



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Jaime Figueroa V.
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DEL VIRUS DE LA
NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA EN SALMONES.
TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS DISTINTOS
SEROTIPOS EXISTENTES EN CHILE**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

MARIO BORIS FERNÁNDEZ CARRIEL

VALDIVIA – CHILE

2005

*Dedico este trabajo de tesis a mis
padres Mario e Irma, hermanos
Rodrigo y Marlis y muy especialmente
a mi esposa Mabel por todo su apoyo
durante la realización de este trabajo.*

AGRADECIMIENTOS

No es fácil escribir en algunas líneas tantos afectos sentimientos y recuerdos que surgen en mi al revisar mi formación académica, mas aún cuando he logrado terminar esta tesis después de egresar hace varios años de la universidad.

En primer término quiero agradecer a mi profesor patrocinante el Doctor Jaime Figueroa V. por haberme acogido en su laboratorio, por todo el tiempo, dedicación y conocimientos entregados, además quien siempre me brindo palabras de ánimo y apoyo para continuar en esta tarea.

Quiero también agradecer a las Doctoras Ana Maria Zárraga O. y Gloria León R. por haber aceptado ser parte de mi comisión evaluadora, por todos los consejos entregados los cuales ayudaron a perfeccionar cualitativamente esta tesis. Al director de escuela Dr. Alejandro Reyes a los docentes y funcionarios del Instituto de Bioquímica quienes en forma directa o indirecta colaboraron con esta tarea. A mis amigos Germán Rerhen, Marcos Mancilla, Alex Romero y Fernando Bustamante quienes siempre me alentaron y apoyaron durante la realización de este trabajo.

Finalmente deseo destacar y agradecer la confianza y apoyo entregado por mi institución laboral en especial a Don Marcos Godoy G., Gerente Aquagestion S.A., por las facilidades técnicas, administrativas y de financiamiento para el desarrollo de este trabajo.

INDICE

	Páginas
1. Resumen	1
1.1. Summary	2
2. Introducción	3
3. Materiales y métodos	20
3.1. Materiales	20
3.1.1. Reactivos	20
3.1.2. Equipos	21
3.2. Material biológico	22
3.2.1. Recolección de muestras	22
3.2.2. Aislamiento viral mediante cultivo celular	22
3.2.2.1 Confirmación de IPNV mediante cultivo celular	23
3.2.2.2. Confirmación de IPNV mediante RT-PCR ELISA	24
3.2.3. Cepas de IPNV de referencia	24
3.3. Implementación PCR y RLFP	25
3.3.1. Selección de partidores	25
3.3.2. Extracción de RNA	25
3.3.3. Síntesis de cDNA	26
3.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
3.3.5. Purificación y concentración de los productos PCR	27
3.3.6. Digestión de cDNA con endonucleasas de restricción	27

3.3.7. Electroforesis en geles de agarosa y determinación del peso molecular de los productos PCR	28
3.4. RFLP cepas de referencia	29
3.4.1. Genotipificación de aislados nacionales mediante RFLP	31
4. Resultados	32
4.1. Material biológico	32
4.2. Estandarización de RFLP	41
4.3. Genotipificación de la cepas aisladas	45
5. Discusión	49
6. Bibliografía	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Efecto citopático del virus IPN y monocapa de células	36
Figura 2: Confirmación efecto citopático por Dot Blot	36
Figura 3: Confirmación IPNV mediante gel de agarosa	38
Figura 4: Confirmación de IPNV mediante inmunofluorescencia	40
Figura 5: RT-PCR cepas de referencia	42
Figura 6: RFLP cepas de referencia	43
Figura 7: RFLP aislados en estudio	46

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación serológica del virus IPN	11
Tabla 2: Enzimas de restricción y sitios de corte	30
Tabla 3: Información epidemiológica de las diferentes cepas	33
Tabla 4: Resumen de técnicas confirmatorias	34
Tabla 5: Absorbancia a 405 nm de algunas cepas	38
Tabla 6: Resumen de los fragmentos obtenidos por las endonucleasas de Restricción para las cepas de referencia	44

LISTADO DE ABREVIATURAS

IPN	: Necrosis pancreática infecciosa
IPNV	: Virus de la necrosis pancreática infecciosa
RFLP	: Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción
Sp	: Spjarub
Ab	: Abild
VR-299	: West Buxton
OIE	: Oficina internacional de epizotias
ECP	: Efecto citopatico

1. RESUMEN

Una de las enfermedades virales de importancia económica que afecta a los cultivos de salmónidos en Chile es la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) enfermedad viral causada por el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV).

En este estudio se planteó como hipótesis la presencia de los serotipos Sp, Ab, VR-299, en el cultivo de salmón del Atlántico en la décima y undécima región, durante el año 2004, siendo el objetivo identificar cual es el genotipo de IPNV que afectó el cultivo del salmón del Atlántico durante el año 2004. Por tanto la importancia del presente estudio, considerando que una de las características diferenciales de los distintos serotipos, es la mortalidad asociada a cada uno de ellos, radica en que al conocer el serotipo de mayor relevancia se podrían adoptar mejores medidas profilácticas y de manejo para disminuir la mortalidad de peces producto de IPNV.

Para la genotipificación de los aislados en estudio, se utilizó la técnica RFLP (Restriction Fragment Length polymorphisms), mediante la utilización de 5 endonucleasas de restricción; Una vez obtenidos los perfiles de cada una de las cepas de estudio, éstas se compararon con los perfiles de las cepas de referencia. En base al análisis de genotipificación de los 15 aislados, provenientes de distintos ambientes de la décima y undécima región, se concluyó que las infecciones de IPNV que afectaron al cultivo de salmón del Atlántico (*S. salar*) durante el año 2004 corresponden al serotipo Sp.

1.1. SUMMARY

The Infectious Pancreatic Necrosis (IPN), caused by the Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) is a viral disease of high economical importance on salmonid farms in Chile.

On this study the proposed hypothesis was the presence of the serotypes Sp, Ab, VR-299 on Atlantic Salmon farmed in the X and XI Region, during the year 2004, being the objective to identify which was the genotype of the IPNV that affected the Atlantic Salmon that year. Therefore the importance of the present study, considering that one of the characteristics among the serotypes is the mortality associated to the presence of each one of them, is that knowing the more prevalent serotype, better prophylactic and handling procedures could be done in order to diminish the fish mortality rate product of IPNV outbreaks.

For genotyping of the studied isolates, the RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) was used, by means of the use of five restriction endonucleases. Once the profiles were obtained of every one of the studied strains, these were compared with the reference strain profiles.

Based on the analysis of genotyping of the 15 isolates, coming from different environments of the X and the XI region, one concluded that the IPNV infections that affected the Atlantic Salmon (*Salmo salar*) farmed on the year 2004 corresponds to the serotype Sp.

2. INTRODUCCIÓN

La industria salmonera se inició en Chile a principios de la década de los 80 y es la que ha mostrado mayor dinamismo y crecimiento dentro del sector acuícola nacional. En el año 2004 la producción bruta alcanzó 546.406 toneladas, generando un ingreso bruto al país de 1.345.920 millones de dólares, proyectándose un aumento de aproximadamente el 20% hacia el año 2005 (Aquanoticias, 2004).

En Chile, la industria salmonera basa su actividad principalmente en el cultivo de 3 especies: salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Durante el año 2004 la especie de mayor exportación fue salmón del Atlántico (*S. salar*), con 196.283 toneladas, seguido de salmón coho (*O. kisutch*) con 75.691 toneladas y en tercer lugar, trucha arcoiris (*O. mykiss*), con 81.690 toneladas, generando ingresos de 875.836, 231.860 y 329.656 millones de dólares, respectivamente (Aquanoticias, 2004).

Factores tales como el creciente aumento en la producción de especies salmonídeas, así como la sostenida importación de ovas provenientes, tanto de Europa como de América del Norte, se traducen inequívocamente en un permanente riesgo de introducción y diseminación de enfermedades infecto contagiosas (Méndez, 1988).

Es así como, junto con el crecimiento de la industria salmonera, también se aumento la incidencia de diversas enfermedades, las que tienen una gran importancia económica. Entre estas enfermedades, las patologías causadas por agentes virales se consideran las de mayor importancia, debido principalmente a las dificultades asociadas tanto, al diagnostico como al control, además de inexistencia de un tratamiento terapéutico efectivo para ellas (Post, 1983; Sano, 1995).

En este contexto, podemos mencionar, por ejemplo, que el impacto económico de las virosis se evidencia principalmente en condiciones de explotación intensiva. En estos casos el costo directo es más sensible, dado que la mayoría de las pérdidas afectan generalmente a animales jóvenes, para los cuales los costos de producción se ven aumentados por el tiempo de cuidado y la cantidad de alimento consumido. Un ejemplo de esto se encuentra en Europa donde la pérdida económica causada por la Septicemia Hemorrágica Viral (VHS) en truchas (*Oncorhynchus sp.*) representa más de 63.600 millones de dólares cada año (Hill, 1992).

Entre las enfermedades virales de importancia económica que afectan a los cultivos de salmónidos en Chile, se encuentra la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), la cual es una enfermedad viral causada por el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), patógeno que se transmite en forma horizontal y vertical. El virus IPN está diseminado por todo Chile causando cuantiosas pérdidas económicas tanto, en cultivos de agua dulce como cultivos de mar. Esta enfermedad produce grandes pérdidas económicas en el cultivo de salmónidos en Chile, en el año 1995

se estimaron aproximadamente en 60 millones de dólares, siendo aun mayores en el año 2004. Todos estos datos se calculan a partir de las mortalidades registradas por las pérdidas debidas, tanto a la reducción del volumen de cosecha como a los costos asociados al manejo necesario cuando se detecta un brote de la enfermedad (Bustos et al., 1999).

El impacto económico negativo en la salmonicultura está directamente relacionado con el aumento de las pérdidas por mortalidades causadas por la enfermedad, eliminación de plantales positivos, eliminación de reproductores portadores, progenie provenientes de reproductores portadores, aumento de los factores de conversión, disminución de las tasas de crecimiento e incremento de medidas de control.

En nuestro país se estima que las mortalidades asociadas a IPNV durante el año 2004 llegaron hasta el 90% de la producción de alevines en algunos centros de cultivo de agua dulce. Una vez trasladados los peces a centros de engorda la mortalidad asociada a este virus producto del estrés propio el traslado, se estima en cerca del 30 a 40 % en algunos centros de agua estuarina y mar (Godoy 2004).

En Chile el primer registro de IPNV se realizó en el año 1984 en trucha arcoiris (*O. mykiss*), cultivada en el lago Llanquihue, décima región. Posteriormente, se registraron numerosos diagnósticos llevados a cabo por diferentes laboratorios y que comprometían a distintas empresas; sin embargo fue sólo hasta noviembre de 1998

en que se publica y “oficializa” la presencia de IPNV en Chile por parte del SERNAP. Debido a las grandes mortalidades registradas, se relacionó la presencia de IPNV con el serotipo Sp (Europeo), el que demostró su patogenicidad tanto en truchas (*O. mykiss*), como en salmón del Atlántico (*S. salar*) (Isshiki et al. 2001).

Un estudio comparativo realizado por la Universidad Católica de Valparaíso, mediante anticuerpos monoclonales, entre el IPNV aislado en 1984 y el serotipo de referencia VR-299 (Americano), arrojó que se trataba del mismo serotipo; por otra parte en febrero de 1999 el Servicio de Ictiopatología de Fundación Chile confirma la presencia del serotipo Sp (Europeo) a partir de muestras recolectadas en distintos puntos geográficos de la décima región. Dado lo anterior la presencia de las dos cepas en Chile (VR-299 y Sp), se explica por la importación a Chile de gametos, tanto de Norteamérica como de Europa (Espinoza et al., 1985).

Entre las medidas de control implementadas para la enfermedad se encuentra la aplicación de medidas de bioseguridad, desinfección de ovas, sistemas de incubación individual, aplicación de vacunas y “screening” de reproductores.

Actualmente se estima que la cepa de virus dominante en Chile es la Sp, debido a que los patrones de mortalidad son similares a los observados en Europa por brotes de IPNV serotipo Sp (Rodger et al., 1997). Sin embargo, en Chile, se carece de estudios epidemiológicos sobre la situación de los serotipos de IPN presentes en el país (Hill et al., 1995; Cutrín et al., 2004).

El agente etiológico de IPN pertenece a la familia Birnaviridae (Leong et al., 2000), en la cual se encuentra el Avibirnavirus, agente causal de la enfermedad Bursátil Infecciosa (IBDV) de los pollos y el Entomobirnavirus, causante de Drosophila X (DXV) enfermedad que afecta a la *Drosophila melanogaster*. Dicha familia se encuentra reconocida por las autoridades en clasificación de virus, siendo designada como tal en el año 1984. (Mims and White, 1984; Roberts, 1989; Fenner et al., 1993). Todos los Birnavirus acuáticos son similares, tanto en morfología como también en sus propiedades bioquímicas y biofísicas, encontrándose aún más estrechamente relacionados antigénicamente (Dobos et al., 1979; Caswell-Reno et al., 1989).

