



Carmen López Vázquez

Tesis Doctoral

**OPTIMIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO, CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR Y ANÁLISIS DE VIRULENCIA DEL VIRUS DE
LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA VIRAL (VHSV)**

Departamento de Microbiología y Parasitología
Instituto de Acuicultura



Carmen López Vázquez

Tesis Doctoral

**OPTIMIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO, CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR Y ANÁLISIS DE VIRULENCIA DEL VIRUS DE
LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA VIRAL (VHSV)**

Departamento de Microbiología y Parasitología
Instituto de Acuicultura

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

INFORMAN

Que la presente Tesis Doctoral titulada "**Optimización del diagnóstico, caracterización molecular y análisis de virulencia del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV)**", que presenta **Dña. Carmen López Vázquez** para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, bajo nuestra dirección y, considerando que se haya concluida, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en
Santiago de Compostela a 28 de Marzo de 2007

Fdo: C. López Vázquez
Doctoranda

Fdo: Dr Carlos P. Dopazo
Dir. Tesis

Fdo: Dra Isabel Bandín
Dir. Tesis

Foron moitos os que me axudaron para levar a cabo este traballo e, sen dúbida algunha, alguén quedará sen nomear neste apartado que foi elaborado de xeito rápido e moi a última hora, as miñas desculpas por adiantado se me esquezo de alguén.

En primeiro lugar, quero amosar o mais sincero agradecemento ós directores desta tese Carlos P. Dopazo e Isabel Bandín pola inestimable labor levada a cabo, e sobretodo polas contínuas mostras de apoio e confianza que tan ben sentan en certos momentos, en fin grazas por todo. A Alicia E. Toranzo e Juan L. Barja polo apoio e interés así como a todos os compañeiros do departamento que sempre votan un cable, a Sol, Carlos Osorio, Ysa, Bea e a todos os que se foron e por suposto a todos os novos.

Quero tamén agradecer especialmente a R. Raynard e M. Snow polas atencións recibidas na miña corta estancia nas terras escocesas, así como N. Bain e J. Bruce polo seu apoio constante.

A Alicia, Javi, Johnny, Juanma e Susana que supuxeron una inestimable axuda tanto no ámbito laboral como en moitos outros.

Como é lóxico quero facer un agradecemento moi especial os meus pais polo apoio incondicional en todo o que fun decidindo nestes anos.

Tamén graciñas as miñas amigas por estar ahí, e a Xan por acompañarme todos estes anos e por facer que todo sexa mais doado.

Grazas a todos

A Inés

INTRODUCCIÓN	1
<i>G. Novirhabdovirus</i>	5
<i>Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral</i>	8
Estructura y expresión génica	9
Tipado de VHSV	10
Transmisión y patología	11
Diagnóstico e identificación de VHSV	13
Control y prevención	16
CAPÍTULO 1: OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE VHSV IN VITRO	19
RESUMEN	21
INTRODUCCIÓN	23
OBJETIVO	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO	27
VIRUS	28
PURIFICACIÓN PARCIAL DE RHABDOVIRUS	30
EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL	30
<i>Proteinasa K / Fenol-Cloroformo (PK/FC)</i>	30
<i>Trizol LS-Reagent (Invitrogen)</i>	31

Extracción con métodos de captación de resinas:	32
<i>Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel)</i>	32
<i>SV-Total RNA Isolation (Promega)</i>	32
<i>RNeasy® Mini Kit (Qiagen)</i>	33
CUANTIFICACIÓN DEL RNA EXTRAIDO	34
SELECCIÓN DE CEBADORES	34
AMPLIFICACIÓN MEDIANTE RT-PCR	36
ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	37
EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	37
EVALUACIÓN DE LAS PAREJAS DE CEBADORES	38
<i>Evaluación de la eficacia y especificidad</i>	38
<i>Evaluación de la sensibilidad</i>	38
<i>Límite de detección</i>	39
EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LA RT-PCR	39
<i>SOUTHERN BLOT / HAN</i>	39
<i>Preparación y marcaje de las sondas de ADNc</i>	39
<i>Southern Blot (SB)</i>	40
<i>Hibridación de ácidos nucleicos (HAN)</i>	40
<i>NESTED-PCR</i>	42
CINÉTICA DE DETECCIÓN EN CULTIVO CELULAR	43
RESULTADOS	44
SELECCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL	44
EVALUACIÓN DE LAS PAREJAS DE CEBADORES	47

<i>Evaluación de la eficacia</i>	47
<i>Evaluación de la especificidad</i>	48
<i>Evaluación de la sensibilidad</i>	48
<i>Límite de detección</i>	49
CINÉTICA DE DETECCIÓN	51
<i>DISCUSIÓN</i>	52
CAPÍTULO 2: VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE VHSV EN TEJIDOS DE PECES	
<i>IN VITRO E IN VIVO</i>	59
<i>RESUMEN</i>	61
<i>INTRODUCCIÓN</i>	63
<i>OBJETIVO</i>	65
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	65
CEPAS VIRALES Y PROPAGACIÓN EN CULTIVOS CELULARES	65
ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE LA RT-PCR <i>IN VITRO</i>	67
<i>Experimento 1</i>	67
<i>Experimento 2</i>	68
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DETECCIÓN <i>IN VIVO</i>	70
<i>Extracción de ARN viral a partir de muestras de sangre</i>	71
<i>Extracción de ARN viral a partir de muestras de tejido</i>	71
<i>RESULTADOS</i>	72
EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA DETECCIÓN POR	

RT-PCR <i>IN VITRO</i>	72
DETECCIÓN DE VHSV EN PECES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE	75
<i>DISCUSIÓN</i>	78
CAPÍTULO 3: ANALISIS FILOGENÉTICO DE CEPAS DE VHSV GALLEGAS Y DEL FLEMISH CAP	83
<i>RESUMEN</i>	85
<i>INTRODUCCIÓN</i>	87
<i>OBJETIVO</i>	90
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	91
AISLADOS VIRALES	91
EXTRACCIÓN DEL RNA VIRAL	91
ANALISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS GENÓMICAS	94
<i>Secuenciación de ácidos nucleicos</i>	94
<i>Análisis de secuencias</i>	96
ANALISIS DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP's)	97
<i>Selección de los enzimas de restricción</i>	97
<i>Predicción de la fiabilidad del sistema de tipado</i>	98
<i>Obtención de los RFLP's</i>	98
<i>RT-PCR</i>	98
<i>Tratamiento con endonucleasas de restricción</i>	99
<i>RESULTADOS</i>	100
ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	100

ANÁLISIS FILOGENÉTICO	103
RFLP's	105
<i>Evaluación de enzimas de restricción</i>	105
<i>Desarrollo de un sistema de genotipado rápido y simple para VHSV</i>	114
<i>Aplicación del método de 2-SRA para aislados de VHSV</i>	115
DISCUSIÓN	119
CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE RODABALLO <i>Scophthalmus maximus</i> Y TRUCHA COMÚN <i>Salmo trutta fario</i> A DETERMINADOS AISLADOS DE VHSV	125
RESUMEN	127
INTRODUCCIÓN	129
OBJETIVO	134
MATERIAL Y MÉTODOS	134
LÍNEAS CELULARES Y AISLADOS VIRALES	134
INFECCIONES EXPERIMENTALES EN RODABALLO	
(<i>Scophthalmus maximus</i>)	136
<i>Infeción experimental 1</i>	136
<i>Infeción experimental 2</i>	137
<i>Inoculación intraperitoneal e infección por cohabitación</i>	137
<i>Infeción por inmersión</i>	137
INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN TRUCHA COMÚN	
(<i>Salmo trutta fario</i>)	138

<i>Infección experimental 3</i>	138
<i>Inoculación intraperitoneal e infección por cohabitación</i>	138
<i>Infección por inmersión</i>	139
EXAMEN VIROLÓGICO	139
<i>Aislamiento viral</i>	140
<i>RT-PCR</i>	140
<i>Nested-PCR</i>	140
RESULTADOS	141
<i>Infección experimental 1</i>	141
<i>Infección experimental 2</i>	147
<i>Infección intraperitoneal y Cohabitación</i>	147
<i>Infección mediante inmersión</i>	151
<i>Infección experimental 3</i>	155
<i>Infección intraperitoneal y Cohabitación</i>	155
<i>Infección mediante inmersión</i>	158
DISCUSION	159
CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFÍA	171
PUBLICACIONES	199

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es el sector de producción de alimentos que está creciendo más aceleradamente en todo el mundo. Desde 1984, la producción ha aumentado a una tasa media del 10%, en comparación con el 3% correspondiente a la carne de bovino y el 1,6% de la pesca.

