal infections* (P.T. Woo and D. W. Bruno, eds.), Vol.3, pp. 1-55. CAB Publishing Wallingford.

Rimstand E., Homes E., Olsvik O. and Hyllseth B (1990): Identification of a double-stranded RNA virus by using polymerase chain reaction and magnetic separation of the synthesized DNA segments. *J. Clin. Microbiol* 28: 2275-2278.

Roberts R.J., Pearson M.D. (2005): Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis* 28, 383-389.

Rodriguez S., Borrego J., Perez-Prieto S. (2001): Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. *J. Virol Methods*. 97:23-31.

Rodríguez S, Borrego J., Pérez Prieto. (2003): Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. *Adv Vir Res* 62, 113-165.

Rodriguez S., de las Heras A.I., Pérez Prieto S.I. (2010): The persistence of infectious pancreatic necrosis virus and its influence on the early immune response. Elsevier. *Vet. Immunol. Immunopathol* 10.1016/j.vetimm.2010.02.015

Sano M, Okamoto N, Fukuda H, Saneyoshi M, Sano T (1992): Virulence of IPNV is associated with the larger RNA segment (RNA segment A). *J Fish Dis* 15, 283-293.

Sellon. (2003): Update on molecular techniques for diagnostic testing of infectious disease. *Vet. Clin. Small Anim. Pract* 33: 677-693

Smail D.A., Bain N., Bruno D.W., King J.A., Thomson F., Pendrey D.J., Morrice S., Cunningham C.O. (2006): Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. *J. Fish Dis*. 29, 31-41.

Song H. Santi N., Evensen Ø., Vakharia V.N. (2005): Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *J Virol* 79, 10289-10299.

Stortset A., Evensen Ø., Midtlyng P.J. (2006): A user's Inter-Laboratory Comparison of Broodfish Screening for infectious Pancreatic Necrosis Virus Using Molecular and Conventional Diagnostic Methods. *Application in Animal Health and Biologics Controls* vol 126:101-105.

Suzuki, S., Kimura, M., and Kusuda, R. (1998): The complete nucleotide sequence of the polyprotein and VP5 gene of a marine birnavirus. *Fish Sci*. 64:428-433.

Swanson R.N., Carlisle J.C., Gillespie J.H. (1982): Pathogenesis of infectious pancreatic necrosis virus infection in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), following intraperitoneal injection. J. Fish. Dis. 5:449-460.

Taksdal T., Danneving B.H., Rimstad E. (2001): Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN) - virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol. 21:214-219.

Villanueva R.A., Galaz J.L., Valdés J.A., Jashés M.M., Sandino A.M. (2004): Genome assembly and particle maturation of the *Birnavirus* infectious pancreatic necrosis virus. J Virol 78, 13829-13838.

Wang W.S., Wi Y.L., and Lee J.S.(1997): Single-tube, non-interrumper reverse transcription PCR for detection of infectious pancreatic necrosis virus. Dis. Aquat. Org. 28:229-233.

Wiedbrauk D.L. and Farkas D.H. (eds.) (1995): Molecular Methods for Virus Detection. Academic Press, San Diego.

Winton, J.R. (1991): Recent advances in detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus in aquaculture. Annual Rev. of Fish Diseases 83–93.

Wolf K., Quimby M.C. and Bradford A.D. (1963): Egg-associated transmission of IPNV of trout. Virology 21:317-321.

Wolf K., Quimby M.C. (1962): Established eurythermic line of fish cell *in vitro*. Science; 135:1065-1066.

Wolf K., (1988): Infectious pancreatic necrosis. In Fish Viruses and Fish Diseases, Cornell Univ. Press, Ithaca, NY. pp. 115–157.

Wolf K., Quimby M.C., Pyle E., and Dexter (1960): Preparation of monolayer cell cultures from tissues of some lower vertebrates. Science 132:1890–1891.

ANEXO 1 TOMA DE MUESTRA VIROLOGICA A PARTIR DE PECES (OIE, 2003)

1. Limpiar la superficie de mesa de trabajo con alcohol al 70% y encender mechero.
2. Los peces se sacrifican por asfixia. Dependiendo del tamaño si son alevines o crías se requiere de entre 10 a 15 peces para hacer un *pool* que será considerado como una muestra. En caso de peces adultos se tomará la muestra de un solo pez.
3. Los peces se colocan sobre una charola o sobre una toalla de papel y se asperjan con alcohol al 70%.
4. Los peces se diseccionan y se extrae un trozo de riñón, bazo y sacos pilóricos hasta completar aproximadamente un gramo.
5. Los órganos son colocados en un tubo de plástico con 9 ml de medio MEM al 2% de SFB. Dilución 1:10 (órganos: medio).
6. El contenido del tubo se deposita en un mortero estéril y frío (el mortero debe estar hasta su uso a -20°C). Parte del medio se regresa al tubo. En el mortero con los órganos y el medio se adiciona arena de río de estéril, para macerar los órganos. La muestra macerada se obtiene con una jeringa y se vacía en el tubo de origen.
7. Los tubos son centrifugados a 3500 rpm durante 15 min a 10°C.
8. Cerca del mechero, con una jeringa se extrae el sobrenadante del tubo y se pasa por un filtro estéril con una membrana de 2-0 de diámetro.
9. La muestra filtrada se coloca en otro tubo estéril y colocándolo en refrigeración a 4°C, para posteriores aplicaciones.