Desde el punto de vista molecular, el genoma del virus IPNV consta de dos segmentos de RNA de doble hebra circunscritos por una cápside icosaédrica simple de 60 nm de diámetro (Dobos, 1976; Dobos et al., 1979). Todos los birnavirus acuáticos son similares en morfología, propiedades biofísicas y bioquímicas (Dobos et al., 1979). El genoma del segmento B (2784 pb) es monocistrónico y codifica un polipéptido interno VP1 (94 kDa). Se presume que el virión está asociado a RNA dependiente de RNA polimerasas. El genoma del segmento A (aproximadamente 3100 pb) contiene 2 ORF (Ducan et al., 1987; Havarstein et al., 1990). El ORF largo codifica una poliproteína de 106 kDa, la cual produce 3 polipéptidos: pVP2, precursor de la proteína mayor de la cápside VP2; VP3, una proteína menor de la cápside y NS, una proteína no estructural. La pVP2 es posteriormente cortada a VP2 durante la maduración del virus. VP2 es la proteína exterior de la cápside del virus, mientras

que VP3 es una proteína interna del virión. La actividad proteasa responsable de los cortes ha sido asociada con una proteína no estructural del virión NS (Duncan et al., 1987; Manning and Leong, 1990; Manning et al., 1990; Magyar and Dobos, 1994). El orden de estos polipéptidos dentro del genoma del virión es NH₂-pVP2-NS-VP3-COOH. El ORF pequeño codifica un polipéptido menor de 17kDa rico en arginina, designado como VP5. La VP5 ha sido detectada en virus purificados y en células infectadas (Magyar and Dobos, 1994), pero su función es desconocida. La secuencia nucleotídica completa del genoma del segmento A, ha sido determinada solamente para 4 cepas: Jasper-Dobos (JaD) (Duncan and Dobos, 1986), N1 (Havarstein et al., 1990), Sp (Mason and Leong, 1996) y West Buxton (WB) (Yao and Vakharia, 1998).

En la actualidad el virus se encuentra diseminado en la totalidad del globo, pudiendo identificarse una considerable variedad de serotipos, entre los cuales, los tres serotipos más importantes corresponden al serotipo VR-299, presente en los Estados Unidos de América, el serotipo Sp, principalmente establecido en Europa y el serotipo Ab, mayoritariamente reportado en Dinamarca. Sin embargo, actualmente se han caracterizado una gran cantidad de serotipos derivados a partir de los anteriormente señalados (Christie et al., 1988; Harvestein, 1990; Mortensen et al., 1990; Okamoto et al., 1993), los cuales pueden diferenciarse entre sí, fundamentalmente de acuerdo a sus características patológicas, tales como su virulencia. Con respecto a esta última característica a nivel mundial el serótipo menos virulento es el serotipo Danés (Ab), el cual ha ocasionado mortalidades que alcanzan un 15% en condiciones óptimas. En segundo lugar se encuentra el serotipo

Europeo (Sp), el cual ha generado mortalidades de un 30 a 60% en alevines, mientras que el serotipo Americano (VR-299) se consolida como el más virulento dado que puede producir mortalidades de hasta un 100% (Alvarado, 1990; Schlottfeldt and Alderman, 1991).

La mayoría de los Birnavirus acuáticos se encuentran antigénicamente relacionados y pertenecen a un serogrupo simple (serogrupo A). Sin embargo, unos pocos aislados presentan variabilidad antigénica respecto del serogrupo anterior por lo que han sido clasificados como pertenecientes a otro serogrupo (serogrupo B), todo esto sobre la base de títulos de neutralización con antisueros policlonales (Hill and Way, 1983, 1995) y anticuerpos monoclonales (Mab) en modelos de reacción de inmunoensayos con enzimas (Caswell-Reno et al., 1989).

El serogrupo A contiene 9 serotipos: A1 (West Buxton, WB, o VR-299), A2 (Spjarup, Sp), A3 (Abild, Ab), A4 (Hecht, He), A5 (Telliana, Te), A6 (Canadá 1, C1), A7 (Canadá 2, C2), A8 (Canadá 3, C3) y A9 (Jasper, Ja), mientras que el Serogrupo B contiene un serotipo TV-1. La tabla 1, resume la clasificación de los serotipos del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (Woo, 1999).

En la década de los 90, investigaciones realizadas a partir de una nueva cepa obtenida en Noruega (cepa N1), permitieron el establecimiento de un posible décimo serogrupo, denominado serogrupo A10 (N1), perteneciente al serogrupo A (Christie et al., 1988; Christie et al., 1990). Por otra parte, virtualmente todos los birnavirus

acuáticos aislados desde especímenes de agua dulce y especies marinas en Estados Unidos pertenecen al serotipo A1. Cuatro serotipos A6, A7, A8 y A9 se encuentran en Canadá, mientras otros cinco serotipos A2, A3, A4, A5 y A10 aparecen en Europa.

Adicionalmente, se ha reportado el aislamiento de elementos representativos de los serotipos A1, A2 y A9 en muestras provenientes tanto de Asia como de Sudamérica y en este último caso, específicamente Chile (McAllister et al., 1986; Caswell-Reno et al., 1989).

Epidemiológicamente, IPNV es una enfermedad aguda, altamente contagiosa, que afecta tanto a alevines como a peces de mayor tamaño, presenta una amplia distribución geográfica (Wolf, 1988).

Tabla 1: Clasificación serológica del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa
(Woo, 1999)

NOMENCLATURA	ESPECIE	AUTOR	ORIGEN	SEROTIPO
<i>ACTUAL</i>				
<i>Serogrupo A</i>				
WB	<i>O. mykiss</i>	Lientzy et al., 1973	USA	A ₁
Sp	<i>O. mykiss</i>	Jorgensen et al., 1969	Europa	A ₂
Ab	<i>O. mykiss</i>	Jorgensen et al., 1971	Europa	A ₃
He	<i>Esox lucius</i>	Ahne, 1979	Europa	A ₄
Te	<i>Tellina tenuis</i>	Hill, 1976	Europa	A ₅
C1	<i>Salmo salar</i>	MacDonald et al., 1983	Canadá	A ₆
C2	<i>O. mykiss</i>	MacDonald et al., 1983	Canadá	A ₇
C3	<i>Salmo trutta</i>	MacDonald et al., 1983	Canadá	A ₈
Jasper	<i>O. mykiss</i>	Yamamoto, 1974	Canadá	A ₉
<i>Serogrupo B</i>				
TV-1	<i>Tellina tenuis</i>	Underwood, 1977	Europa	B ₁

Clínicamente la enfermedad causada por el virus IPN, varía dependiendo del serotipo, etapa de cultivo y condición fisiológica de los peces (Rosenlund, 1977), así como también de acuerdo a las condiciones ambientales de las zonas de cultivo, tales como temperatura, contenido de oxígeno del agua y densidad de cultivo (Roberts, 1989). En los salmónidos, el cuadro agudo de esta enfermedad ocurre entre el primer y cuarto mes de cultivo, llevando muchas veces a una mortalidad acumulada del 100%. Por el contrario, en cultivos mayores a seis meses o más, la infección es subclínica o inaparente, no experimentándose pérdidas significativas. Los tejidos de los peces afectados, tales como el páncreas y tejidos vecinos se observaban seriamente dañados, con la subsecuente restricción en la producción de enzimas pancreáticas lo que se traduce en una disminución, tanto del crecimiento como en la tasa de conversión (Quaglio, 1989).

Externamente los peces afectados por IPNV muestran natación errática, con violentos movimientos rotatorios, pigmentación oscura, exoftalmia moderada y distensión abdominal, asimismo en algunas oportunidades presentan hemorragias en el área ventral, incluyendo las aletas ventrales, mientras las branquias habitualmente se observan pálidas (Wolf, 1988).

Por otra parte, desde una perspectiva anatomopatológica, en la necropsia es posible observar tanto el hígado como el bazo con evidentes signos de anemia, el estómago e intestino con ausencia total o parcial de alimento pero con fluido mucoso, en tanto se hacen evidentes hemorragias petequiales en los ciegos pilóricos y en el tejido pancreático. Histopatológicamente, las células acinares del páncreas y ocasionalmente, la cubierta lipídica de éstas, muestran una necrosis masiva caracterizada por pignosis, cariorexis e inclusiones intracitoplasmáticas (Stoskapt, 1992). La vesícula biliar puede estar dilatada y repleta de bilis (Quaglio, 1989). El epitelio intestinal necrótico se une con el exceso de mucus para formar un exudado catarral blanquecino (McKintosh and Roberts, 1976). Cambios histopatológicos también pueden ocurrir en el tejido renal excretor y hematopoyético, tales como congestión o hemorragia en los glomérulos, edema y destrucción o descamación del epitelio tubular (Wolf, 1988). El tejido pancreático y hepático se encuentran infiltrados por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. Las lesiones predominantes son degenerativas y necrosantes (de Kinkelin et al., 1991).

En la Necrosis Pancreática Infecciosa la aparición hacia el cuarto día post-infección, de focos de destrucción pancreática es coincidente con la detección viral por métodos inmunológicos y justifica las manifestaciones clínicas digestivas de la enfermedad cuya mortalidad aparece siempre algunos días después de la aparición de las lesiones pancreáticas (Swanson, 1981).

La transmisión de la enfermedad puede ocurrir por el contacto directo entre peces o por mediación del agua y de otros vectores, sean éstos animados o inanimados, la mayor parte de los virus cuyas infecciones son transmisibles experimentalmente se pueden transmitir de esta forma (Calderón, 1998). Sin embargo, el peligro radica en que peces de otras especies infectados subclínicamente pueden constituir una importante vía de transmisión del virus de la necrosis pancreática infecciosa (Wolf, 1988). Adicionalmente existe evidencia de que el virus IPN también puede ser transmitido verticalmente a través de las ovas. Es así como ensayos experimentales han demostrado que el virus puede adherirse estrechamente a la superficie de la ova y persistir en ella hasta la eclosión (Ahne and Negele, 1985).

Actualmente en Chile, se encuentran disponibles diferentes técnicas diagnósticas para la detección del IPNV. Dentro de toda la gama de alternativas diagnósticas disponibles, los métodos serológicos, son los más ampliamente utilizados, pudiendo mencionar por ejemplo: anticuerpos fluorescentes (Nicholson and Dunn, 1974; Tu et al., 1974; Vestergard and Jorgensen, 1974), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) (Nicholson and Caswell, 1982; Dixon and Hill, 1983b; Hattori et al., 1984), test inmunoperoxidasa (Reno, 1976; Nicholson and Henchal, 1978), inmunodot (McAllister and Schill, 1986; Ramsey et al., 1986; Caswell-Reno et al., 1989; Babin et al., 1991; Ross et al., 1991), fijación del complemento (Finlay and Hill, 1975), inmunodifusión y seroneutralización (Nicholson and Pochebit, 1981), coaglutinación de staphylococcus (Kimura et al., 1984; Bragg and Combrick, 1987b), entre otros. Estas pruebas varían tanto en sensibilidad como en especificidad y en la

complejidad y eficiencia en la ejecución de cada una, así como en la rapidez de los resultados, volumen de muestras a procesar, requerimientos de implementación y calificación del personal responsable.

Otra alternativa aplicada para el diagnóstico presuntivo de IPNV, involucra el cultivo de éste en líneas celulares adecuadas, sin embargo, estos resultados deben ser corroborados mediante la aplicación de técnicas serológicas o moleculares complementarias (Cunningham, 1971). Con este método es posible aislar el virus y propagarlo para estudiar su ciclo infectivo. De esta forma se obtiene gran cantidad de progenie viral en pocas horas de incubación.

Entre los distintos tipos de líneas celulares implementadas para estos propósitos se tienen: las que se reproducen eternamente y que provienen de tumores malignos y aquellas que se mantienen sólo durante un cierto número de ciclos, las cuales provienen de tejido embrionario. Ambas se mantienen congeladas en nitrógeno líquido durante meses o años. En el caso de virología de peces, se ha utilizado un gran número de líneas celulares y específicamente en el caso del virus IPN, las que mejor resultado han evidenciado son la línea celular "Salmon Chinook Embryo" (CHSE-214) de morfología endotelial y cuyo origen son células embrionarias de Salmón Chinook y la línea Rainbow Trout Gonad (RTG-2) de morfología fibroblástica, cuyo origen son células gonadales de trucha arcoiris (Fryer et al., 1965), cada una de ellas tiene sus parámetros de crecimiento propios y requieren de una

cuidadosa manipulación.

Prácticamente la totalidad de los primeros trabajos de detección del virus IPN se desarrollaron por el método de los cultivos celulares y de hecho, hoy se sigue usando en la mayoría de los laboratorios de patología de peces. Su ventaja es la sensibilidad, ya que en teoría basta una sola partícula viral para infectar las células, las cuales sufren una deformación en su estructura ocasionando finalmente la lisis de la célula, proceso que se conoce como efecto citopático (ECP); pero su gran desventaja es que requiere de 14 días para entregar un resultado seguro y confiable (OIE, 2004). Como los procesos de manipulación en la salmonicultura requieren de una optimización en los tiempos, se hace necesario desarrollar métodos diagnósticos más rápidos, pero igualmente efectivos.