El incremento en el desarrollo de la acuicultura a escala comercial e industrial ha llevado a los principales países y regiones productoras y consumidoras a establecer normas y reglamentos para asegurar la calidad e inocuidad del producto acuícola y reducir los efectos sociales y ambientales de la producción. Asimismo, se ha incrementado el interés en las patologías propias de las especies de cultivo que, aunque no impliquen un riesgo para el consumo humano, tienen una gran importancia económica debido a las pérdidas en producción. Así, el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO 1999) ha establecido una serie de normas mínimas de calidad e inocuidad para los organismos acuáticos comercializados y establece, entre otros puntos, una lista de enfermedades infecciosas de notificación obligatoria. Dentro de las enfermedades infecciosas que afectan a los peces cultivados, los virus constituyen uno de los problemas más importantes, debido a las altas mortalidades que producen, así como al hecho de que no existen medidas de control eficaces.

Entre los virus de peces, los rhabdovirus son el grupo más numeroso, y en él se incluyen las dos patologías víricas con mayor impacto y repercusión en el cultivo mundial de peces.

La familia *Rhabdoviridae* está formada por 6 géneros (Tabla 1), dos de los cuales afectan a plantas e insectos (géneros *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus*) y cuatro a vertebrados (géneros *Lyssavirus*, *Ephemerovirus*, *Vesiculovirus* y *Novirhabdovirus*) (Fauquet y col., 2005), pero sólo los dos últimos corresponden a virus de peces (Walker y col.,

2000). El género *Vesiculovirus* incluye entre sus miembros, como único representante de peces, al virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV, *spring viremia of carp virus*), asignado todavía de forma provisional. Sin embargo, el género *Novirhabdovirus* destaca tanto por el nutrido número de miembros que lo integran, como por la incidencia en cuanto a patologías de peces se refiere. Entre ellos podemos citar el virus IHNV (virus de la necrosis hematopoyética infecciosa) que es la especie tipo de este género, el VHSV (virus de la septicemia hemorrágica viral) y otros virus de menor impacto económico, más restringidos en cuanto a localización y especies a las que afectan, como son el hirame rhabdovirus (HIRRV) o el snakehead rhabdovirus (SHRV). Además, asignados a este género aparecen de modo provisional los virus de anguila EEV-B12 y EEV-C26 (Tordo y col., 2005).

Tabla 1: Clasificación de rhabdovirus

Género	Hospedadores	Virus tipo
<i>Cytorhabdovirus</i>	Plantas e insectos	Virus de la necrosis amarilla de la lechuga (LNYV)
<i>Nucleorhabdovirus</i>	Plantas e insectos	Virus enano amarillo de la patata (PYDV)
<i>Lyssavirus</i>	Vertebrados	Virus de la rabia (RABV)
<i>Ephemerovirus</i>	Vertebrados	Virus de la fiebre efímera de los bóvidos (BEFV)
<i>Vesiculovirus</i>	Vertebrados	Virus de la estomatitis vesicular (VSV)
<i>Novirhabdovirus</i>	Vertebrados	Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV)

A continuación procederemos a una descripción detallada del g. *Novirhabdovirus*, por ser uno de sus miembros el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), el objeto de estudio de este trabajo.

G. Novirhabdovirus

Las características comunes que comparten los novirhabdovirus con el resto de miembros de la familia son su morfología en forma de bala y su estructura (Figura 1), con una longitud entre 100 y 430 nm (media de 110 nm) y entre 45 y 100 nm de diámetro (media de 70 nm). La superficie del virión está cubierta con proyecciones de 5 a 10 nm de longitud y alrededor de 3 nm de diámetro, constituidas por trímeros de glicoproteína vírica. Internamente, la nucleocápside, de 30-70 nm de diámetro, muestra simetría

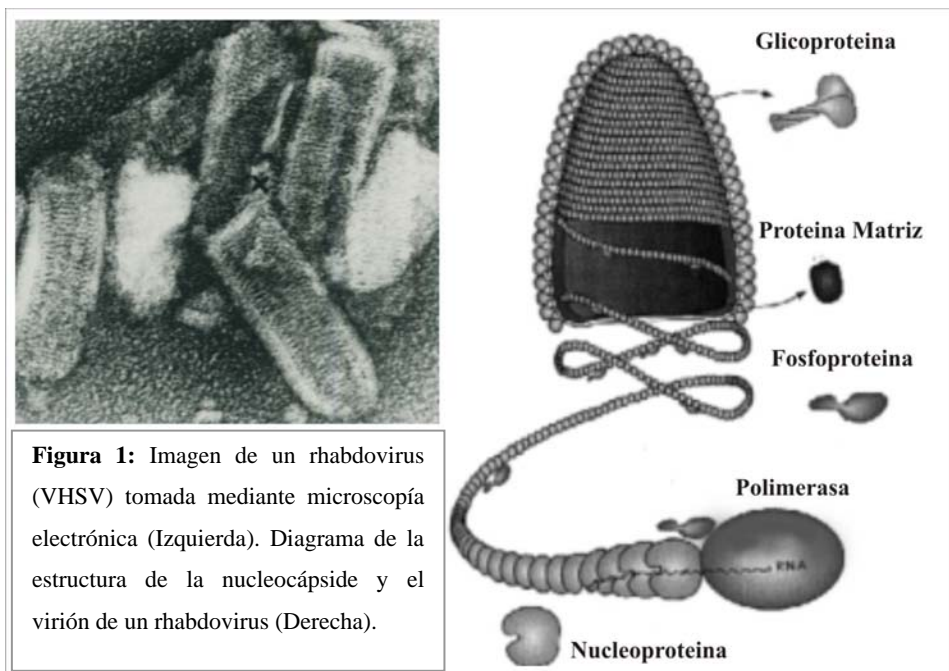


Figura 1: Imagen de un rhabdovirus (VHSV) tomada mediante microscopía electrónica (Izquierda). Diagrama de la estructura de la nucleocápside y el virión de un rhabdovirus (Derecha).

helicoidal. La nucleocápside está formada por la molécula genómica de ARN y la nucleoproteína (N). La ARN polimerasa-ARN dependiente (L) y la fosfoproteína (M1) están íntimamente unidas a la nucleocápside formando el complejo ribonucleoproteína (RNP). Externamente se observa una envuelta

lipídica rodeada de aproximadamente 400 espículas transmembrana constituidas por la glicoproteína viral (G); la envuelta está conectada a la nucleocápside a través de la proteína matriz (M2) (Murphy y col., 1995). Dentro del género *Novirhabdovirus* se ha detectado además la presencia de una proteína no estructural (NV), a la que debe su nombre el género y que permite diferenciarlo del otro género que afecta a peces (*g. Vesiculovirus*).

El ácido nucleico de los novirhabdovirus está constituido por una cadena sencilla de ARN no segmentado con polaridad negativa, de un tamaño aproximado de 12 Kb. Su secuencia presenta seis pautas de lectura abierta (ORF) que codifican 5 proteínas estructurales (la nucleoproteína, la fosfoproteína, la proteína de la matriz M2, la glicoproteína y la ARN polimerasa) y una proteína no estructural.

El proceso de replicación viral en los novirhabdovirus, al igual que en el resto de los rhabdovirus, se inicia con la adsorción viral mediada por la glicoproteína, que se une a receptores específicos de la superficie celular, lo que determina el rango de huéspedes y el tropismo viral. El virus atraviesa la membrana plasmática por endocitosis mediada por receptores, a continuación la envuelta viral se fusiona con la membrana del endosoma debido a un cambio conformacional en la glicoproteína, de naturaleza reversible e inducido por una disminución del pH en el interior del endosoma (Mas y col., 2004). Finalmente se produce la liberación de la nucleocápside viral en el citoplasma.

Los fosfolípidos de la membrana parecen desempeñar un importante papel en la unión de algunos rhabdovirus a la membrana celular. Así, se ha demostrado que el receptor celular para el virus de la estomatitis vesicular (VSV) es la fosfatidilserina (Schlegel y col., 1983; Mastromarino y col., 1987; Conti y col., 1988); sin embargo, en el caso de lisavirus la naturaleza de los receptores celulares no está clara. De hecho, si bien se ha demostrado la existencia de un receptor nicotínico de acetil-colina para el virus de la

rabia (Lentz y col, 1982; 1986; Bracci y col., 1988; Gatska y col., 1996), también se ha postulado que este papel puede ser desempeñado por fosfo o glicolípidos (Superti y col., 1984; Wunner y col., 1984), por un complejo proteico tipo fibronectina (Broughan y Wunner, 1995), o por un factor de crecimiento nervioso (P75NTR) (Tuffereau y col., 1988). En lo que respecta a los novirhabdovirus, se ha demostrado que el VHSV se une a los componentes fosfolipídicos de las membranas de las células de peces (Bernard y col., 1984), con una especial preferencia por la fosfatidilserina, unión que es más fuerte a pH bajo (5,6) debido a un cambio conformacional en la glicoproteína viral (Coll, 1995). Además, se ha identificado el lugar de unión en la glicoproteína, que se localiza entre los residuos 79 y 113 (Estepa y Coll, 1996). Sin embargo, estudios posteriores han sugerido que el principal componente del complejo celular receptor para VHSV y otros rhabdovirus de peces podría ser la fibronectina, una proteína muy abundante en el músculo de los peces (Bearzotti y col., 1999), lo que ha llevado a estos autores a postular la hipótesis de que los rhabdovirus infectan al pez mediante 2 pasos: una entrada pasiva a través del mucus de la piel y una segunda interacción directa con la fibronectina del músculo superficial que está en contacto directo con la piel.