ANEXO 2. CULTIVO CELULAR EN LÍNEA CELULAR CHSE-214 (OIE, 2003)

a) Inoculación de monocapas celulares

- I. Se prepara una dilución decimal adicional de los sobrenadantes de homogeneizados del órgano al 1/10 y se transfiere un volumen apropiado de cada una de las dos diluciones sobre monocapas celulares de 24 horas. Se inoculan al menos 2 cm² de monocapa celular con 100 µl de cada dilución.
- II. Se deja que se adsorba durante 0.5-1 horas y, sin retirar el inóculo, se añade el medio de cultivo celular tamponado a pH 7.6 y suplementado con 2% de suero fetal bovino (FCS) (1 ml/pocillo para placas de cultivo celular de 24 pocillos), y se incuba a 15°C.

b) Control de la incubación

- I. Se sigue el curso de la infección en cultivos control positivos y en otros cultivos celulares inoculados mediante examen microscópico diario a 40-100 aumentos durante 7 días. Se recomienda el uso de un microscopio de contraste de fases.
- II. Se mantiene el pH del medio de cultivo celular entre 7,3 y 7,6 durante la incubación. Esto se logra añadiendo al cultivo celular inoculado medio de tampón bicarbonato estéril (para frascos de cultivo celular con cierre hermético) o solución tamponada de Tris (para placas de cultivo celular) o, preferiblemente, utilizando medio tamponado HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico).

- III. Si aparece efecto citopático (ECP) en cultivos celulares inoculados con diluciones de los sobrenadantes o los homogeneizados, se deben emprender inmediatamente procedimientos de identificación del IPNV.

ANEXO 3. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFAT)

1. Se preparan monocapas celulares en pocillos de 2 cm² de placas de microtitulación de plástico o sobre cubres para obtener en torno a un 80% de confluencia, lo que normalmente se logra antes de las 24 horas después de la incubación a 22°C (se siembran seis monocapas celulares por cada aislamiento del virus a identificar, más dos para control positivo y dos para control negativo). Se puede reducir al 2–4% el contenido en FCS del medio de cultivo celular.
2. Cuando las monocapas celulares están preparadas para la infección i.e., el mismo día o un día después de la siembra, se inocula la suspensión del virus a identificar haciendo diluciones decimales directamente en los pocillos o en los recipientes de cultivo celular.
3. Se diluye la suspensión del virus control de IPNV de forma similar a fin de obtener un título vírico de unas 5.000–10.000 unidades formadoras de placas (UFP)/ml en el medio de cultivo celular.
4. Se incuba a 15°C durante 24 horas.
5. Se retira el medio de cultivo celular, se enjuaga una vez con 0.01 M de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, luego brevemente otras tres veces con acetona fría (almacenada a –20°C) para los cubres o con una mezcla de 30% de acetona/70% de etanol, también a –20°C, para los pocillos de plástico.
6. Dejar que el fijador actúe durante 15 minutos. Un volumen de 0.5 ml es adecuado para 2 cm² de monocapas celulares.

7. Dejar que las monocapas celulares se sequen al aire durante al menos 30 minutos y se procesan de forma inmediata o se congelan a -20°C .
8. Se prepara una solución de anticuerpo o suero purificados contra IPNV en 0,01 M de PBS, pH 7,2, que contenga 0,05% de Tween 80 (PBST), a una dilución apropiada (determinada previamente o proporcionada por el proveedor de reactivos).
9. Se rehidratan las monocapas celulares secas mediante cuatro pasos de aclarado con solución PBST, y se retira completamente el tampón después del último aclarado.
10. Se tratan las monocapas celulares con la solución de anticuerpo durante una hora a 37°C en una cámara húmeda sin permitir que se produzca evaporación. El volumen de la solución a utilizar es 0,25 ml/2 cm² pocillo.
11. Se lava cuatro veces con PBST, como antes.
12. Se tratan las monocapas celulares durante 1 hora a 37°C con una solución de anticuerpos conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) frente a la inmunoglobulina (Ig) utilizada en la primera capa y preparada según las instrucciones del suministrador. Estos anticuerpos FITC son casi siempre de conejo o de cabra.
13. Se lava cuatro veces con PBST.
14. Se examinan inmediatamente las monocapas de células tratadas en las placas de plástico, o se montan los cubreobjetos utilizando glicerol salino a pH 8,5 antes de la observación microscópica.