Por otra parte, la aplicación de metodologías profilácticas eficientes hace necesario contar con métodos de diagnósticos rápidos y exactos. Por esta razón a comienzos de los años 80 comienzan a desarrollarse técnicas serológicas como seroneutralización y los primeros estudios por inmunofluorescencia, ELISA e inmunoperoxidasa en trucha (Ahne, 1981; Dixon y Hill, 1983b; Caswell-Reno et al., 1986; Reno, 1988), como también se comienzan a realizar por esos años los primeros ensayos de infección experimental de salmónidos (Swanson, 1981; Ahne and Thomsen, 1986; McAllister and Owens, 1986), con el propósito de estudiar la patogénesis del virus y detectarlo en posibles portadores. En los años 90 surgen los primeros avances en técnicas serológicas de inmunoensayos llamados inmunodot o

“Dotblot”, como una alternativa de diagnóstico rápido y económico (Lipipun et al., 1988; Ross et al., 1991).

Con este mismo objeto, surge también a mediados de la década de los 90 el PCR (Polymerase Chain Reaction) y RT-PCR (Transcriptase reverse-Polymerase Chain Reaction), como una valiosa herramienta alternativa con el propósito de disponer un método diagnóstico rápido, de alta especificidad y sensibilidad para el control de la necrosis pancreática infecciosa (Dopazo et al., 1994; Ganga et al., 1994).

La técnica RT-PCR es un método *in vitro* de replicación del ADN. Esta técnica permite que una secuencia de ADN específica y única del microorganismo que se desea identificar sea amplificada varios millones de veces en unas pocas horas. Durante el proceso de división celular, la replicación involucra una serie de reacciones mediadas por enzimas, cuyo producto final es una copia exacta del genoma completo. El método RT-PCR implica el uso de un partidor o “primer”, el cual se aparea con su secuencia complementaria en el genoma del patógeno y mediante la enzima Taq Polimerasa replica el segmento de interés para diagnóstico.

La técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción de ADN (RFLP), se basa en cortar una secuencia genómica con enzimas de restricción las que digieren lugares específicos del genoma, formando un patrón de bandas específico para el fragmento que se investiga. Muchas mutaciones crean un nuevo lugar de restricción en un genoma o destruyen uno ya existente. Si se produce una

mutación de este tipo dentro de un determinado gen o cerca de él, el patrón de fragmentación de restricción se modificará y este patrón puede determinarse mediante transferencia de "Southern". Con el uso de diferentes enzimas de restricción y sondas de hibridación, se puede generar un patrón de RFLP que es casi único para cada individuo.

De acuerdo a la anteriormente descrito se destaca la importancia de establecer los serotipos de IPNV existentes en las poblaciones de cultivo de especies salmonídeas en Chile relacionados a la alta mortalidad asociada a este virus, es así que se plantea como hipótesis que en los cultivos de salmón del Atlántico, desarrollados en la décima y undécima región durante el año 2004, estarían presentes los serotipos Sp, Ab y VR-299, los cuales habrían afectado al cultivo del salmón del atlántico en dicho periodo.

Para comprobar esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos general y específicos:

Objetivo General:

Determinar la variabilidad genómica del IPNV de diferentes cepas aisladas de IPNV, provenientes de casos clínicos en salmón del Atlántico, de la décima y undécima región, que presentan signos clínicos de IPNV, recepcionados en el laboratorio de Ictiopatología de Fundación Chile, Puerto Montt, durante el año 2004.

Objetivos específicos:

- Estandarizar la técnica de RFLP para la genotipificación de las cepas, tanto de referencia como las aisladas para realizar el presente estudio.
- Identificar las variantes genéticas IPNV, que afectan al salmón del Atlántico, provenientes de diferentes sistemas productivos (lago, piscicultura, estuario y mar), durante el año 2004.
- Genotipificación de las diferentes cepas aisladas de IPN, mediante la técnica RFLP.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. REACTIVOS

- Acetato de amonio, Merck.
- Ácido clorhídrico, Merck.
- Agarosa, Invitrogen.
- Bromuro de etidio, Promega.
- Cloruro de magnesio, Invitrogen.
- Chinook Salmon Embrio (CHSE-214), ATCC.
- Cloruro de sodio, Merck.
- dNTPs, Invitrogen.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS), Merck.
- Etanol, Merck.
- Etilendiaminotetracetato de sodio (EDTA), Merck.
- Estreptomicina, Invitrogen.
- Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), Invitrogen.
- M-MLV Transcriptasa reversa, Promega.
- Medio mínimo esencial (MEM), Invitrogen.
- Penicilina, Invitrogen.
- Primers random hexamers, Invitrogen.
- Proteinasa K, Invitrogen.
- RNasin, Promega.
- Suero fetal bovino, Invitrogen.

- Trizol, Invitrogen.
- Taq DNA polimerasa, Invitrogen.
- Tris, Merck.
- Tampón PCR, Invitrogen.
- TAE 50x, Invitrogen.

3.1.2. EQUIPOS

- Termociclador MJ Research, PTC 100
- Fuente de poder BRL modelo 4000
- Centrifuga hettich modelo Mirko 22R
- Software computacional BioCap 1. Vilber Lourmat
- Sistema fotográfico para geles. Vilber Lourmat

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Para el aislamiento de las diferentes cepas aisladas de virus IPN utilizadas en este estudio se recolectaron muestras de tejido renal de salmón del Atlántico que presentaron signos clínicos de la enfermedad, las cuales fueron recepcionadas en el Laboratorio de Ictiopatología de Aquagestion-Fundación Chile, durante el año 2004.

Para realizar este trabajo se utilizaron 15 cepas de virus IPNV, las que fueron individualizadas mediante el número de caso que da el laboratorio cuando son ingresadas para su análisis. Estas muestras provenían de diferentes centros de la décima y undécima región.

3.2.2. AISLAMIENTO VIRAL MEDIANTE CULTIVO CELULAR

Se aisló el virus IPN, mediante la técnica de cultivo celular, utilizando la línea celular CHSE-214 “Chinook Salmon Embryo”, ATCC No. CRL-1681. La temperatura usada para la manipulación y replicación de las células fue de 22° C y para la inoculación viral de 15° C. La línea celular CHSE-214 crece en una monocapa celular con medio de cultivo MEM (Minimum Esencial Medium (Invitrogen)), el cual esta constituido por un 10% de suero fetal bovino (Invitrogen), penicilina y estreptomicina (Invitrogen), en concentraciones de 100 µl/ml y 100 µl/ml por medio (OIE, 2004).

Los homogeneizados de tejidos fueron inoculados en monocapas de células CHSE-214 y cultivadas en placas de 96 pocillos. La evolución de la infección se siguió por 21 días. Al momento de observar efecto citopático, se confirmó la presencia del virus mediante Dot-Blot, PCR-ELISA e inmunofluorescencia (OIE, 2004).

3.2.2.1. CONFIRMACIÓN DE IPNV MEDIANTE DOT BLOT

Se depositó sobre una membrana de nitrocelulosa, 10 µl de sobrenadantes de cultivo celular, de muestras que evidenciaron efecto citopático (ECP), a la cual se le bloquearon los sitios inespecíficos del papel con una solución de leche descremada al 5%, posteriormente se le adicionó 2.5 ml de anticuerpo anti IPNV en una dilución 1:500. Se incubó por un período de 30 min, luego del período de incubación se agregó 5 ml del segundo anticuerpo anti-anti IPNV en una dilución 1:2000 y se incubó por un período de 1 hora, una vez finalizada la segunda incubación se agregó solución de revelado la que se dejó actuar por un periodo de 5 min o hasta la aparición de color, el que se observa como un pequeño círculo de color café grisáceo, el que posteriormente se torna pardo, en caso de una reacción positiva o una ausencia de coloración en la membrana, en caso de una reacción negativa.

3.2.2.2. CONFIRMACIÓN IPNV MEDIANTE RT-PCR-ELISA

Para la confirmación del IPNV se utilizó el Kit comercial IPNV-GenoTest II (BiosChile^R), este es un kit comercial para la detección del virus IPN, en este ensayo el proceso de transcripción y amplificación del genoma viral se realizó en una sola etapa, ya que las enzimas transcriptasa reversa y Taq DNA polimerasa están incluidas en el mismo tubo de reacción. Esto nos permitió sintetizar el cDNA correspondiente al RNA del virus e inmediatamente realizar la amplificación, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), del fragmento de ADN “flanqueado” por los partidores específicos para el virus. La detección del producto de amplificación se realizó con un ensayo de ELISA, donde el amplicón es capturado en una reacción específica para la secuencia del genoma viral.

3.2.3. CEPAS IPNV DE REFERENCIA

Como control se utilizaron tres cepas previamente serotipificadas del virus IPN, proporcionadas por el Dr. Ricardo Enríquez, Universidad Austral de Chile (Aqua-1), el Dr. Aldo Gaggero, Universidad de Chile (Aqua-2) y Aquagestion-Fundación Chile (Aqua-3). Estos serotipos corresponden a Ab, VR-299 y Sp respectivamente, los que se encuentran actualmente en líneas de cultivo celular en el laboratorio de Ictiopatología de Aquagestion-Fundación Chile.

3.3. IMPLEMENTACION PCR y RLFP

3.3.1. SELECCIÓN DE PARTIDORES

Los partidores fueron seleccionados sobre las bases de secuencias publicadas de los cDNAs del genoma del segmento A de las cepas de Birnavirus acuático Ja y N1. Estos “primers” corresponden a los publicados por Blake et al., (1995) y son los siguientes:

PrA1: 5'-TGA GAT CCA TTA TGC TTC CAG A-3'

PrA2 : 5'-GAC AGG ATC ATC TTG GCA TAG T-3'

Estos partidores amplifican una región de aproximadamente 1180 bp del gen que codifica para la proteína VP-2 del virus.

3.3.2. EXTRACCIÓN DE RNA

El RNA fue extraído desde sobrenadante de cultivo celular Infectado con IPNV, para lo cual se extrajeron 100 µl de la suspensión viral los que fueron incubados con 400 µl de tampón de lisis (Tris – HCl 30 mM, pH 7.4 (Merck), SDS 1% (Merck), NaCl 100 mM (Merck), EDTA 5 mM (Merck), 6.75 µl de proteinasa K (2 mg/ml) (Invitrogen), a 37°C por 30 min. El RNA fue extraído con TRIzol (Invitrogen), según instrucciones del fabricante.

3.3.3. SÍNTESIS DE cDNA

Las muestras de RNA fueron calentadas por 5 min. a 95°C, y luego colocadas sobre hielo, 3 µl de cada muestra de RNA se mezcló con 22 µl de una solución que contiene dNTPs 1 mM (Invitrogen), RNasin 40 U (Promega), “primers Random hexamer” 1.25 mM (Invitrogen) y M-MLV transcriptasa reversa 200 U (Promega). La mezcla fue incubada por 1 h a 42°C y luego calentada por 5 min. a 95°C para denaturar la enzima .

3.3.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El PCR descrito por (Blake et al., 1995) fue utilizado para amplificar los fragmentos genómicos de cada uno de los virus aislados, se mezcló 3 µl de cDNA con 22 µl de un “mix” que contiene, tampón de PCR (Invitrogen), MgCl₂ 4 mM (Invitrogen), 50 pmol de cada “Primers” (Invitrogen) y Taq DNA Polimerasa 5 U (Invitrogen). Posteriormente las muestras fueron puestas en un termociclador (MJ Research) por 35 ciclos (denaturación inicial por 5 min a 95°C, denaturación por 45 seg a 94°C, apareamiento por 45 seg a 60°C y extensión por 1.5 min a 72°C y una extensión final por 7 min a 72°C).

3.3.5. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

A 95 µl de cDNA se le adicionó 205 µl de agua estéril a los que se les agregó 300 µl de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico en una proporción 25:24:1 (Invitrogen). El cDNA contenido en la fase acuosa (aproximadamente 300 µl) se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto (600 µl), (Merck) y 0,1 volumen de acetato de amonio 3 M (30 µl), (Merck). A continuación se incubó a -20°C durante toda la noche y luego el ADN se recupero por centrifugación a 13.000 rpm por 15 min. a 4°C. Posteriormente, se descarto el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 70% (Merck), luego se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 5 min. a 4°C y se descartó el sobrenadante. El sedimento se dejó secar al aire, para posteriormente resuspenderlo con 30 µl de agua desionizada.

3.3.6. DIGESTION DEL cDNA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Los productos de PCR purificados fueron subsecuentemente digeridos con 5 endonucleasas de restricción *Eco* RI, *Pvu* II, *Hae* III, *Mbo* I y *Bam* HI (Invitrogen). Esta digestión se llevó a cabo a 37°C por 1 hora, de acuerdo a las condiciones propuestas por el proveedor de la enzimas. La tabla 2 detalla las enzimas de restricción utilizadas y sus respectivos sitios de corte.

Los fragmentos de ADN digeridos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Los tamaños de los fragmentos fueron determinados por comparación con marcadores de tamaño molecular, mediante el software computacional BioCap 1.