La interacción entre la glicoproteína de VHSV y los fosfolípidos de la membrana del endosoma sí parece ser determinante en la fusión y posterior liberación de la nucleocápside viral (Estepa y Coll, 1996; Estepa y col., 2001). El proceso de fusión se produce, al igual que en el resto de los rhabdovirus, a pH bajo, aunque se ha demostrado que también se puede producir a pH fisiológico (Mas y col., 2002).

Una vez que la nucleocápside se encuentra en el citoplasma, la cadena de ARN se transcribe, lo que implica la síntesis secuencial de ARNs subgenómicos libres que incluyen un pequeño ARN *leader* y 6 ARNs mensajeros en el siguiente orden: 3' N-M1-M2-G-NV-L 5'. La replicación

requiere de la síntesis continua de la proteína N (Finke y col., 2003) lo que sugiere que se combine con la encapsidación del ARN recién generado. Una vez encapsidado el ARN, se incorpora la polimerasa formando una cola helicoidal ayudada por la acción de la proteína matriz. Este complejo, que recibe el nombre de ribonucleoproteína (RNP), migra a la membrana celular, donde se está concentrando la incipiente glicoproteína viral. Por último la proteína matriz interactúa con el dominio citoplasmático de la glicoproteína, promoviendo la extrusión de los viriones (Warrell, 2004).

Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral

El virus de la septicemia hemorrágica viral es especialmente conocido como patógeno de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en Europa donde es el causante de graves pérdidas económicas. En 1938, Schäperclaus describió por primera vez la enfermedad en trucha arcoiris y postuló su etiología viral. Sin embargo, la primera cepa europea del virus no se aisló hasta la década de los 60 (Jensen, 1965). Hasta 1989, el VHSV había sido aislado principalmente de salmónidos de agua dulce (Rasmussen, 1965; Ghittino, 1973; Wizigmann y col., 1980), pero desde entonces se ha aislado de una gran cantidad de especies marinas, tanto de vida libre (arenque, bacalao, lenguado, eglefino, sardina, caballa, fletán negro...) como cultivados (rodaballo, lenguado...), tanto de individuos aparentemente sanos como con signos de enfermedad (Skall y col., 2005). Asimismo, el rango geográfico se ha ampliado desde las aguas continentales europeas (Ahne y Tomsen, 1985) hasta las costas del Atlántico Norte y Mar del Norte (King y col., 2001a; Dixon y col., 2003), así como de las costas pacíficas de América del Norte (Meyers y Winton, 1995; Hedrick y col., 2003) y Japón (Takano y col., 2000; Watanabe y col., 2002).

Estructura y expresión génica

El virus de la septicemia hemorrágica viral se ajusta a las características descritas para la familia *Rhabdoviridae*. El genoma de la cepa tipo F1 comprende 11.158 nucleótidos (código de acceso de GenBank Y18263) y, al igual que los demás miembros del género *Novirhabdovirus*, contiene 6 ORF (3' N-M1-M2-G-NV-L 5'; Figura 2) cada uno de los cuales codifica una proteína: nucleoproteína (N), fosfoproteína (M1), proteína matriz (M2), proteína no estructural (NV), glicoproteína (G) y polimerasa (L).

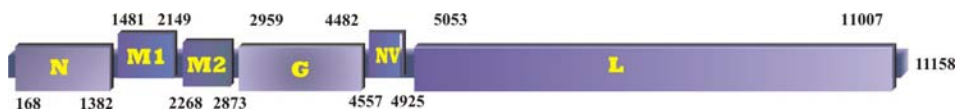


Figura 2: Mapa genómico de VHSV cepa F1 (Schütze y col., 1999); se indican las posiciones de inicio y final de cada ORF recogidas en la base de datos GenBank con código de acceso Y18263.

La transcripción a ARN mensajero monocistrónico para traducir a proteínas virales tiene lugar en el siguiente orden: En primer lugar la proteína N o nucleoproteína que presenta una masa molecular entre 38 y 41 kDa; a continuación tiene lugar la traducción de la proteína M1 una fosfoproteína unida al ARN que presenta una masa molecular entre 21,5 y 25 kDa, seguida de la M2, proteína de membrana que cubre la ribonucleoproteína y que presenta un tamaño de 19 kDa. Por último se lleva a cabo la traducción de la glicoproteína (proteína G) y de la L o polimerasa con tamaños de 72-80 kDa y 157-190 kDa respectivamente (Lenoir y de Kinkelin, 1975). El gen NV con un tamaño entre 12 y 14 kDa (Kurath y col., 1997) es transcrito en un pequeño ARN mensajero que codifica una proteína de 122 aminoácidos (Schutze y col., 1996).

La proteína matriz es una proteína multifuncional que juega un papel crucial en el ensamblaje viral y en la extrusión, además tiene otra función como proteína reguladora con actividad estimulante de la replicación (Finke y col., 2003). Por su parte, la función de la proteína NV, que no aparece en el virión maduro pero sí está presente en las células infectadas, es todavía desconocida. Aunque en principio se creyó que jugaba un papel importante en la replicación viral (Nichol y col., 1995) nuevos hallazgos sugieren que, aunque esta proteína no es en absoluto necesaria para la replicación, su presencia mejora substancialmente la multiplicación del virus (Biacchesi y col., 2000).

Tipado de VHSV

En cuanto a la clasificación del virus, inicialmente se describieron tres tipos serológicos: F1, Heddam y 23/75 (Le Berre y col., 1977). En la década de los 90, Basurco y col. (1995) realizaron un estudio epidemiológico de VHSV a partir de la secuencia de los genes G y NV de distintos aislados de Europa y Norte América. En base al porcentaje de nucleótidos similares, observaron que los aislados de una y otra zona geográfica formaban dos grupos claramente definidos; además, comprobaron que mientras que los aislados americanos se englobaban en un grupo altamente homogéneo, los aislados europeos exhibían una alta variabilidad genética. Los trabajos de clasificación realizados con posterioridad se han basado fundamentalmente en el tipado mediante análisis de la secuencia de ácidos nucleicos. Así, la primera tentativa de tipado se llevó a cabo mediante el análisis de un pequeño fragmento de la secuencia de la glicoproteína, estableciéndose tres genogrupos, uno americano y dos europeos, con homologías del 82% y 90%, respectivamente (Benmansour y col., 1997; Stone y col., 1997). Poco después, Snow y col. (1999a) utilizan por primera vez un fragmento de la secuencia del gen N para llevar a cabo la clasificación y

establecen a su vez tres grupos genéticos similares. Posteriormente, Nishizawa y col. (2002) utilizaron la clasificación establecida por Benmansour y col. (1997) para determinar la relación genética entre aislados japoneses, americanos y europeos de VHSV. En ese mismo año, Thiéry y col. (2002) llevaron a cabo el análisis filogenético, basado en un fragmento de 324 nucleótidos del gen G, de 63 cepas de VHSV aisladas a lo largo de un periodo de 28 años, obteniendo un resultado similar a los trabajos precedentes y estableciendo una relación entre el genotipo y el origen geográfico del aislado. Otros trabajos más recientes han establecido la existencia de 4 genotipos basados tanto en la secuencia del gen G prácticamente completo (Einer-Jensen y col., 2004) como en un fragmento del gen N (Snow y col., 2004). Recientemente, Einer-Jensen y col. (2005a) han llevado a cabo estudios filogenéticos de VHSV basados en distintas regiones del genoma y han confirmado la existencia de cuatro genotipos con independencia del gen secuenciado.

Además de la secuenciación, se han descrito otros métodos para la caracterización de VHSV basados en diferencias a nivel molecular como el *fingerprinting* con ribonucleasa T1 (Oshima y col., 1993) o el test de protección de ribonucleasa (RPA) descrita por Snow y col. (1999a). Más recientemente se ha llevado a cabo el genotipado de VHSV mediante el análisis de fragmentos de restricción (RFLP's, *restriction fragment length polymorphisms*) del gen de la glicoproteína (Einer-Jensen y col., 2005b), con idénticos resultados a los de secuenciación.