ANEXO 4. EXTRACCIÓN DE RNA POR LA TECNICA DE TRIZOL LS (INVITROGEN)

1. En un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml agregar 250 μ l de sobrenadante del pozo inoculado (positivo a efecto citopático, suero neutralización e inmunofluorescencia).
2. Adicionar 750 μ l de la solución Trizol LS.
3. Agitar en vortex por 1 min. y dejar a temperatura ambiente 10 min.
4. Centrifugar 15 min. a 14,000 rpm a 4°C.
5. En otro tubo para microcentrifuga de 1.5 ml colocar 500 μ l de isopropanol y agregar 500 μ l del sobrenadante del tubo que fue centrifugado.
6. Agitar suavemente y dejar reposar 10 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar 15 min. a 14,000 rpm a 4°C.
8. Tirar sobrenadante y agregar 500 μ l de etanol al 70%, frio.
9. Centrifugar 5 min. a 14,000 rpm a 4°C.
10. Retirar el etanol restante con una micropipeta y secar a 42°
11. Diluir en 10 μ l de agua DEPC (Agua ultra pura con Dietilpirocarbonato).

ANEXO 5. - RT-PCR punto final con Kit Acces Quick RT-PCR System (Promega Corp).

1. Preparar la mezcla de reacción mediante la combinación de los volúmenes indicados de los primeros seis componentes en un tubo de reacción de paredes finas de 0,5 ml en hielo.
2. Mezclar por pipeteado.
3. Añadir la transcriptasa inversa AMV y la DNA polimerasa *Tfl* a la reacción.
4. Vórtice suavemente el tubo durante 10 segundos para mezclar los componentes. Si se trabaja con muestras múltiples, se puede montar una mezcla maestra en hielo mediante la combinación de múltiplos adecuados de cada uno de los componentes indicados y transferir 48 µl de la mezcla maestra a cada tubo de reacción.
5. Iniciar la reacción mediante la adición de la plantilla.
6. Utilizar puntas de pipeta individuales para todas las adiciones, teniendo cuidado de no contaminación cruzada de las muestras.

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Agua libre de nucleasas para un volumen final de 50 μ l	X μ l	
AMV/ <i>Tfi</i> 5X Reaction Buffer	10 μ l	1X
dNTP Mix (10mM each dNTP)	1 μ l	0.2mM
downstream primer	50pmol	1 μ M
upstream primer	50pmol	1 μ M
25mM MgSO ₄	2 μ l	1mM
AMV Reverse Transcriptase	1 μ l	0.1u/ μ l
<i>Tfi</i> DNA Polymerase	1 μ l	0.1u/ μ l
RNA muestra	Y μ l	50 μ l

Síntesis de la primera cadena de cDNA.-

1 ciclo	45°C for 45 minutes	Transcripción reversa
1 ciclo	94°C for 2 minutes	AMV RT inactivación y RNA/cDNA/primer desnaturalización

Síntesis de la segunda cadena de cDNA y amplificación de la PCR.-

40 ciclos	94°C por 30 segundos 60°C por 1 minutos 68°C por 2 minutos	desnaturalización alineación extensión
1 ciclo (opcional)	68°C por 7 minutos	extensión final
1 ciclo	4°C	remojar

ANEXO 6.- PURIFICACIÓN DE DNA Kit QIAquick Gel Extraction.

1. Añadir 3 vol de Buffer QG por cada vol de gel
2. Incubar 10 min a 50°C
3. Agregar Isopropanol en proporción 1 a 1
97µg gel: 97 µl isopropanol
4. Pasar todo a la columna de sílica
5. Centrifugar 14000 rpm a temperatura ambiente
6. Se tira filtrado agregar 500 µl Buffer QG
7. Centrifugar en las mismas condiciones
8. Añadir 75 µl de Buffer PE
9. Centrifugar en las mismas condiciones
10. Tirar filtrado
11. Centrifugar mismas condiciones
12. Añadir 50 µl de Buffer EB se añaden directo ala columna, dejar reposar por un minuto.
13. Centrifugar en las mismas condiciones.

ANEXO 7.- LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN UTILIZANDO EL VECTOR COMERCIAL pGEM®-T and pGEM®-TEasy Vector Systems.

1. Centrifugar brevemente el pGEM®-TopGEM®-TEasy Vectory DNA Insertar tubos de control para recoger el contenido en la parte inferior de los tubos.
2. Configurar las reacciones de ligación como se describe a continuación.
Nota: Utilice tubos de 0,5 ml se sabe que tienen una baja capacidad de unión al DNA. Pasar por Vortex el búfer de ligación 2X Rapid vigorosamente antes de cada uso.
3. Mezclarlas reacciones mediante pipeteo. Se incuban las reacciones durante 1 hora a temperatura ambiente. Alternativamente, si se requiere un número máximo de transformantes, incubar las reacciones durante la noche a 4° C.

COMPONENTES DE LA REACCIÓN	REACCIÓN ESTÁNDAR	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5µl	5µl	5µl
pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1µl	1µl	1µl
Producto de PCR	X µl*	-	-
Control de insert de DNA	-	2µl	-
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1µl	1µl	1µl
Agua libre de nucleasas	10 µl	10µl	10µl

*La relación molar del producto de PCR: vector puede requerir optimización