3.3.7. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y DETERMINACIÓN PESO MOLECULAR DE LOS PRODUCTOS PCR

Los productos de PCR de las muestras y los perfiles de variabilidad genética obtenidos por las enzimas de restricción, fueron separados en geles de agarosa al 1.5 % en Tampón de electroforesis TAE 1x (Tris 40 mM, acetato 20 mM, EDTA 2 mM) (Invitrogen) a 100 mA durante 1 hora. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) (Sambrook et al., 1989), posteriormente fueron puestos sobre un transiluminador de luz U. V. para la visualización de las respectivas bandas, las cuales fueron registradas mediante un equipo capturador de imágenes.

3.4. RFLP CEPAS DE REFERENCIA

Se procedió a realizar análisis de polimorfismo mediante RFLP. Para esto se usaron las cepas de referencia (Sp, Ab y VR-299) con las que cuenta el laboratorio (Aquagestion-Fundación Chile), estos corresponden a cepas nacionales, los que fueron proporcionados por la Universidad Austral de Chile, Universidad de Chile y Aquagestion-Fundación Chile

Tabla 2: Enzimas de restricción utilizadas y sitios de cortes (Invitrogen, 2005)

ENZIMA	SITIO CORTE 1	SITIO DE CORTE 2
<i>Eco</i> RI	5' – G ↑ AATT C – 3'	3' – C TTAA ↓ G – 5'
<i>Pvu</i> II	5' – CAG ↓ CTG – 3'	3' – GTC ↑ GAC – 5'
<i>Mbo</i> I	5' – ↓ GATC – 3'	3' – CTAG ↑ – 5'
<i>Bam</i> HI	5' – G ↓ GATC C – 3'	3' – C CTAG ↑ G – 5'
<i>Xho</i> I	5' – C ↓ TCGA G – 3'	3' – G AGCT ↑ C – 5'

3.4.1. GENOTIPIFICACIÓN DE AISLADOS NACIONALES MEDIANTE RFLP

Para realizar la genotipificación de las cepas nacionales mediante RFLP, se procedió a realizar aislamientos del virus inoculando tejidos de peces que presentaron signos clínicos, en líneas celulares CHSE-214 según lo descrito por OIE (2004). Estos aislados corresponden a casos clínicos recepcionados en el laboratorio de Ictiopatología Aquagestion-Fundación Chile, aislados de salmón del Atlántico y corresponden a diferentes centros de cultivo, provenientes de la décima y undécima región.

4. RESULTADOS

4.1. MATERIAL BIOLOGICO

En base a la signología clínica característica del IPNV, se procedió a inocular las muestras de tejidos en cultivo celular de acuerdo a la metodología descrita por OIE (2004), obteniéndose efecto citopático (EPC) promedio entre los 4 y 7 días. La tabla 3 muestra la información epidemiológica correspondiente a las 15 cepas aisladas utilizadas en este estudio. En esta se puede observar el lugar de procedencia de cada cepa aislada, la especie de donde fue aislado, etapa de cultivo de los peces y ambiente en el que se encontraban los peces al momento de aislar las cepas.

La confirmación de la presencia del virus IPN en los cultivos celulares se realizó utilizando las técnicas “Dot-Blot” (Sambrook, et al. 1989), PCR ELISA (Caswell-Reno, 1986; Davis and Boyle, 1990) e Inmunofluorescencia (Kuznar et al., 1999).

La tabla 4 resume los resultados obtenidos en cada una de las cepas, aquí se observa el resultado obtenido después de realizar la inoculación de los tejidos en los cultivos celulares y con cada una de las técnicas utilizadas para la confirmación del virus IPN de los diferentes cepas aisladas, provenientes de salmón del Atlántico.

Tabla 3: Información epidemiológica de las cepas aisladas utilizados en este estudio.

N° CEPA	PROCEDENCIA	ESPECIE	ESTADO DE	AMBIENTE
			CULTIVO	DE CULTIVO
1	Lago Llanquihue	<i>S. salar</i>	Smolt	Lago
2	Lago Chapo	<i>S. salar</i>	Alevín	Piscicultura
3	Lago Rupanco	<i>S. salar</i>	Smolt	Lago
4	Lago Ranco	<i>S. salar</i>	Alevín	Piscicultura
5	Comienzo Estuario Reloncavi	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar
6	Final Estuario Reloncavi	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar
7	Bahía Puerto Montt	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar
8	Bahía Puerto Montt	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar
9	Chiloe 1	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar
10	Chiloe 2	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar
11	Chiloe 3	<i>S. salar</i>	Alevín	Piscicultura
12	Chaiten	<i>S. salar</i>	Alevín	Piscicultura
13	Puerto Cisnes	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar
14	Puerto Chacabuco 1	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar
15	Puerto Chacabuco 2	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar

Tabla 4: Resumen de las técnicas confirmatorias utilizadas en la totalidad de las muestras seleccionadas para realizar esta tesis.

<i>N° CEPA</i>	<i>CULTIVO</i>	<i>CONFIRMACIÓN</i>	<i>CONFIRMACIÓN</i>	<i>CONFIRMACIÓN</i>
	<i>CELULAR</i>	<i>DOT BLOT</i>	<i>PCR-ELISA</i>	<i>INMUNOFLUORESCENCIA</i>
1	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
6	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
7	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
8	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
9	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
10	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
11	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
12	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
13	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
14	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo
15	EPC positivo	Positivo	Positivo	Positivo

En la figura 1A se observa el efecto citopático característico producido por IPNV, este efecto corresponde a la cepa número 5 utilizada en este estudio, en ésta se observan las aglomeraciones características generadas por la acción del virus, además de la destrucción total de la línea celular. Este efecto citopático fue observado en las 15 cepas utilizadas en este trabajo. La figura 1B, muestra la línea celular CHSE-214, en la cual se observa la integridad de la monocapa generada por esta línea celular, característica de los controles negativos utilizados en los aislamientos.

Una vez observado el efecto citopático en la línea celular se procedió a la confirmación de éste. En la figura 2 vemos la confirmación del efecto citopático mediante Dot-Blot, para realizar esta confirmación se tomó la cepa 4 y 8 (tabla 2), además se utilizó un control negativo que corresponde a sobrenadante de cultivo celular sin efecto citopático y un control positivo el que corresponde a un efecto citopático de una de las cepas utilizadas como referencia. Todos las cepas aisladas utilizadas en este estudio presentaron el mismo efecto citopático de la figura, mediante esta técnica la reacción positiva se observa mediante una coloración café.

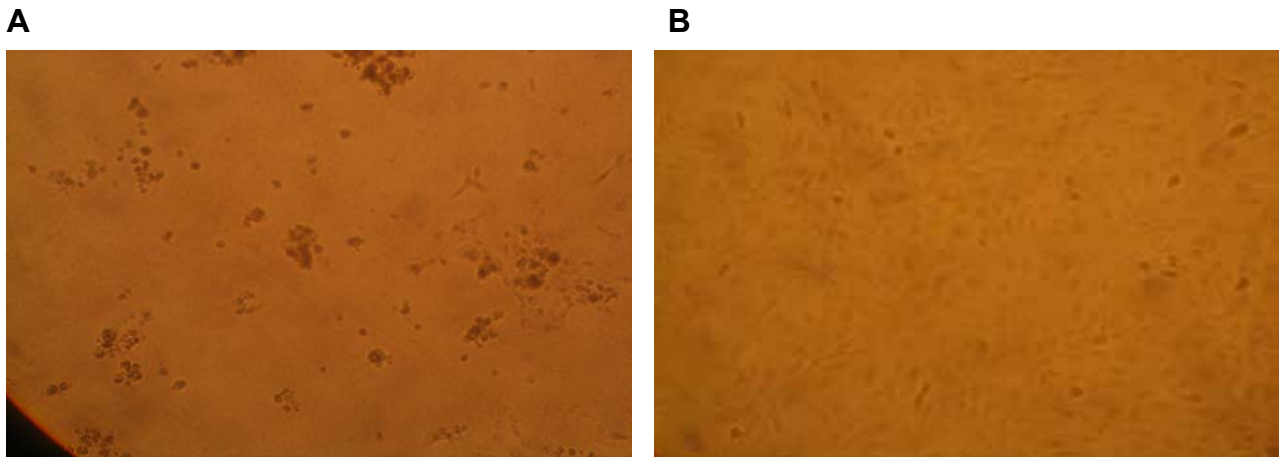


Figura 1: Línea celular CHSE-214

A) Efecto citopático característico generado por la infección con IPNV, B) Monocapa de células de morfología fibroblástica.

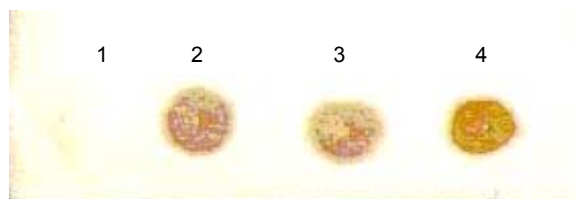


Figura 2: Dot-Blot confirmativo de muestras de cultivos celulares con efecto citopático. 1: Control negativo, sobrenadante de cultivo celular sin efecto citopático; **2:** Control positivo, sobrenadante de cultivo celular de la cepa Sp de referencia; **3:** Cepa 4; **4:** Cepa 8.

Posterior a la confirmación del efecto citopático de todas las cepas en estudio “Dot-Blot”, se procedió a realizar una nueva confirmación mediante RT-PCR ELISA, de esta forma corroboraríamos los resultados obtenidos mediante “Dot-Blot” y confirmaríamos que todas las cepas aisladas para realizar este trabajo correspondían a IPNV. En la figura 3 vemos la confirmación del efecto citopático observado en la línea celular CHSE-214 mediante RT-PCR ELISA, para esto se tomaron 4 cepas, 4, 8, 10 y 11, esta fotografía fue puesta en negativo para resaltar las bandas. Esta confirmación se realizó utilizando el kit comercial IPNV-GenoTest II (BiosChile®). En este ensayo el proceso de transcripción y amplificación del genoma viral se realizó en una sola etapa, cabe hacer mención que los partidores que utiliza este kit son distintos a los utilizados en este trabajo. Esto permite sintetizar el cDNA correspondiente al RNA del virus e inmediatamente realizar la amplificación. La detección del producto de amplificación se realizó mediante gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Una vez observado el resultado del gel de agarosa procedimos a realizar un ELISA con el producto de PCR obtenido para cada una de las muestras seleccionadas. La tabla N° 5 muestra la absorbancia obtenida por cada una de las cepas (4, 8, 10 y 11) a una longitud de onda de 405 nm. Para realizar este ensayo, se utilizó como control negativo, el producto de PCR de una muestra proveniente de cultivo celular sin efecto citopático y como control positivo, sobrenadante de cultivo celular proveniente de la cepa Sp de referencia.

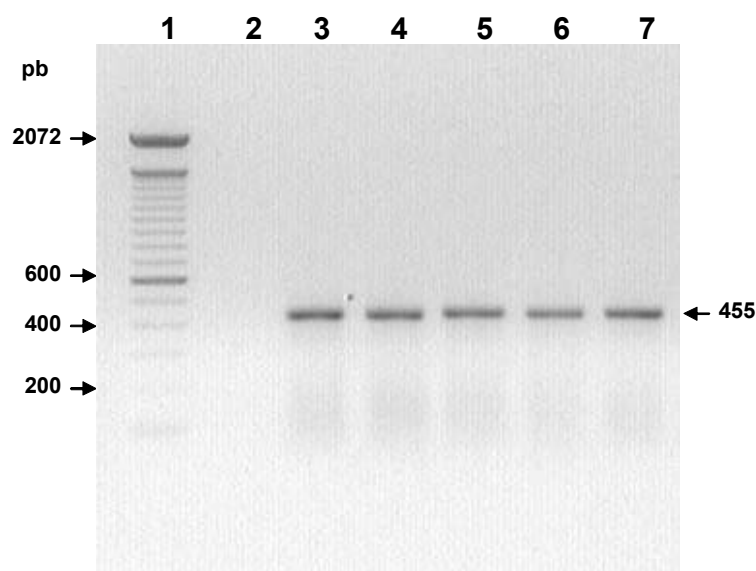


Figura 3: Gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio obtenido mediante el RT-PCR del kit comercial IPN-GenoTest II, en el **Carril 1:** Estándar de tamaño molecular; **Carril 2:** Control negativo; **Carril 3:** Control positivo; **Carril 4:** Cepa 4; **Carril 5:** Cepa 8; **Carril 6:** Cepa 10; **Carril 7:** Cepa 11.

Tabla N° 5: Absorbancia obtenidas mediante el test de ELISA a una longitud de onda de onda de 405 nm, de las cepas 4, 8, 10 y 11, además de sus respectivos controles.