Transmisión y patología

El VHSV es diseminado por las heces, orina y fluidos sexuales de animales infectados, que transmiten el virus al medio acuático. La forma de transmisión del virus es la vía horizontal, tanto de forma directa, a través de las branquias o de heridas corporales (la infección por vía oral es poco probable),

como de manera indirecta, por la manipulación inadecuada o por medio de otras especies animales que actuarían como reservorios de la enfermedad. La transmisión vertical en infecciones por VHSV no está demostrada; en principio los huevos embrionados no parecen intervenir en la transmisión de la enfermedad, pero sí el agua y el material de embalaje de los huevos en los que puede ser transportado el virus (O.I.E 2006).

La supervivencia de un virus fuera de su huésped natural depende del mantenimiento de su capacidad infectiva en el medio. El virus VHSV puede recuperarse después de 40 horas a 15° C a partir de agua de mar filtrada, pero con una disminución del 50% a las 10 horas. El fluido ovárico y el medio de cultivo enriquecido con suero incrementan la estabilidad del virus en estado no congelado, mientras que la presencia de ciertos contaminantes en el agua de mar, como el petróleo, no afecta a la recuperación del virus (Kocan y col., 2001a).

Al igual que otros virus de salmónidos, el VHSV causa típicamente una enfermedad aguda en individuos juveniles, llegando a alcanzar unas tasas de mortalidad del 90% en alevines, aunque este porcentaje disminuye cuando se trata de juveniles o adultos, que pueden alcanzar el estado de portador asintomático. Al igual que en la mayoría de las enfermedades virales, el estrés juega un papel primordial en la reaparición de la infección en los estados portadores (Kocan y col., 2001b).

En salmónidos, la enfermedad se caracteriza por la aparición de exoftalmia en uno o ambos ojos, así como hemorragias tanto externamente como en los órganos internos y músculo; los individuos afectados presentan las branquias pálidas y pueden estar ligeramente manchadas con petequias (Wolf, 1988). Otros síntomas son la natación errática y dificultad en la orientación (Smail, 1999).

Los cambios patológicos descritos para rodaballo incluyen un ligero oscurecimiento de la piel y la presencia de hemorragias alrededor de la cabeza así como en la base de las aletas (Castric y de Kinkelin, 1984; Snow y Smail, 1999); internamente se caracteriza por la necrosis en hígado y corazón, además de las típicas hemorragias en el tracto intestinal y en el músculo esquelético (Ross y col., 1994; Brudeseth y col., 2005).

Internamente, la infección transcurre con edemas y hemorragias, ya que la multiplicación del virus tiene lugar en las células endoteliales de los capilares sanguíneos, leucocitos y tejido hematopoyético. Riñón, bazo, corazón, hígado y tracto digestivo son los órganos donde se puede observar mayor carga viral en peces infectados. Por ello, para aislar el VHSV en cultivo celular, a partir de un pez infectado, se emplean sobre todo homogenado de riñón y bazo, aunque también puede aislarse de cerebro o de fluido ovárico (Wolf, 1988).

Diagnóstico e identificación de VHSV

Las líneas celulares que han demostrado efectividad para el aislamiento del virus se describen en la tabla 2. Las más frecuentemente empleadas son la línea celular BF-2, derivada de pedúnculo de bluegill y de morfología fibroblástica (Wolf y Quimby, 1966), y la EPC (epitelioma papuloso de carpa) de morfología epitelial (Tomasec y Fijan, 1971). No obstante, también se puede aislar el virus en otras líneas celulares como FHM (tronco caudal de *fathead minnow*; Gravel y Malsberger, 1965) y CHSE-214 (embrión de salmón Chinook; Nims y col., 1970), ambas de naturaleza epitelial (Wolf, 1988). En cualquier caso, para optimizar el aislamiento en cultivo, la incubación debe realizarse a 15° C, y el medio de cultivo debe mantenerse a un pH entre 7,4 y 7,8.

Tabla 2: Líneas celulares susceptibles al virus VHSV.

Línea celular	Origen	Morfología	Temperatura (°C)		Referencia
			Rango	Óptima	
CHSE-214	Embrión de salmón Chinook	Epitelial	4-27	21	Nims y col., 1970
EPC	Epitelioma papuloso de carpa	Epitelial	4-35	25	Tomasec y Fijan, 1971
RTG-2	Gónada de trucha arcoiris	Fibroblástica	4-26	20	Wolf y Quimby, 1962
BF-2	Pedúnculo de bluegill	Fibroblástica	15-33	21	Wolf y Quimby, 1966
FHM	Tronco caudal de fathead minnow	Epitelial	4-36	25	Gravel y Malsberger, 1965
STE-137	Embrión de trucha arcoiris	Epitelial	15-21	18	Lannann y col., 1984

En un principio el diagnóstico de VHSV se hacía a la vista de signos clínicos, datos epidemiológicos (como especie o edad del huésped, localización geográfica, época del año, temperatura del agua, etc) y las características del ECP desarrollado en cultivos celulares inoculados con tejidos o fluidos del pez infectado.

Para la identificación del virus, se han empleado técnicas serológicas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo, de las cuales la seroneutralización, la inmunofluorescencia (IF) y el ELISA son las mejor consideradas. La seroneutralización se basa en el hecho de que las proteínas que el virus usa para adsorberse a la superficie celular son también proteínas antigénicas; de este modo la utilización de un antisuero específico neutralizará (impedirá) la entrada del virus en la célula evitando así el desarrollo de ECP. El fundamento de las técnicas IF y ELISA es también el establecimiento de una reacción antígeno-anticuerpo. En el caso del ELISA los anticuerpos están ligados a un enzima (complejo que recibe el nombre de conjugado), que en presencia del sustrato específico produce una reacción colorimétrica

fácilmente identificable (Mourton y col., 1990). En el caso de IF el antisuero específico estará marcado con un compuesto (isotiocianato de fluoresceína) que bajo luz ultravioleta emite fluorescencia (Jorgensen y Meyling, 1972).

Durante la última década, se han desarrollado nuevas metodologías para el diagnóstico de virus y enfermedades virales, incluidas las técnicas moleculares, entre las que debemos destacar la hibridación de ácidos nucleicos (HAN) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La HAN, que fue empleada por primera vez para el diagnóstico de VHSV por Batts y col. (1993), se basa en el hecho de que dos moléculas de ácido nucleico solo pueden hibridar si presentan un mínimo de homología. En esta técnica se emplea una sonda específica de diagnóstico, que es un fragmento de ADNc correspondiente a una región de la secuencia genómica del virus obtenida mediante clonación o PCR. Para la detección de hibridación específica la sonda debe estar marcada, ya sea con un isótopo radiactivo o con un marcaje no isotópico, lo que condicionará el revelado de la reacción que se hará mediante película de rayos X en caso de marcaje radiactivo, o bien a través de un proceso enzimático si el marcaje es no radiactivo.

En cuanto a la técnica de PCR, esta se basa en la amplificación de un fragmento de ácido nucleico comprendido entre dos regiones cuya secuencia se conoce de un ADN patrón. En la actualidad se conoce la secuencia nucleotídica completa del virus VHSV (Schutze y col., 1999) lo que permite la selección de cebadores específicos para cualquier región del genoma y, a partir de ahí, la amplificación mediante ADN polimerasa. Con este método se puede diagnosticar cualquier cepa del virus, incluyendo las cepas marinas (que presentan una mayor variabilidad), en un corto periodo de tiempo (Bruchhof y col., 1995; Miller y col., 1998; Guillou y col., 1999), por ello ha sido propuesta su inclusión en el *Manual de Diagnóstico de Enfermedades de Animales Acuáticos* de la Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E.) (Enzmann y col., 2001). También debemos destacar, dentro de los métodos

moleculares derivados de la PCR, la técnica de *PCR en tiempo real (qPCR)*; en este caso, los ciclos de amplificación del genoma y su detección se producen simultáneamente gracias a la emisión de fluorescencia que se produce por el uso de marcadores específicos. Los marcadores de fluorescencia pueden ser de 2 tipos: agentes intercalantes, siendo el más conocido el *SYBR Green I*, y sondas de ADN tipo cadenas de *TaqMan*, *Molecular Beacons* y *FRET*. El *SYBR Green* y similares se intercalan entre el ADN bicatenal, por ello son no específicas ya que pueden unirse a dímeros de cebadores o productos inespecíficos. Por otro lado, las sondas muestran una mayor especificidad; y su marcaje con fluorocromos está diseñado de modo que el incremento en la señal fluorescente se corresponde con la amplificación específica del ADN. Además de como método de detección, la *qPCR* se ha usado también para la cuantificación del virus en muestras de tejidos (Chico y col., 2006).

Control y prevención

Debido a la ausencia de un procedimiento efectivo de tratamiento, el primer punto a considerar en un plan de control y prevención de la enfermedad es el diseño de un sistema de profilaxis basado en una vigilancia continua de las aguas y un aislamiento de los peces sanos de aquellas zonas que constituyan un posible foco de contaminación. Una segunda vía es el rápido aislamiento y destrucción de los lotes infectados, lo cual precisa de métodos rápidos y eficaces de diagnóstico.

Otro método de prevención es la vacunación. Tradicionalmente las vacunas eran vivas (atenuadas) o muertas (inactivadas). Los peligros de estas vacunas tradicionales son la reversión y el porcentaje residual de patógeno vivo, respectivamente. Con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, se ha hecho posible la construcción de vectores vivos (bacterias o virus inocuos) que pueden usarse para transportar un antígeno de interés en protección contra

un patógeno, o bien para la producción, en grandes cantidades, del antígeno extraído del patógeno (vacunas subunitarias) obviando la producción del mismo. Entre las vacunas por subunidades, hasta hace poco sólo se conocían las basadas en subunidades proteicas o de lipopolisacáridos; recientemente, sin embargo, se han desarrollado vacunas genéticas o de ADN que abren perspectivas muy optimistas (Fernandez-Alonso y col., 1999). En teoría estas son las vacunas más seguras que existen ya que, al utilizar únicamente el material genético, es imposible que se produzcan fenómenos de reversión; de hecho, suelen conferir una protección eficaz sin provocar efectos secundarios negativos (Manoj y col., 2004). Desde que se comenzó a introducir la posibilidad de la utilización de las vacunas ADN en acuicultura, la mayoría de los estudios realizados en vacunas ADN frente a virus en peces, se han realizado con rhabdovirus, principalmente con los virus VHSV (Boudinot y col., 1998; Heppell y col., 1998) e IHNV (Anderson y col., 1996; Leong y col., 1997). La producción de estas vacunas de ADN se basan en los tradicionales plásmidos de *Scherichia coli* diseñados para la expresión transitoria en células eucariotas y en todos los casos el gen del virus que se incluye es el de la glicoproteína, ya que las vacunas de ADN que codifican para cualquiera de las otras proteínas (N, NV, M, P) no protegen frente a una infección con virus virulento (Corbeil y col., 1999).

Una de las posibilidades para aumentar la inmunogenicidad de una vacuna, y por lo tanto aumentar la protección que esta confiere, es la administración conjunta de ésta con un adyuvante. Los adyuvantes actúan fundamentalmente favoreciendo la presentación de los antígenos al sistema inmune, mediante el secuestro de los antígenos vacunales y la posterior liberación de manera lenta y prolongada, así como produciendo una ligera inflamación que activa la atracción de las células presentadoras. Si con ello se consigue aumentar la capacidad y duración de la protección que confiere una vacuna, la dosis de vacuna a emplear podría disminuir, lo que conllevaría una reducción de costes (Jiménez y col., 2005). En el caso de vacunas ADN, además

de la posible utilización de adyuvantes tradicionales, existe la posibilidad de utilizar otro tipo de adyuvantes moleculares que se encuentren incluidos en el propio plásmido vacunal. Por ejemplo, secuencias cortas de ADN repetitivo no metilado que se encuentran generalmente en los plásmidos de las bacterias. Sin embargo, por el momento, su capacidad adyuvante en vacunas ADN para peces no ha sido estudiada en profundidad (Lorenzen y col., 2002).

Otro de los problemas que afectan a la posible aplicación de las vacunas ADN a la acuicultura es la limitada duración de la inmunidad específica inducida por ellas. Una posible solución sería que las vacunas de ADN no sólo transfectaran los tejidos adecuados sino que los transformaran permanentemente, de modo que la producción de antígeno y por lo tanto la inmunidad sería constante (Coll, 2001).

La ruta idónea para la administración de una vacuna en peces sería por baño o inmersión; sin embargo, hasta ahora, la ruta de administración de las vacunas de ADN que ha resultado mas efectiva en peces es la intramuscular, lo que conlleva que la administración de la vacuna sea una tarea demasiado laboriosa, costosa e inviable en la práctica, sobre todo con peces de pequeño tamaño y escaso valor comercial. Aunque la utilización de ultrasonidos de baja frecuencia (Fernández-Alonso y col., 2001) y el choque hiper-osmótico (Huising y col., 2003) parecen mejorar el resultado de la vacunación por baño-inmersión, los niveles de protección siguen siendo muy inferiores a los obtenidos con la inyección intramuscular.

A pesar de que para la mayoría de sistemas las vacunas ADN confieren una protección efectiva hasta 9 meses post-vacunación, éstas no podrán estar disponibles para su uso rutinario en acuicultura mientras no se conozcan los mecanismos inmunológicos mediante los cuales se obtiene la protección y no se resuelvan los problemas relacionados con su seguridad, producción a gran escala y rentabilidad económica (Jiménez y col., 2005).

CAPÍTULO 1:

**OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR PARA
DIAGNÓSTICO DE VHSV *IN VITRO***

RESUMEN

El virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) es un patógeno de reconocido interés en el cultivo de trucha arcoiris (*Onchorrhynchus mykiss*). El único método de diagnóstico de VHSV reconocido oficialmente por la Unión Europea está basado en la detección del agente viral en cultivo celular seguido de la identificación mediante técnicas inmunológicas. En este capítulo se propone la transcripción inversa seguida de una amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) como método de detección e identificación alternativo o complementario al cultivo celular. Para ello, se ha llevado a cabo la optimización de la técnica en todos sus pasos, incluyendo la extracción del ácido nucleico y la selección de cebadores. Los resultados obtenidos permiten concluir que se ha conseguido poner a punto una metodología rápida, sensible (límite de detección 10 fg de ARN viral) y altamente específica para el diagnóstico de este virus.

INTRODUCCIÓN

El virus VHSV es el agente causal de la septicemia hemorrágica viral (VHS), enfermedad que causa graves pérdidas económicas en la acuicultura continental, fundamentalmente en Europa (Smail, 1999). Debido a que en la actualidad no se dispone de tratamientos ni vacunas efectivos contra el VHSV, la única medida de control de la infección es evitar la exposición de los peces al virus y, especialmente, evitar los movimientos de peces infectados. Por este motivo es de vital importancia que el agente infeccioso sea rápidamente identificado, lo que hace imprescindible la puesta a punto de procedimientos de diagnóstico rápidos, sensibles y específicos.

La VHS es una de las enfermedades consideradas de declaración obligatoria en el ámbito de la Unión Europea, según establece la Directiva 93/53. Por este motivo la decisión 2001/183/CE establece los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y confirmación de esta enfermedad. Conforme a esta normativa, el examen virológico ha de iniciarse con el cultivo celular, que debe incluir las líneas celulares BF-2 (pedúnculo de bluegill) o RTG-2 (gónada de trucha arcoiris) y EPC (epitelioma papuloso de carpa) o FHM (tronco caudal de fathead minnow). Si se observa la aparición de efecto citopático (ECP) en el cultivo celular inoculado, se debe proceder a la identificación del virus mediante una o varias de las siguientes pruebas: seroneutralización, inmunofluorescencia (IF) o ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*). El material tisular puede además someterse a otras técnicas de diagnóstico como la RT-PCR, la IFA aplicada sobre cortes congelados, o la inmunohistoquímica (realizada con material fijado con formol); sin embargo, estas técnicas deben completarse siempre con el aislamiento del virus en cultivo celular.

El aislamiento en cultivo celular es un método laborioso que requiere tiempo (entre 15 y 20 días, siguiendo las normas de la UE) y, aunque la sensibilidad es teóricamente alta, puesto que en principio se puede detectar la presencia de una única partícula viral en la muestra inoculada en una monocapa, la efectividad de la técnica obviamente depende de la susceptibilidad de la línea celular elegida y de la capacidad de propagación del virus (Dopazo y Barja, 2001). La susceptibilidad puede depender, además del tipo y edad del clon, del número de pases o de la edad de la monocapa, así como del pH del medio de cultivo, por lo que la sensibilidad de esta técnica es a menudo más baja de la esperada. Por otro lado, hay una serie de puntos críticos que afectan a la eficacia de esta técnica para el diagnóstico. Así, algunos autores han indicado que la susceptibilidad de los cultivos celulares frente a VHSV puede verse favorecida con un tratamiento de la monocapa celular con polietilenglicol antes de la inoculación del virus (Batts y col., 1991). Además, determinados factores pueden afectar a la propagación viral, que puede fallar por razones de baja cantidad de partículas infectivas, inactivación del virus o toxicidad del extracto tisular para el cultivo celular. Aunque el aislamiento en cultivo celular es, en general, bastante efectivo cuando se trabaja con infecciones en fase aguda, su eficacia se reduce drásticamente cuando se trata de detectar virus en peces que presentan una infección latente o subclínica (Winton y Einer-Jensen, 2002). Por último, algunos autores han demostrado que por este método es inevitable que no se detecte determinado tipo de cepas, como se ha observado en muestras procedentes de bacalao atlántico, rodaballo o arenque (Jensen y col., 1979; Scholtfeldt y col., 1991; Dixon y col., 1997), que producían poco o ningún efecto citopático en células EPC.