N° CEPA	ABSORBANCIA
Control Positivo	2.890
Control Negativo	0.102
4	2.082
8	1.806
10	1.107
11	1.456

Adicionalmente junto con observar el efecto citopático y realizar todas las pruebas confirmatorias nombradas anteriormente, se procedió a realizar un ensayo de inmunofluorescencia para la totalidad de las cepas en estudio. En la figura 4 se observa la reacción de inmunofluorescencia positiva del cultivo celular observada en la cepa número 4. Esta muestra evidenció efecto citopático en el primer pasaje de cultivo celular. Aquí se puede ver claramente la fluorescencia específica de color verde. En el recuadro se indica como se ve una muestra sin efecto citopático debido a que no presenta ningún tipo de fluorescencia.

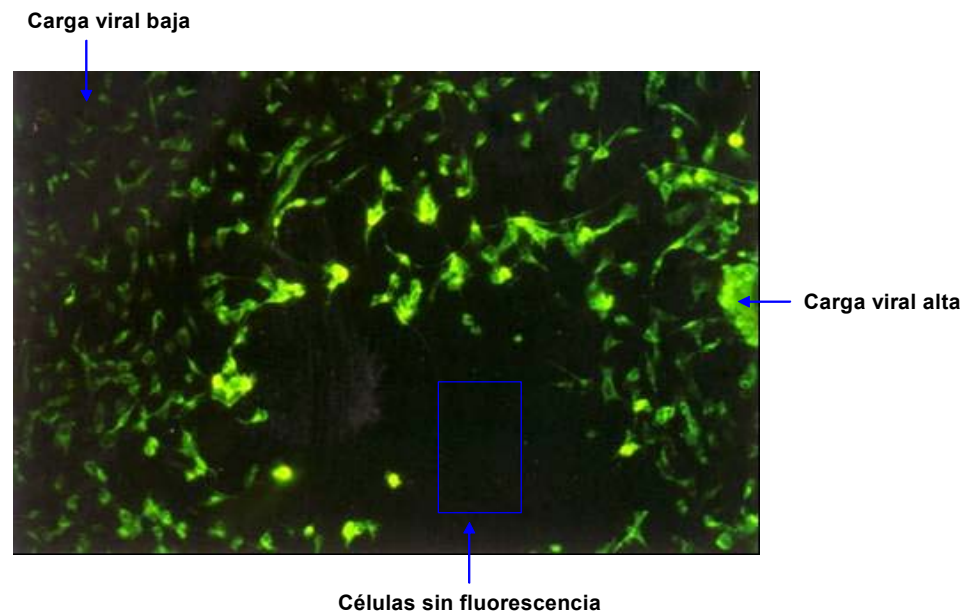


Figura 4: Células con inmunofluorescencia producto de la infección con IPNV.

La figura nos muestra la reacción obtenida para la cepa N° 4, esta fotografía fue tomada con un aumento de 40x.

4.2. ESTANDARIZACIÓN DE RFLP

En base a la metodología descrita de RFLP (Lee et. al., 1996), se procedió a realizar el RT-PCR de las tres cepas utilizados como referencia (Sp, Ab, VR-299), mantenidos en el cepario que dispone el laboratorio de Aquagestion-Fundación Chile. La figura 5 nos muestra el gel de agarosa de las 3 cepas de referencia utilizadas en este estudio, en las cuales se observa el producto de amplificación (1180 pb), esta fotografía fue puesta en negativo para resaltar las bandas. Una vez obtenido este producto se procedió a digerir con enzimas de restricción. Para esto utilizamos las 5 enzimas de restricción seleccionadas en este trabajo (*Eco* RI, *Bam* HI, *Mbo* I, *Xho* I y *Pvu* II). En la figura 6 podemos observar el resultado obtenido por cada una de las enzimas en cada una de las cepas utilizadas como referencia en este estudio. El panel A muestra el perfil de la cepa Sp, el panel B muestra el perfil de la cepa Ab y el panel C muestra el perfil de la cepa VR-299. La tabla 6 nos resume los distintos tamaños de peso molecular obtenidos al cortar con enzimas de restricción cada una de las cepas control, estos tamaños fueron obtenidos utilizando el software computacional BioCap 1 de Vilber Loumart.

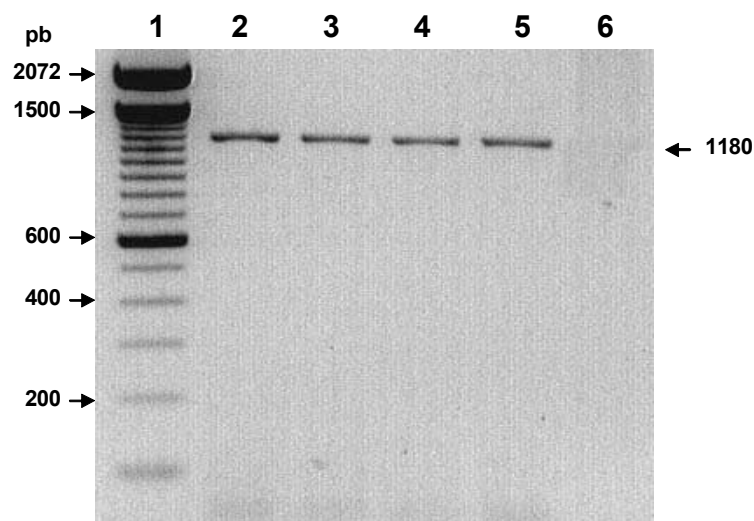


Figura 5: Productos de RT-PCR obtenidos de las cepas de referencia de IPNV, se cargaron 10 μ l del producto PCR sobre un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, **Carril 1:** Estándar de tamaño molecular, **Carril 2:** Cepa Sp, **Carril 3:** Cepa Ab, **Carril 4:** Cepa VR-299; **Carril 5:** Control positivo; **Carril 6:** Control negativo.

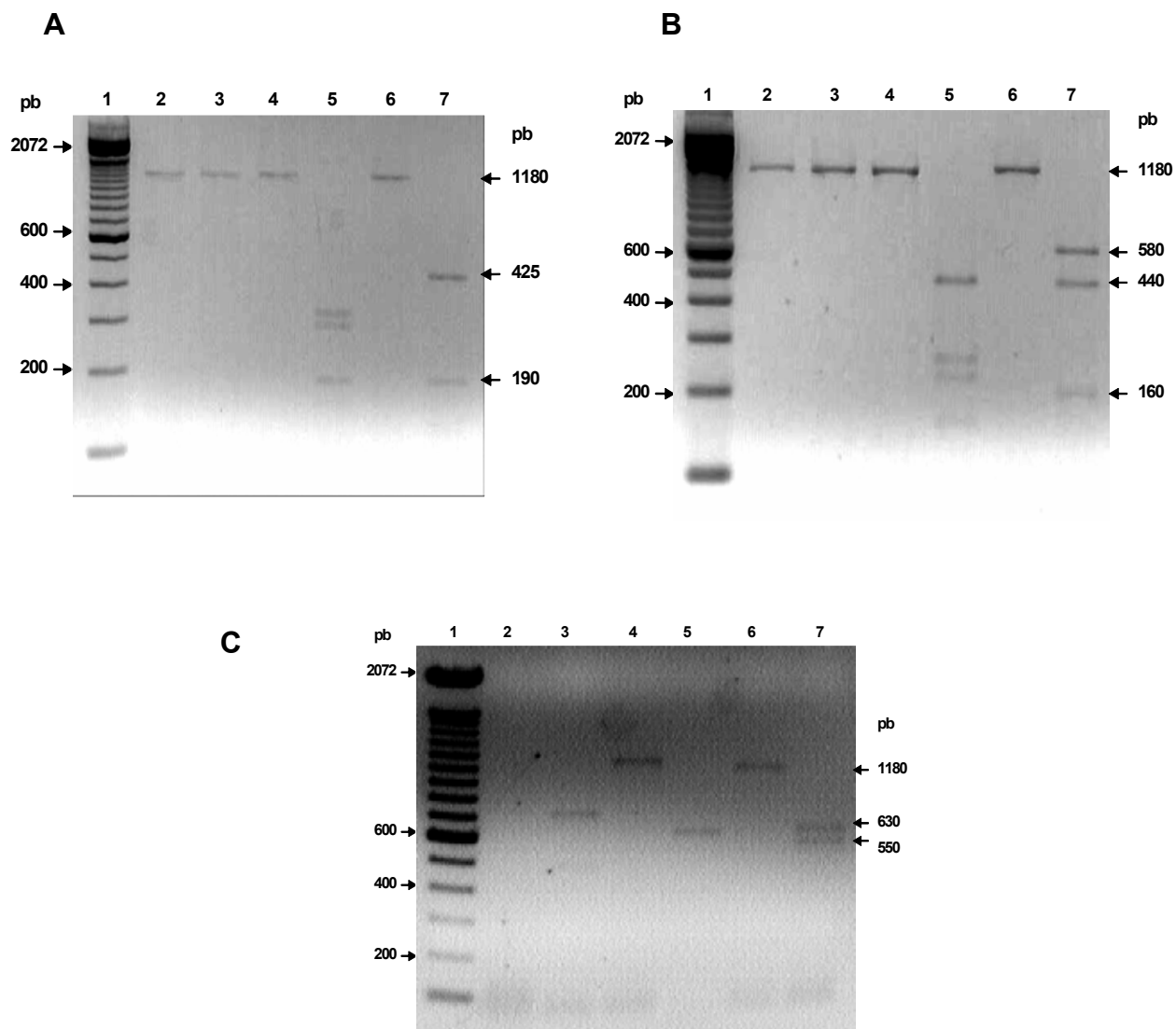


Figura 6: . Perfiles de RFLP de la digestión de un fragmento de 1180 pb de las cepas de referencia. En panel A se observa el RFLP de la cepa Sp, en el panel B se observa el RFLP de la cepa Ab y en el panel C se observa el RFLP de la cepa VR-299. En el **Carril 1:** Estándar de Tamaño Molecular 100 bp; **Carril 2:** Fragmento de 1180 bp sin digerir; **Carril 3:** Digestión con *Eco* RI; **Carril 4:** Digestión con *Bam* HI; **Carril 5:** Digestión con *Mbo* I; **Carril 6:** Digestión con *Xho* I; **Carril 7:** Digestión con *Pvu* II.

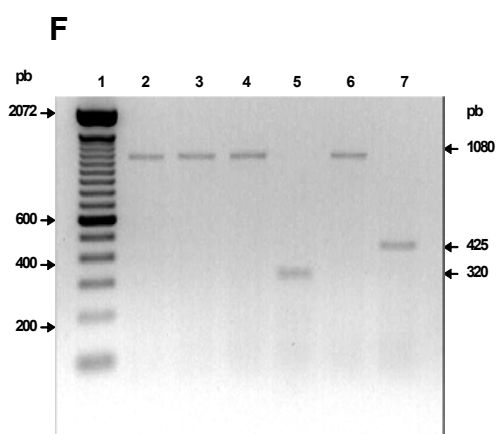
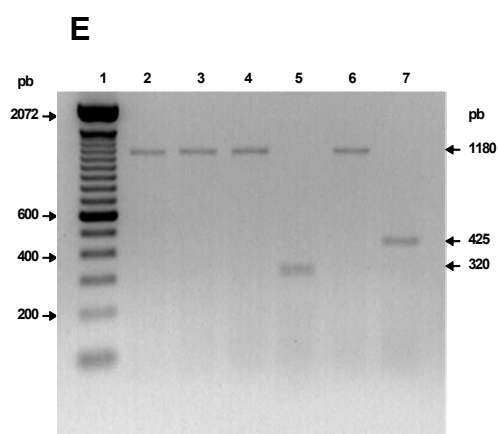
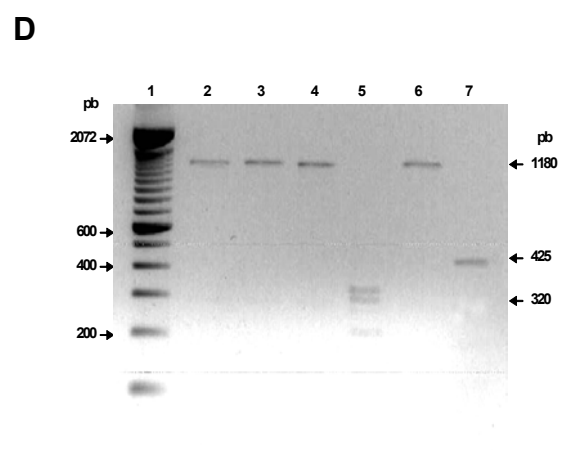
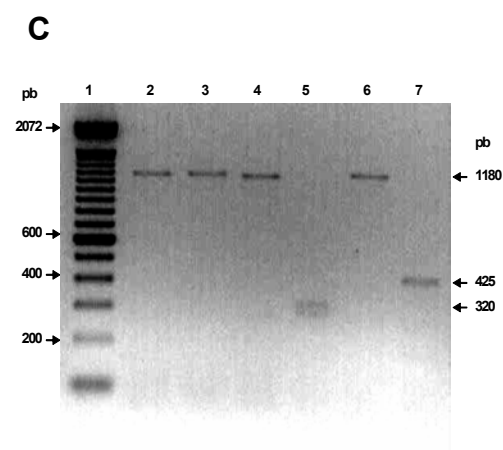
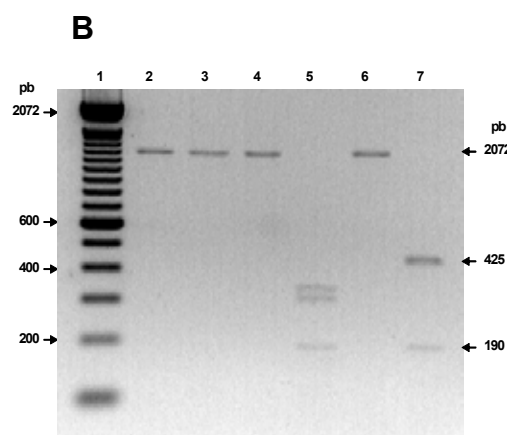
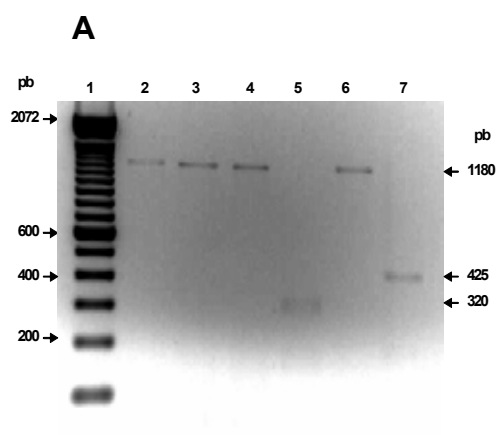
Tabla 6: Esta tabla muestra los fragmentos obtenidos por cada una de las cepas de referencia, mediante enzimas de restricción, estos valores fueron obtenidos mediante el software computacional BioCap 1.