Las técnicas serológicas aplicadas directamente sobre el tejido infectado reducen considerablemente el tiempo necesario para la confirmación del diagnóstico del virus; pero, según la normativa europea, para el diagnóstico

confirmativo estas técnicas deben completarse con el aislamiento en cultivo celular. En este sentido, aunque la Unión Europea permite el uso de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFAT; *indirect fluorescence antibody test*) y ELISA directamente sobre el homogenado de tejidos cuando se trata de confirmar un presunto brote de VHSV, evitando por tanto las limitaciones inherentes al cultivo celular, en la práctica su uso está muy restringido, ya que, tanto si el resultado es negativo como si se trata de la primera detección de VHSV en la zona, exige la realización adicional del aislamiento en cultivo celular.

Por otra parte, la capacidad de identificación del virus mediante técnicas serológicas es limitada. Así, el test de neutralización tiene, según Ahne (1981), una sensibilidad de alrededor de 10^6 partículas virales, mientras que el nivel de sensibilidad de ELISA para VHSV sería según Mourton y col. (1990), de 10^4 TCID₅₀ por gramo de tejido. El test de inmunofluorescencia se describe como el método de diagnóstico serológico más sensible, siendo capaz de detectar una partícula viral (Ahne, 1981), pero su sensibilidad puede verse afectada, al igual que con cualquier técnica serológica, por el grado de especificidad del antisuero empleado.

Durante la última década, se han desarrollado y aplicado nuevas metodologías para el diagnóstico de virus y enfermedades virales, conocidas como técnicas moleculares, concepto que engloba técnicas basadas en la detección del genoma viral, principalmente hibridación de ácidos nucleicos (HAN) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La hibridación de ácidos nucleicos se ha utilizado para el diagnóstico de numerosos virus de peces. Sin embargo, aunque algunos autores han publicado que presenta una alta sensibilidad (Winton, 1991), otros señalan que su sensibilidad es incluso relativamente inferior comparada con ELISA y siempre menor cuando la detección pretende hacerse directamente de tejido de pez (Dopazo y col., 1994). La primera referencia a la utilización de HAN

para el diagnóstico de rhabdovirus de peces se debe a Deering y col. (1991), quienes diseñaron una sonda específica para el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) que lo diferenciaba correctamente de otros rhabdovirus como el hirame o el VHSV. Con posterioridad Batts y col. (1993) emplearon esta técnica para el diagnóstico de VHSV, desarrollando sondas específicas para el gen N. Estas sondas identifican de manera específica cepas norteamericanas y europeas, lo cual indicaría que, aunque serológicamente indiferenciables, estos aislados constituyen dos grupos genéticamente distintos.

La PCR es una técnica de diagnóstico de demostrada alta sensibilidad (Dopazo y Barja, 2001); sin embargo, se ha discutido ampliamente acerca de su idoneidad para el diagnóstico de VHSV (Bruchhof y col., 1995; Miller y col., 1998; Guillou y col., 1999; Winton y Einer-Jensen, 2002), así como sobre su capacidad de diferenciación entre el VHSV y el virus IHNV, con el que presenta una gran similitud. Para ser utilizada como técnica de diagnóstico es imprescindible asegurar la fiabilidad de la PCR, tanto en términos de sensibilidad y especificidad, como de reproducibilidad y repetibilidad.

OBJETIVO

El objetivo del presente capítulo ha sido, por ello, la puesta a punto y optimización de un método de RT-PCR específico fiable y sensible para la detección de VHSV *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para la replicación viral se utilizaron dos líneas celulares de cultivo continuo. La línea BF-2, de morfología fibroblástica, obtenida de pedúnculo de “bluegill” (Wolf y Quimby, 1966) y la línea EPC, de naturaleza epitelial, obtenida a partir de epiteloma papuloso de carpa (Tomasec y Fijan, 1971). Para el mantenimiento y conservación de los tapices celulares se utilizó la metodología descrita por Kuchler (1977) y Toranzo (1980). Todas las líneas se cultivaron en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) con sales Earle’s, suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, penicilina ($100\text{UI} \times \text{ml}^{-1}$) y estreptomycin ($100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$). Las células se incubaron a su temperatura óptima de crecimiento (20 y 25°C , respectivamente) hasta alcanzar la confluencia celular; para el mantenimiento de las monocapas confluentes, el medio de cultivo se sustituyó por EMEM con FBS al 2% y los tapices se incubaron a 15°C .

La conservación de las células mediante congelación se realizó en una concentración aproximada de 5×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$, en EMEM con un 20% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), siguiendo las indicaciones de Kuchler (1977). La congelación se realizó lentamente, con una disminución gradual de la temperatura hasta alcanzar los -80°C , pasando finalmente a nitrógeno líquido. La descongelación se realizó de forma rápida, subiendo la temperatura a 37°C , transfiriendo las células inmediatamente a un frasco de cultivo con medio EMEM de crecimiento (EMEM sin DMSO, suplementado con 10% de FBS y antibióticos). En el momento en que las células comenzaron a adherirse al fondo del frasco, y con el objeto de reducir los efectos tóxicos del DMSO sobre las mismas, se sustituyó el medio por EMEM fresco.

Con el objeto de evitar interferencias debidas a la contaminación por microorganismos, tanto bacterianos como fúngicos, se realizaron controles rutinarios. Para ello, se inocularon alícuotas del medio de cultivo EMEM, los tampones y todas las soluciones empleadas, en tubos de medio tioglicolato, incubando a 25 y a 37 °C durante 48 horas; los medios o soluciones cuyos controles mostraron crecimiento microbiano fueron inmediatamente eliminados.

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

Para recuento de células, tras la separación celular con tripsina se recogieron 100 µl de suspensión celular, diluyéndose 1:5 con colorante vital (azul tripán al 0,02% en PBS), a continuación se procedió a su recuento en una cámara de Neubauer del modo indicado por Kuchler (1977).

VIRUS

Para la realización de este trabajo hemos usado 4 cepas de referencia del virus VHSV correspondientes a cada uno de los genotipos descritos para este virus (Einer-Jensen y col., 2004; Snow y col., 2004). Las cepas utilizadas fueron: FR-07/71 (Genotipo I), donada por el Dr P. de Kinkelin, Laboratoire Ichtyopathologie, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Thiverval-Grignon, France; DK5p551 (Genotipo II), UK860/94 (Genotipo III) y US-Makah (Genotipo IV), donadas por el Dr M. Snow del FRS Marine Laboratory, Aberdeen, UK. Las características de cada una de ellas se muestran en la tabla 1.1.

Tabla 1.1: Descripción de las cepas de VHSV empleadas.

Cepa	Genotipo	Origen	Hospedador	Referencia
FR-07/71	I	Francia	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Le Berre y col. 1977
DK5p551	II	Báltico	<i>Clupea harengus</i>	Skall y col. 2005.
UK860-94	III	Escocia	<i>Scophthalmus maximus</i>	Ross y col. 1994
US-Makah	IV	Wa, USA	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Brunson y col. 1989

Por otro lado, para los controles de especificidad se usaron cepas representativas de cada uno de los 4 electroferotipos de IHNV descritos por Hsu y col. (1986), todas ellas cedidas por la Dra. J.A. Leong, Universidad de Oregón, USA.

Para la propagación de todas las cepas virales se utilizaron las líneas celulares EPC y BF-2. Tras vaciar el medio de cultivo de los frascos con tapices semiconfluentes, se procedió a la inoculación de 100 μ l de virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1-0,01. Después de un período de adsorción de 45 min a temperatura ambiente y en agitación, se retiró el resto de inóculo y el tapiz se cubrió con EMEM suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 2% y antibiótico (según indicado anteriormente), a un pH aproximado de 7,6. La incubación se realizó a 15 °C hasta la visualización de un ECP avanzado, momento en que se recogieron los restos del tapiz en suspensión (virus crudo), conservándose a -20 ó a -80 °C hasta su utilización.

Las titulaciones virales se realizaron en placas de 96 pocillos con monocapas confluentes de células susceptibles, mediante el método de dosis infectiva 50 (TCID₅₀). Para ello, se realizaron diluciones decimales seriadas de la suspensión viral, preparadas en tampón Earle's suplementado con antibiótico, y se inocularon, por triplicado, alícuotas de 100 μ l por pocillo de cada dilución. La visualización de los pocillos con ECP se llevó a cabo transcurridos 15 días de

incubación, y los títulos se calcularon siguiendo el método descrito por Reed y Muench (1938) y se expresaron como la dilución del virus que produjo ECP en la mitad de los pocillos inoculados ($TCID_{50} \times ml^{-1}$).