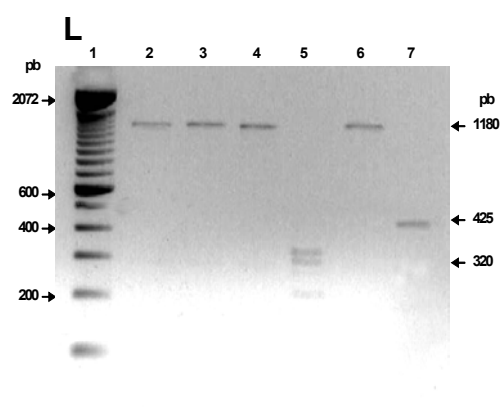
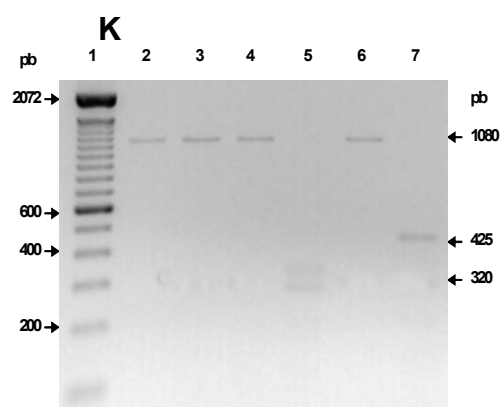
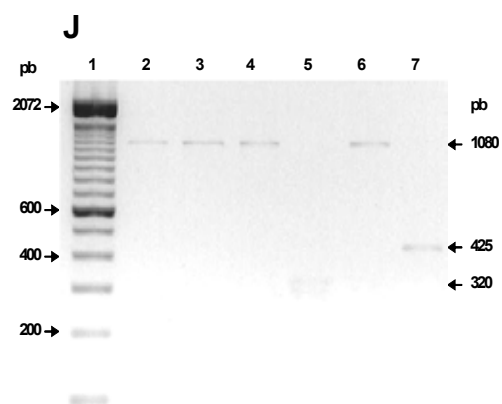
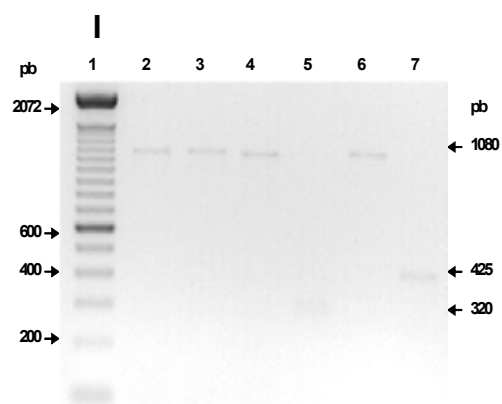
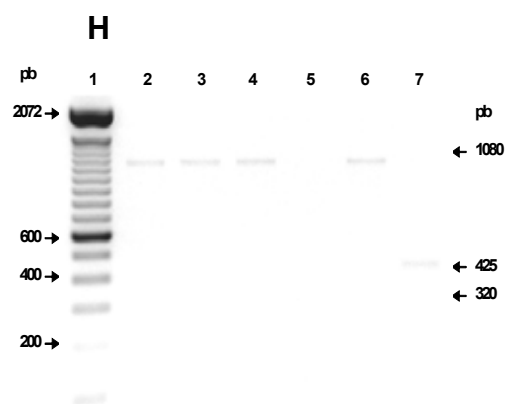
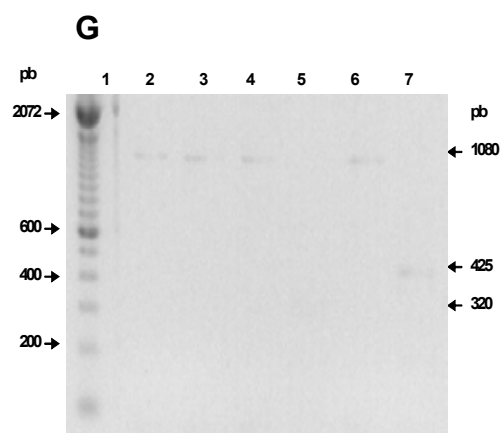
ENZIMAS					
CEPAS	<i>Eco RI</i>	<i>Bam HI</i>	<i>Mbo I</i>	<i>Xho I</i>	<i>Pvu II</i>
VR-299	710 pb	1180 pb	610 pb	1180 pb	630 pb
	470 pb				550 pb
Sp	1180 pb	1180 pb	320 pb	1180 pb	425 pb
			290 pb		
			190 pb		190 pb
Ab	1180 pb	1180 pb	480 pb	1180 pb	580 pb
			260 pb		440 pb
			250 pb		160 pb
			190 pb		

4.3. GENOTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

En base a la metodología descrita de RFLP (Lee et. al., 1996), se procedió a realizar el RT- PCR y RFLP de las 15 cepas aisladas de IPNV obtenidas a partir de casos clínicos de IPN en salmón del Atlántico, utilizando las 5 enzimas de restricción seleccionadas (*Eco* RI, *Bam* HI, *Mbo* I, *Xho* I y *Pvu* II).

La figura 7 muestra los perfiles de cada una de las muestras seleccionadas para realizar este estudio, todas las figuras se presentan en negativa para resaltar mas las bandas de cada una de ellas. En cada una de las figuras observamos los fragmentos RFLP obtenido por cada una de las endonucleasas de restricción utilizadas en este estudio. Cada uno de los perfiles obtenidos fue contrastado con los perfiles obtenidos por cada una de las cepas de referencia. En todas las figuras se observa claramente que el perfil obtenido coincide con el perfil obtenido para la cepa de referencia Sp.





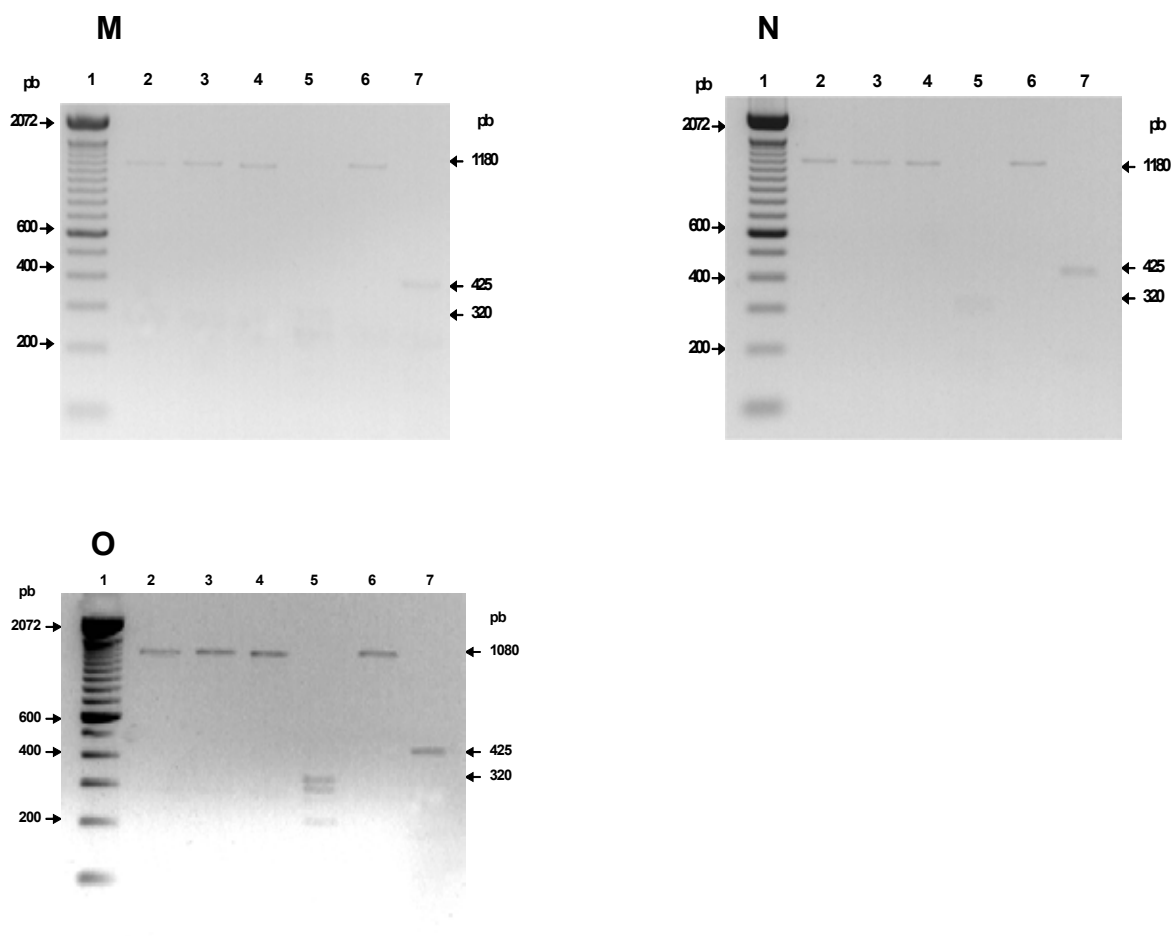


Figura 7: Perfiles de RFLP de la digestión de un fragmento de 1180 pb de las cepas en estudio . A: Cepa N° 1; B: Cepa N° 2; C: Cepa N° 3; D: Cepa N° 4; E: Cepa N° 5; F: Cepa N° 6; G: Cepa N° 7; H: Cepa N° 8; I: Cepa N° 9; J: Cepa N° 10; K: Cepa N° 11; L: Cepa N° 12; M: Cepa N° 13; N: Cepa N° 14; O: Cepa N° 15. Los carriles en todas las figuras siguen el mismo orden, **Carril 1: Estándar de Tamaño Molecular 100 bp; **Carril 2:** Fragmento de 1180 bp sin digerir; **Carril 3:** Digestión con *Eco* RI; **Carril 4:** Digestión con *Bam* HI; **Carril 5:** Digestión con *Mbo* I; **Carril 6:** Digestión con *Xho* I; **Carril 7:** Digestión con *Pvu* II.**

5. Discusión

La industria salmonera chilena ha logrado un enorme crecimiento en apenas una década. De registrar exportaciones mínimas en 1980, Chile ha llegado a ser el segundo país productor del mundo, después de Noruega (Aquanoticias, 2004). El desarrollo de los cultivos en condiciones intensivas ha traído consigo la aparición de enfermedades, las cuales constituyen una de las causas importantes de pérdidas económicas por rendimientos no alcanzados, mortalidades, costos de los tratamientos y pérdida de la calidad del producto. Esto es más relevante cuando se trata de enfermedades infecciosas en las cuales gran parte de los animales que sobreviven a la enfermedad pueden resultar portadores del patógeno durante largos períodos de tiempo.

Entre las enfermedades virales de importancia económica que afectan a los cultivos de salmónidos en Chile se encuentra la Necrosis Pancreática Infecciosa, enfermedad causada por el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), un patógeno capaz de ser transmitido en forma horizontal y vertical, que se ha diseminado por todo Chile causando cuantiosas pérdidas económicas tanto en la fase de cultivo de agua dulce como de mar (Schlotfeldt and Alderman, 1991)

Con el fin de implementar técnicas de prevención y control, y evitar la diseminación del virus, es necesario contar con métodos de diagnóstico rápidos y sensibles. Los métodos rápidos son deseables en la fase aguda de la enfermedad, mientras que métodos altamente sensibles son necesarios para la detección de los virus durante la fase de portadores. Los métodos para el diagnóstico de enfermedades virales pueden ser separados en dos grupos, aquellos que miden la presencia del virus y aquellos que detectan respuestas específicas en el hospedero.

A pesar de la explosión de nuevas técnicas de diagnóstico de las enfermedades virales mediante la demostración del agente o su material genético, actualmente es necesario contar con técnicas que permitan la genotipificación de los patógenos. Un elemento relevante a considerar en los programas de prevención y control de IPNV, así como en el desarrollo de vacunas y estudios epidemiológicos, es el conocimiento de la dinámica que presentan los diferentes serotipos en las poblaciones de salmónidos. Lo anterior es más importante si se considera la amplia variación genética de IPNV que se evidencia en la cantidad de serotipos descritos, los cuales presentan diferencias de patogenicidad, especie a la cual afecta, entre otros (Reno, 1999).

En Chile el primer registro de IPN se realizó en el año 1984 en trucha arcoiris (*O. mykiss*) cultivadas en el Lago Llanquihue, X Región. Posteriormente se registraron numerosos diagnósticos llevados a cabo por diferentes laboratorios y que comprometían a diferentes empresas, sin embargo fue sólo hasta noviembre de 1998 en que se publica y “oficializa” que la situación había dejado de ser aislada.

Estudios realizados en la Universidad Católica de Valparaíso, revelaron que el virus aislado en 1984, al ser comparado con el Serotipo de referencia (VR-299, Americano) mediante anticuerpos monoclonales, eran idénticos. En febrero de 1999 el Servicio de Ictiopatología de Fundación Chile confirma la presencia del serotipo Sp (Europeo) mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, trabajo realizado por la University of Prince Edward Island, Canadá, a partir de muestras obtenidas de casos clínicos recepcionados en el laboratorio.

Actualmente no existe información respecto de la situación epidemiológica de los serotipos de IPNV que están afectando los centros de cultivo de especies salmonídeas en nuestro país, debido a que las empresas están interesadas en la producción y no el control de los patógenos que pudieran estar afectando sus cultivos

Entre las técnicas utilizadas para la serotipificación del virus IPN se encuentran la aplicación de test de neutralización, test Inmunodot utilizando anticuerpos policlonales, Inmunodot utilizando anticuerpos monoclonales, mientras que para la genotipificación, se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Novoa et al., 1995) y polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción de DNA (RFLP) (Heppel et al., 1992; Lee et al., 1996 and Cutrín et al., 2004).

Los modelos de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) ha sido usada para comparar cepas de referencia tipo con aislados locales de diferentes áreas (Heppel et al., 1992; Lee et al., 1996; Biering et al., 1997; y Cutrín et al., 2004). En estos estudios, los fragmentos amplificados no todos tienen el mismo tamaño. (Heppel et al., 1993) amplificaron un fragmento de 359 pb correspondiente a la región variable NS, mientras Lee et al. (1996) y Biering et al. (1997) utilizaron análisis de RFLP a una región mas larga de la proteína VP2. Sobre esta base Heppel et al. (1993) amplifico cepas de los serotipos del serogrupo A y no encontraron una completa correlación con los resultados de genotipificación por RFLP. Usando la región completa de la proteína VP2 los resultados muestran una correlación entre serotipificación y genotipificación aunque en los estudios de Biering et al. (1997) y Lee et al (1996) ellos no emplean cepas de referencia para todos los serotipos existentes.

En este estudio se utilizó como blanco genético una región genómica de 1180 bp, ubicada en una porción hipervariable de la región codificante para la proteína VP2. Esta región genómica fue escogida por varias razones. Primero investigar una región genómica grande permite el uso de un gran número de sitios de restricción, lo cual provee con más información acerca de la variación genómica. Segundo, la región genómica utilizada en estudios previos codifica para las proteínas NS y VP2. Según análisis comparativos de secuencias publicadas de birnavirus acuáticos indican que esta región es altamente conservada. En contraste, la proteína VP2 entera codificada por la región genómica estudiada en este trabajo es la mayor proteína de la cápside y el sitio de unión de todos los epítopes de neutralización y presumiblemente todas las células unen sitios dependiendo la clase de hospedero. Por lo tanto, inmunológicamente pueden haber variaciones genómicas en cada parte de la región codificante VP2 dependiendo del hospedero (Lee et al., 1996).

Los productos PCR de las tres cepas de referencia y cada uno de los aislados utilizados en este estudio, fueron digeridos con 5 enzimas de restricción, cada uno de los perfiles obtenidos fue visualizado mediante un gel de agarosa. De acuerdo a la bibliografía publicada se seleccionaron las enzimas *Eco* RI, *Bam* HI, *Pvu* II, *Mbo* I y *Xho* I debido a que estas presentaban mayor variabilidad en los perfiles de cada una de las cepas de referencia utilizadas en este estudio. Estudios futuros se debieran realizar con un mayor número de enzimas de restricción, para obtener un perfil mucho mayor de cada una de las cepas de referencia.

En la tabla N° 6 se especifican los fragmentos obtenidos por cada una de las enzimas en cada una de las cepas de referencia utilizadas en este estudio (Sp, Ab y VR-299). Para la cepa de referencia Sp y Ab, las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI no produce ningún corte, mientras que para la cepa de referencia VR-299 la enzima *Eco* RI nos genera dos fragmentos de aproximadamente 710 y 470 pb respectivamente, por tanto, esta enzima nos está diferenciando entre la cepa VR-299 y las cepas Sp y Ab. Por otro lado la enzima *Bam* HI no produce ningún corte en ninguna de las tres cepas de referencia, la enzima *Mbo* I produce distintos fragmentos en cada una de las cepas de referencia, para la cepa VR-299 en el perfil se observa claramente una banda a los 610 bp aproximadamente, las bandas que faltan son de pequeño tamaño molecular no pudiendo ser observadas en el gel de agarosa, para la cepa Sp los fragmentos producidos por esta enzima son de 320 , 290 y 190 pb respectivamente, los fragmentos que faltan son de pequeño tamaño molecular y no pueden ser visualizados por el gel de agarosa, para la cepa Ab los fragmentos obtenidos son de 480, 260, 250 y 190, para esta cepa se puede observar el perfil completo obtenido por la enzima *Mbo* I, la enzima *Xho* I no genera ningún corte en ninguna de las tres cepas utilizadas como control, mientras que la enzima *Pvu* II nos genera un perfil en las tres cepas de referencia, para la cepa VR-299 el perfil obtenido es de 630 y 550 pb, para la cepa Sp el perfil obtenido es de 425 y 190 pb respectivamente, siendo el o los fragmentos faltantes de pequeño tamaño molecular los que no se visualizan en nuestro gel, para la cepa Ab el perfil obtenido es de 580, 440 y 160 pb respectivamente.

De acuerdo a la literatura publicada todas las enzimas utilizadas en este estudio debieran haber producido cortes sin embargo esto se puede explicar debido a la poca variabilidad genética que pudieran presentar las cepas de referencia.

La aplicación de la técnica RFLP a las cepas de referencia Aqua-1, Aqua-2 y Aqua-3, correspondientes a serotipos Sp, Ab y VR-299 evidencia un panel de perfiles genéticos correspondiente a lo descrito en la literatura para las cepas respectivas (Heppel et al., 1992 and Lee et al., 1996). Debido a que los tres serotipos utilizados como referencia en nuestro estudio corresponden a aislados nacionales proporcionados por diferentes investigadores nacionales. Estas cepas fueron proporcionadas solo con la información del serotipo al que correspondían desconociéndose la fecha de aislamiento y la especie de la cual fue aislada. Lo anterior confirma la presencia, en Chile, de tres serotipos de virus IPN que se encuentran afectando a los cultivos de salmónidos, pero se desconoce cual de ellos es que causó las pérdidas económicas por concepto de mortalidad de peces a causa de infecciones atribuidas al virus IPN .

Los paneles de la figura 7 muestran los perfiles de las 15 cepas aisladas utilizadas en este estudio, estos perfiles fueron comparados con los obtenidos por las cepas de referencia Sp, Ab y VR-299.

Como podemos ver en los resultados de la figura 7 panel A al O todos los aislados de IPNV que fueron sometidos a análisis de RFLP, muestran el mismo perfil, el que presenta un 100 % de similitud con el perfil obtenido para cepa de referencia Sp. A partir de estos resultados es posible concluir que en base a las muestras analizadas existe una alta prevalencia de la cepa Sp en salmón del Atlántico, durante el año 2004. De esta forma podemos concluimos que todos los aislados de IPNV sometidos a estudio pertenecen a la cepa Sp el cual pertenece al serogrupo A, para poder afirmar esto en falta realizar en un estudio posterior una relación filogenetica de las cepas en estudio (Blake et al., 2001).

De acuerdo a la gran extensión de territorio terrestre para el caso de las pisciculturas y marítimo para los centros de engorda, ocupados para el cultivo de salmonidos, los que están comprendidos entre la región Metropolitana y la duodécima región, se puede concluir que con herramientas de genotipificación no existe variabilidad genómica atribuida a la geografía. Las muestras utilizadas en este estudio provienen de la decima y undecima región tanto de piscicultura como centros de engorda.

Si se considera que las cepas fueron obtenidas de casos clínicos presentes en piscicultura, lago y mar, los cuales presentaban mortalidades acumuladas que fluctúan 10 % y 60%, es posible afirmar que la cepa Sp es una de las más patógenas tanto en hembras como en machos, que actualmente se encuentra afectando a los cultivos de salmón del Atlántico, independiente de la talla, ambiente de cultivo y

región considerada. Similar situación epidemiológica se ha descrito para las infecciones de IPN en salmón del Atlántico en Noruega (Reno, 1999).

En base a los resultados de este estudio se concluye que las infecciones de IPN en salmón del Atlántico, aislados de ambientes de agua dulce, estuarios y mar, de la décima y undécima región, en el año 2004 corresponden a la cepa descrita como Sp, debido a que la genotipificación mediante RFLP de todas las cepas estudiadas coincide con el perfil obtenido mediante RFLP para la cepa de referencia Sp..

Dado que el salmón del Atlántico, es la especie más cultivada en Chile, y que durante muchos años se importaron cantidades significativas de ovas, es posible afirmar que la introducción de la cepa Sp provino de Europa, principalmente, Noruega, Escocia, Irlanda, lo cual explica la alta similitud en la situación epidemiológica y patogénica observada por las infecciones de IPNV entre Noruega y Chile.

Es importante para estudios futuros, complementar estos resultados con el análisis de los serotipos en las otras especies de salmónidos cultivados actualmente en Chile, así como también estudiar la posible variación temporal que ha sufrido la presencia de los diferentes serotipos en Chile, en las diferentes especies.

6. Bibliografía

Ahne, W. (1979). Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from pike (*Esox lucius*). *Archival für Virologie*. 58, 65-69.

Ahne, W. (1981). Serological techniques currently used in fish virology. (International symposium on fish biologics serodiagnostics and vaccines. Developments in biological standardization. Leetown, W. Va, USA 1981. S. Karger. Basel. 49. 3-28).

Ahne, W. and Negele, R. D. (1985). Studies on the transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish. In: Ellis, A (ed.) *Fish and Shellfish Pathology*. Academic Press, London, pp. 262-270.

Ahne, W. and Thomsen, I. (1986). Infectious pancreatic necrosis: detection of virus and antibodies in Rainbow trout IPNV carrier (*Salmo gairdneri*). *Journal Veterinarian Medicine Bulletin*. 33: 552-554.

Alvarado, V. (1990). Producción y patología de los peces, enfermedades bacterianas, virales y parasitarias (PANI 291). *Universidad Austral de Chile, Facultad Ciencias Veterinarias*.

Aquanoticias Internacional. (2004). Estadísticas. 95: 84-87

Babin, M., Hernández, M., Sanchez, C. and Dominguez, J. (1991). Inmunodot assay for detection de IPNV virus in organ homogenates. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 11(2): 65.

Biering, E., Melby, H. P. and Mortensen, S. H. (1997). Sero and genotyping of some marine aquatic birnavirus isolates from Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*. 28: 169-174.

Blake, S. L., Ma, J. Y., Caporale, D. A., Jairath, S. and Nicholson, B. L. (2001). Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Diseases of Aquatic Organisms*. 45: 89-102.

Bragg, R. R. and Combrink, M. E. (1987b). Isolation and identification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 7, 118-120.

Bustos, P., Midtlyng, P. and Maira, C. 1999. IPN: Un enorme desafío para la industria salmonera. *Aquanoticias Internacional*. 48: 48-51.

Calderon, Y. 1998. Determinación de la virulencia de dos cepas del virus IPN en *Salmo salar* y *Oncorhynchus kisutch*. Tesis de Licenciatura. *Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile*.

Caswell-Reno, P., Reno, P. and Nicholson, B. (1986). Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus. Analysis of viral epitopes and comparison of different isolates. *Journal of General Virology*. 67: 2193-2205.

Caswell-Reno, P., Lipipun, V., Reno, P. W. and Nicholson, B. L. (1989). Utilization of a group-reactive and other monoclonal antibodies in an enzyme immunodot assay for identification and presumptive serotyping of aquatic birnaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 27: 1924-1929.