PURIFICACIÓN PARCIAL DE RHABDOVIRUS

Los virus se inocularon en frascos de 75 cm² con monocapas semiconfluentes de células EPC. Tras la visualización de ECP generalizado, se recogió la suspensión viral, se retiró una alícuota para proceder a su titulación y el resto se centrifugó a $2.000 \times g$ durante 30 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 10 ml de SSC 1X (NaCl 0,15 M; citrato sódico 0,015 M), se sonicó (3 pulsos de 30 W durante 20 seg) para liberar las partículas virales asociadas a los restos celulares y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Los sobrenadantes de ambos procesos se mezclaron y se sometieron a centrifugación durante 1 h a $80.000 \times g$ a 4 °C. El precipitado resultante se resuspendió en 1 ml de SSC 1X, se depositó sobre un lecho de sacarosa 25% y se centrifugó a $110.000 \times g$ durante 1 hora a 10 °C. Finalmente, el precipitado obtenido se resuspendió en 200 µl de SSC y se mantuvo congelado a -20 °C hasta su uso. El virus así obtenido se utilizó para la comparación de las distintas técnicas de extracción de ácido nucleico.

EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL

Proteinasa K / Fenol-Cloroformo (PK/FC)

A una alícuota de 200 µl de virus semipurificado o virus crudo se le añadieron 24 µl de proteinasa K ($20 \text{ mg} \times ml^{-1}$) y 12 µl de SDS al 10% y se incubó a 37 °C durante 1,5 horas. A continuación se procedió a una extracción fenol-cloroformo, para lo cual se añadieron 400 µl de fenol-

cloroformo-isoamílico (25:24:1), agitando la mezcla vigorosamente en un agitador de tubos (vortex). Tras una centrifugación a $12.000 \times g$ a $4^\circ C$ durante 15 min, se recogió la fase acuosa, a la que se le añadieron 2 volúmenes de cloroformo; esta mezcla se agitó nuevamente en vórtex y se centrifugó 10 min a $4^\circ C$, transfiriéndose la fase acuosa a un nuevo vial. El ácido nucleico así extraído se precipitó con etanol, para lo que se añadieron 3 volúmenes de etanol frío y acetato sódico 3 M hasta una concentración final 0,3 M. Tras 15 min a $-80^\circ C$, se centrifugó 15 min a $4^\circ C$ y se lavó con etanol al 70% para eliminar los restos de sales. Finalmente, el ácido nucleico precipitado se secó en un concentrador a vacío SpeedVac (Savant), se resuspendió en un volumen de 100 μl de agua libre de nucleasas (H_2O -LN) o agua estéril tratada con DEPC (H_2O -DEPC) y se conservó a $-20^\circ C$ hasta su utilización.

Trizol LS-Reagent (Invitrogen)

En este procedimiento, para la extracción de ARN viral se utilizaron 200 μl de virus semipurificado, o virus crudo a los que se añadieron 700 μl de Trizol-LS Reagent. Al cabo de 10 min de incubación, se añadieron 200 μl de cloroformo, la mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó a $12.000 \times g$ a $4^\circ C$ durante 15 min. La fase acuosa resultante se transfirió a un nuevo vial y se le añadió un volumen equivalente de isopropanol. Tras una incubación de 5 a 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó 10 min a $12.000 \times g$ a $4^\circ C$, se retiró el sobrenadante, se añadió 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a $7.500 \times g$ durante 10 min a $4^\circ C$. Finalmente se vació el etanol, el precipitado se secó a vacío como se describió en el apartado anterior y se resuspendió en un volumen de 100 μl de H_2O -LN o H_2O -DEPC, conservándose el ARN extraído a $-20^\circ C$ hasta su utilización.

Extracción con métodos de captación de resinas:

Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel).- Un volumen de 200 µl de virus crudo se transfirió a un vial eppendorf, se añadieron 400 µl de solución de lisis RA1 suplementada con β-mercaptoetanol (a una concentración final de 0,14 M) y se agitó fuertemente en un vórtex; la suspensión lisada se transfirió a una unidad de filtración NucleoSpin y se centrifugó durante 1 min a 13.000 x g. Al lisado homogenizado se le añadieron 300 µl de etanol, se mezcló en vórtex y se transfirió a una columna NucleoSpin. A continuación se centrifugó a 8.000 × g durante 30 seg, se transfirió la columna a un nuevo tubo colector y se centrifugó de nuevo 1 min a 13.000 × g. Para eliminar los restos de ADN celular, 95 µl de la solución de DNasa I (suministrada por el fabricante) se aplicaron directamente en el centro de la columna. Tras incubación durante 15 min a temperatura ambiente, se añadieron 500 µl de solución RA2, se centrifugó 30 seg a 8.000 × g, se descartó el filtrado, se añadieron 600 µl de solución RA3 y se repitió la centrifugación. A continuación, se vació el líquido filtrado, se añadieron 250 µl de solución RA3 y se centrifugó a 13.000 × g durante 2 min, para secar la membrana completamente. La columna se transfirió a un vial eppendorf, se añadieron 100 µl de H₂O-LN directamente sobre la membrana y se centrifugó 1 min a 13.000 × g para eluir el ARN. La suspensión de ARN extraído se conservó a -20 °C.

SV-Total RNA Isolation (Promega).- A un volumen de 200 µl de virus crudo se le añadieron 175 µl de tampón de lisis suplementado con β-mercaptoetanol a una concentración final de 0,14 M. Los lisados viscosos se pasaron repetidamente por una jeringa con aguja de calibre 20G. La suspensión resultante se transfirió a un vial eppendorf de 1,5 ml, al que se añadieron 350 µl de tampón de

dilución, se mezcló invirtiendo el vial repetidamente y a continuación se incubó a 70 °C durante 3 min. El homogenado se centrifugó 10 min a temperatura ambiente y el sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo vial, se le añadieron 200 µl de etanol al 95% y se mezcló pipeteando varias veces. La suspensión se transfirió a una columna SV proporcionada por el fabricante y se centrifugó 1 min a 12.000 × g; el líquido recogido se vació y la columna se lavó haciendo pasar 600 µl de solución de lavado suplementada con etanol al 95%. A la columna se le añadieron 50 µl de solución de DNasa (suministrada por el fabricante), 40 µl de tampón Yellow Core, 5 µl de MnCl₂ (0,09 M) y 5 µl de DNasa I y se incubó 15 min a temperatura ambiente; a continuación se añadieron 200 µl de solución de paro y se centrifugó 1 min; el filtro se lavó 2 veces con solución de lavado mediante centrifugación. Finalmente, el ARN retenido en el filtro se eluyó añadiendo 100 µl de H₂O-LN y centrifugando durante 1 min; la solución de ARN recogida en el vial se conservó a -20 °C hasta su uso.

RNeasy® Mini Kit (Qiagen).- A un volumen de 200 µl de virus crudo se le añadieron 350 µl de tampón de lisis RLT suplementado con β-mercaptoetanol a una concentración final de 0,14 M y se homogenizó con una pipeta. A continuación se añadieron 350 µl de etanol al 70%, la suspensión de lisis se transfirió a una columna RNeasy Spin (suministrada por el fabricante) y se centrifugó a 8000 × g durante 15 seg. Tras descartar el filtrado, el ácido nucleico retenido en la columna se lavó añadiendo 700 µl de tampón RW1 y centrifugando como ya se ha descrito. A continuación se cambió el tubo colector, se añadieron 500 µl de tampón RPE (suplementado con 4 volúmenes de etanol absoluto) y se centrifugó nuevamente. Seguidamente se descartó el filtrado, se añadieron de nuevo 500 µl de tampón RPE y se centrifugó

2 min a $8000 \times g$. Se cambió el tubo colector y se añadieron 100 μl de $\text{H}_2\text{O-LN}$, se incubó 30 seg a temperatura ambiente y se centrifugó un min para eluir el ARN, que se conservó a -20°C hasta su uso.

CUANTIFICACIÓN DEL ARN EXTRAIDO

Para medir la concentración del ARN extraído se utilizó un espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia Biotech), con una cubeta de cuarzo de 60 μl de volumen de medición (QS 1000, Hellma®). La concentración se calculó en base a la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (teniendo en cuenta esta longitud de onda, a un valor de absorbancia de 1 le corresponde una concentración de ARN de $40 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$). Por otro lado, la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm representa una estimación de la pureza del ARN; así el ARN puro presenta un ratio de 2 entre ambas absorbancias; ratios entre 1,7 y 2 se consideran medidas aceptables y corresponden a ARN altamente puro (Ausubel y col., 1995).

SELECCIÓN DE CEBADORES

Para la detección de VHSV por RT-PCR se diseñaron un total de 3 parejas de cebadores (Tabla 1.2) con un tamaño entre 19 y 23 nucleótidos, seleccionados para la síntesis de productos de amplificación específicos de tamaños entre 358 y 432 pares de bases.