Christie, K., Havarstein, L., Djupvik, H., Ness, S. and Endressen, C. (1988). Characterization of a new serotype of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Atlantic salmon. *Archival Virology*. 103: 167-177.

Christie, K. E., Ness, S. and Djupvick, H. O. (1990). Infectious pancreatic necrosis virus in Norway: Partial serotyping by monoclonal antibodies. *Journal of Fish Diseases*. 13. 323-327.

Cunningham, C. (1971). Virología Práctica. Propagación de virus en cultivos celulares. p: 93-111.

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*. 70: 1059-1067.

Davis, V. S. and Boyle, J. A. (1990). Adapting the Polymerase Chain reaction to a double-stranded RNA genome. *Analytical Biochemistry*. 189: 30-34

De Kinkelin, P., Michel, Ch. and Ghittino, P. (1991). Tratado de las enfermedades de los peces. *Ed. Acribia S.A.*, Zaragoza, España.

Dixon, P. and Hill, B. (1983b). Rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Journal of General Virology*. 64: 321-330.

Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. (O.I.E. 2003). *Office International des Epizooties*. Cap. 2.2.3. pag. 74-81.

Dobos, P. (1976). Size and structure of the genome of infectious pancreatic necrosis virus. *Nucleic Acids Research*. 3, 1903-1924.

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

Dopazo, C., Hetrick, F. and Samal, S. (1994). Use of cloned cDNA probes for diagnosis of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases*. 17: 1-16.

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

Duncan, P. and Dobos, P. (1986). The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA A segment reveals one large ORF encoding a precursor protein. *Nucleic Acids Research*. 14: 5934-5940.

Duncan, P., Mason, C., Nagy, E., Leong, J. and Dobos, P. (1991). Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA dependent RNA Polymerase lacking the gly-asp-asp motif. *Virology*. 181:541-552.

Espinoza, E., Farias, G., Soler, M. and Kuznar, J. (1985). Identity between infectious pancreatic necrosis virus VR-299 and a Chilean isolate. *Intervirology*. 24: 58-60.

Fenner, F., Gibbs, E. P., Murphy, F., Rott, R., Studdert, M. and White, D. (1993). *Veterinary Virology*. Ed. Academic Press, INC. San Diego, California.

Finlay, J. and Hill, B. J. (1975). The use of the complement fixation test for rapid typing of infectious pancreatic necrosis virus. *Aquaculture*. 3: 305.

Fryer, J., Yusha, A. and Pilcher, K. (1965). The in vitro cultivation of tissue and cells of pacific salmon and steelhead trout. *Annual N.Y. Academic Science*. 126: 566-586.

Ganga, M., Gonzalez, M., Lopez-Lastra, M. and Sandino, A. (1994). Polyacrilamide gel electrophoresis of viral genomic RNA as a diagnostic method for infectious pancreatic necrosis virus detection. *Journal of Virological methods*. 50: 227-236.

Godoy, M. (2004). Comunicación personal

Hattori, M., Kokama, H., Ishiguro, S., Honda, A., Mikami, T. and Izawa, H. (1984). *In vitro* and *in vivo* detection of infectious pancreatic necrosis virus in fish by enzyme-linked immunosorbant assay. *American Journal of Veterinary Research*. 45: 1876-1879.

Havarstein L. S., Kalland K. H., Christie K. E. and Endresen, C. (1990). Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strains of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other Birnaviridae. *Journal of General Virology*. 71: 299-308.

Havarstein, L. Endresen, C., Hjeltne, B., Christie, K. and Glette, J. (1990). Specific immunoglobulins in serum from Atlantic salmon (*salmo salar*), immunized with *Vibrio salmonicida* and infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases*. 13(2): 101-111.

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

Heppel, J., Berthiaume, L., Tarrab, E., Lecomte, J. and Arella, M. (1992). Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles. *Journal of General Virology*. 73: 2863-2870.

Hill, B. J. (1976). Procedures for the Isolation and Identification of IPN, VHS, IHN and SVC Viruses from Diseased Fish. *Fisheries Research Technical Report, N° 27*, Ministry de agriculture, Food and Fisheries, loweatoff, UK, 14 pp.

Hill, B. J. and Way, K. (1983). Serological classification of fish and shellfish birnaviruses. In: *Proceedings of the First Annual Meeting of the European Association of Fish Pathologists*, Plymouth, UK. P. 10.

Hill, B. J. and Way, K. (1995). Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus: a comparison with other birnaviruses. *Annual Review of Fish Diseases*. 5: 55-77.

Hill, B. J. (1992). Impact of viral disease of salmonid in fish in European Community. *Proceedings international Symposium Salmonid Diseases*. 48-59.

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

Isshiki, T., Nagano, T. and Susuki, S. (2001). Infectivity of aquabirnavirus strains to various marine fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*. 46: 109-114.

Jorgensen, P. E. V. and Bregnballe, F. (1969). Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Denmark. *Nordic Veterinarian Medicine*. 21: 142-148.

Jorgensen, P. E. V. and Kehlet, N. P. (1971). Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout: Their serological and pathogenic properties. *Nordic Veterinarian Medicine*. 23: 568-575.

Kimura, T., Yoshimizu, M. and Yasuda, H. (1984). Rapid, simple serological diagnosis of infectious pancreatic necrosis by coagglutination test using antibody-sensitized staphylococci. *Fish Pathology*. 19: 25-33.

Kuznar, J., Kirsinger, M. I., Cifuentes, F. and Everitt, E. (1999). Detection Infectious Pancreatic Necrosis Virus in infected trout by an immunodot assay. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 19: (1), 31.

Leong, J. C., Brown, D., Dobos, P., Kibenge, F. S. B., Ludert, J. E., Muller, H., Mundt, E. and Nicholson, B. (2000). Family *Birnaviridae* *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the international Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 481-490. Edited by M. H. V. van Regenmortel, C. M.

Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, D. J. McGeoch, J. Maniloff, M. A. Mayo, C. R. Pringle & R. B. Wickner. San Diego: Academic Press.

Lee, M. K., Blake, S. L., Singer, J. T. and Nicholson, B. L. (1996). Genomic variation of aquatic birnaviruses analyzed with restriction fragment length polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2513-2520.

Lipipun, V., Caswell-Reno, P., Reno, P. W. and Nicholson, B. L. (1988). Enzyme immunoassay utilizing monoclonal antibodies for identification of European Eel Virus (EEV), an aquatic birnavirus. *Coastal and Estuarine Studies* 25.

Lipipun, V., Caswell-Reno, P., Reno, P. W. and Nicholson, B. L. (1991). Neutralization epitopes are located on VP2 protein of aquatic birnaviruses, p. 269-277. In J. L. Fryer (ed.), *Proceedings of the Second International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates*. Oregon State University, Corvallis, Oreg.

MacDonald, R. and Dobos, P. (1981). Identification of the proteins encoded by each segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*. 114: 414-422.

McAllister, P. and Owens W. (1986). Infectious pancreatic necrosis virus: Protocol for a standard challenge to Brook Trout. *American Fisheries Society*. 115: 466-470.

MacDonald, R. D., Moore, A. R. and Souter, B. W. (1983). Three new strains of infectious pancreatic necrosis virus isolated in Canada. *Canadian Journal Microbiology*. 39. 137-141.

Magyar G. and Dobos P. (1994). Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17 kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus. *Virology*. 204: 580-589.

McKnigh, I. J. and Roberts, R. J. (1976). The pathology of infectious pancreatic necrosis. 1. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *British Veterinarian Journal*. 132: 76-86.

Manning D. S. and Leong J. C. (1990). Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*. 179: 16-25.

Manning D. S., Mason C. L. and Leong J. C. (1990). Cell-free translational analysis of the processing of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein. *Virology*. 179: 9-15.

Mendez, R. (1988). Desarrollo y situación actual de los cultivos de salmónidos. *Chile Pesquero*. 39: 21-24.

Mims, C. A. and White. (1984). Viral Pathogenesis and Immunology. *Brackwell Scientific Publication*. Oxford.

Mortensen, S., Hjeltne, B., Rodseth, O., Krogsrud, J. and Christie, K. (1990). Infectious pancreatic necrosis virus, serotype N1, isolated from Norwegian Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, Turbot (*Scophthalmus maximus*) and Scallops (*Pecten maximus*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 10: 42-43.

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

Nicholson, B. L. and Dunn, J. (1974) Homologous viral interference in trout and Atlantic salmon cell cultures infected with infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Virology*. 14: 180-182.

Nicholson, B. L. and Caswell, P. (1982). Enzyme-Linked Immunosorbent assay for identification of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 16: 469-472.

Nicholson, B. L. and Henchal, E. A. (1978). Rapid identification of infectious pancreatic necrosis virus in infected cell cultures by immunoperoxidase techniques. *Journal of Wildlife Diseases*. 14: 465-469.

Nicholson, B. L. and Pochbit, S. (1981). Antigenic analysis of infectious pancreatic necrosis viruses (IPNV) by neutralization kinetics. In: S. Karger, Basel, *International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines*. pp. 35-41.

Novoa, B., Blake, S., Nicholson, B. L. and Figueras, A. (1995). Comparison of different procedures for serotyping aquatic birnavirus. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 2925-2929.

Okamoto, N., Tayama, T., Kawanobe, M., Fujiki, N., Yasuda, Y. and Sano, T. (1993). Resistance of a Rainbow Trout strain to infectious pancreatic necrosis. *Aquaculture*. 117: 71-76.

Post, G. (1983). Textbook of fish health. Ed. TFH Publications. Cap. VI, pgna. 94-100.

Quaglio, F. (1989). Infectious disease from birnavirus with particular reference to infectious pancreatic necrosis of salmonids. *Rivesti, Italian. Acquacolturi*. 24: 167-179.

Ramsey, D. W., Bright, S. W., Ludlow, J. W. and Winston, V. (1986). Detection of infectious pancreatic necrosis virus using an inhibition enzyme-linked Immunosorbent assay. *Journal of Immunoassay*. 7: 229-239.

Reno, P. W. (1976). Quantitative and qualitative aspects of the infectious pancreatic necrosis (IPN) carrier state. PhD dissertation, University of Guelph, Guelph, Ontario.

Reno, P. W. (1988). Immunochemical evaluation of the infectious pancreatic necrosis (IPN) carrier state in salmonids and other species. *Coastal and Estuarine Studies*. 25: 331-343.

Roberts, R. (1989). *Fish Pathology*. Ed. Baillière Tindall, London, Inghilterra. Cap. 6, pgna. 114 -143.

Rodger, H. D. and Frerichs, G. N. (1997). Clinical infectious pancreatic necrosis virus infection in farmed halibut in the United Kingdom. *Veterinary Record*. 140: 401-402.

Rosenlund, B. (1977). Infectious pancreatic necrosis virus at the Willow Beach NFH, Nevada, and in Rainbow trout stocked into adjacent lake mohove. *Fish Health News*. 6: 10-13.

Ross, K., Thomson, A., Melvin, W, and Munro, A. (1991). Sensitive confirmation of Infectious pancreatic necrosis virus by dot-blot using monoclonal antibodies. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 11(4): 137.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning

Sano, T. (1995). Viruses and viral diseases of salmonids. *Aquaculture*. 132: 43-52.

Sanz, F. and Coll, J. (1992). Techniques for diagnosing viral diseases of Salmonid fish. *Diseases of Aquatic Organisms*. (13): 211-223.

Schlottfeldt, J. and Alderman, D. (1991). A practical guide for the fresh water fish farmer. *Section 10 Fish viruses. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. p. 11-12.

Stoskopf, M. (1992). *Fish Medicine*. Ed. W. B. Saunders. Philadelphia.

Swanson, R. (1981). Use of the indirect fluorescent antibody test to study the pathogenesis of infectious pancreatic necrosis virus infection in trout. *Serdiagnostics and Vaccines. Development. Biological Standardarization*. 49: 71-77.

Tu, K. C., Spendlove, S. and Goede, R. W. (1974). Immunoluorescent cell assay to infectious pancreatic necrosis virus. *Applied Microbiology*. 27: 593-599.

Underwood, B. O., Smale, C. J., Brown, F. and Hill, B. J. (1977). Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of General Virology*. 36: 93-109.

Vestergard-Jorgensen, P. E. (1974). Indirect immunofluorescent antibody techniques for determination of trout viruses and corresponding antibody. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 15: 198-205.

Wolf, K. (1988). Fish viruses and fish viral diseases. *Cornell University Press*. U.S.A. pp: 115-157.

Woo, P. T. K. and Bruno, D. W. (1999). *Fis Diseases and Disorders*. CABI Publishing, CAB International. Cap 1, pgna. 1-55.

Yao, K. and Vakharia, V. N. (1998). Generation of infectious pancreatic necrosis virus from cloned cDNA. *Journal of Virology*. 72: 8913-8920.

Yamamoto, T. (1974). Infectious pancreatic necrosis virus occurrence at a hatchery in Alberta. *Journal of the Fisheries Research of Canada*. 31: 397-402.