La selección se realizó en base a la secuencia genómica de la cepa de VHSV FR-07/71 (Número de acceso de la GenBank AJ233396), así como otras secuencias incluidas en la base de datos de secuencias genómicas GenBank. A continuación se llevó a cabo la selección de cebadores con el programa PrimerSelect, y una evaluación teórica de las distintas parejas, consistente en la

búsqueda de homologías entre las secuencias de los cebadores preseleccionados y las diversas secuencias de los virus, mediante el programa MegAling ambos incluidos en el paquete de software DNASTAR™ (Lasergene). Asimismo, se tuvo en cuenta la capacidad de autohibridación y de formación de estructuras "hairpin" de solapamiento de cada uno de estos cebadores.

Tabla 1.2: Descripción de los cebadores ensayados.

CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	POSICIÓN ¹	F (Pb) ²
<i>VHSV-cm1a</i>	CGTGCCGTCTCGAAGAAGAGATA	2718-2738	432
<i>VHSV-cm1b</i>	ACTGATAGCGGGAGATGGATG	3129-3149	
<i>VHSV-cm3a</i>	CAGGCGTTGTCCGTGCTTCT	278-297	358
<i>VHSV-cm3b</i>	ACCCTGCGAGAGTTTCCTGATGG	615-635	
<i>VHSV-cm10a</i>	ACAACAGCGCTCAATACAAG	3988-4007	399
<i>VHSV-cm10b</i>	AGAACTGCTGCATCGGAATC	4367-4386	

¹.-Posición en el genoma de la cepa FR07/71 (AJ233396).
².-Tamaño del fragmento de amplificación, en pares de bases.

El producto de amplificación resultante del uso de la pareja de cebadores *VHSV-cm1* presenta un tamaño de 432 pb, localizado en la región intergénica entre el gen de la proteína Matriz (M2) y el gen que codifica para la glicoproteína (gen G). La pareja de cebadores *VHSV-cm3* amplifica un producto de 358 pb, perteneciente a la región codificadora de la nucleoproteína (N). Finalmente, la pareja de cebadores *VHSV-cm10* ha sido seleccionada en una región del gen G y presenta un producto de amplificación de 399 pb. La

localización y el tamaño de los cebadores se pueden observar esquematizados en la figura 1.1.

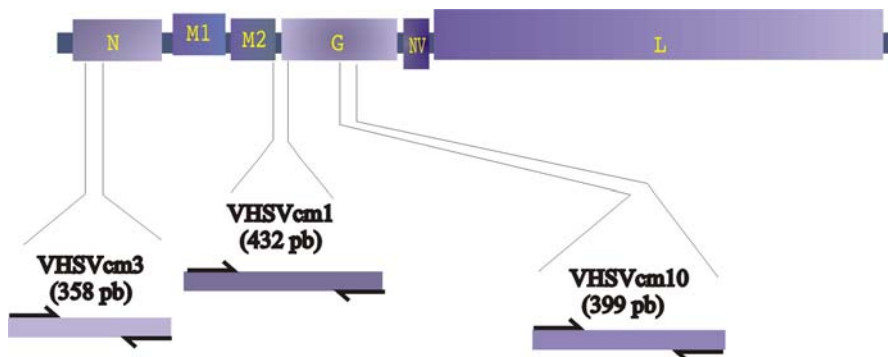


Figura 1.1: Mapa de localización (en la secuencia genómica de la cepa de referencia FR07/71) de los fragmentos de amplificación correspondientes a las tres parejas de cebadores testadas.

AMPLIFICACIÓN MEDIANTE RT-PCR

Para la amplificación del ARN viral y obtención del fragmento específico se empleó el kit comercial de RT-PCR SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) que permite realizar las reacciones de transcripción inversa y de PCR en un mismo vial.

Una cantidad aproximada de 100 ng de ARN viral se desnaturalizó a 95 °C durante 4 min en presencia de los cebadores correspondientes (a una concentración final de 1 µM), y rápidamente se transfirió a 48 °C para permitir la renaturalización durante 10 min. Seguidamente se añadieron 25 µl de Mezcla de Reacción 2X (dNTP 0,4 mM; MgSO₄ 2,4 mM) y 1 µl de la mezcla de enzimas (transcriptasa inversa y ADN polimerasa), además de H₂O-LN hasta completar un volumen total de 50 µl. La mezcla se incubó 30 min a 48 °C (fase de transcripción inversa), tras la cual la transcriptasa inversa se inactivó

mediante desnaturalización durante 5 min a 94 °C. Seguidamente se aplicaron 35 ciclos de amplificación, cada uno consistente en 30 seg a 94 °C (desnaturalización), 1 min a 60 °C (rehibridación) y 2 min a 68 °C (fase de elongación). Finalmente se aplicó una fase de extensión durante 10 min a 68 °C. Como control negativo para la RT-PCR se usó H₂O-LN.

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Los productos de RT-PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Para ello, se mezcló un volumen de 10 µl del producto de amplificación con 2 µl de tampón de carga (xilene-cianol:azul de bromofenol:glicerol; 1:1:5) y la mezcla se cargó en un gel de 2% de agarosa en tampón TAE 1X (tris-HCl 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 2 mM, pH 8,0). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 2 horas; a continuación, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0,5 mg × ml⁻¹) durante aproximadamente 30 min y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz U.V. con ayuda del sistema de fotodocumentación Gelprinter Plus (TDI). En ocasiones el gel de agarosa se preparó directamente con una concentración de bromuro de etidio de 0,5 µg × ml⁻¹, lo que permitió la visualización del gel bajo luz U.V. durante el transcurso de la electroforesis.

El tamaño de los productos de amplificación se determinó mediante comparación con marcadores de pesos moleculares.

EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Una segunda evaluación de la eficacia de cada uno de los procedimientos empleados para la obtención del ARN viral se realizó de forma cualitativa. Para ello, se utilizaron placas de 6 pocillos con monocapas

semiconfluentes de células EPC que se inocularon a una MOI entre 0,01 y 0,1 con cada una de las 4 cepas de referencia, incubando a 15 °C. Tras el desarrollo de ECP en cada pocillo, se aplicaron los métodos de extracción descritos anteriormente. A continuación, el ARN viral extraído en cada uno de los casos se sometió a RT-PCR empleando la pareja de cebadores *VHSV-cm3*. La obtención de un producto de amplificación específico y el nivel de intensidad del mismo en el gel de agarosa se consideraron como indicadores cualitativos de la eficacia de la extracción.

EVALUACIÓN DE LAS PAREJAS DE CEBADORES

Evaluación de la eficacia y especificidad.- Para llevar a cabo la evaluación de la eficacia de las parejas de cebadores preseleccionados, cada una de las cepas de referencia utilizadas se inoculó en frascos de 25 cm² con tapices confluentes de células EPC. Cuando comenzó a visualizarse el ECP, los tapices infectados se sometieron a extracción del ARN viral empleando el método de Trizol; se midió la cantidad de ARN extraído y se igualó la concentración de ARN de los aislados. El ARN extraído se repartió en 3 alícuotas, cada una de las cuales se sometió a amplificación como se indicó anteriormente, con cada una de las tres parejas de cebadores descritas. Tras electroforesis en gel de agarosa, la eficacia de los cebadores se evaluó cualitativamente en base a la especificidad y al nivel de amplificación, determinado por la ausencia de bandas inespecíficas y por la intensidad de la banda específica, respectivamente.

Evaluación de la sensibilidad.- Para evaluar la sensibilidad de la RT-PCR con las 3 parejas de cebadores se utilizó virus semipurificado de la cepa FR07/71. La muestra de ARN viral, extraído mediante el método de PK/FC se ajustó a una concentración de 10 ng × μl⁻¹ y se sometió a 3 diluciones decimales seriadas para alcanzar las concentraciones de 1 ng, 100 pg y 10 pg en los 5 μl usados para la RT-PCR, que se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

Límite de detección.- Para establecer el límite de detección con la técnica de RT-PCR se utilizó nuevamente la cepa FR07/71, en este caso con la pareja de cebadores que demostró mayor eficacia en el apartado anterior. Para ello, el ARN viral obtenido mediante extracción con el método PK/FC se sometió a diluciones seriadas hasta alcanzar concentraciones de ARN de 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg y 0,1 fg, en un volumen de 5 µl; estas fueron sometidas a RT-PCR con el kit SuperScriptTM III One-Step RT-PCR system with Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen), como se indicó anteriormente. Además se valoró, del modo indicado en el apartado siguiente, el efecto de los procedimientos de confirmación de especificidad (HAN y nested-PCR) sobre el límite de detección en el diagnóstico.

EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LA RT-PCR

La evaluación de la especificidad del producto amplificado con las tres parejas de cebadores se comprobó mediante las técnicas de Southern blot e hibridación con sondas específicas (SB/HAN) y nested-PCR.

SB / HAN

Preparación y marcaje de las sondas de ADNc. Los productos de amplificación obtenidos con las distintas parejas de cebadores, a partir de ARN extraído de la cepa de referencia FR-07/71, se sometieron a electroforesis en agarosa al 1,5%. Las bandas se cortaron con un bisturí y el ADNc se extrajo y purificó empleando el sistema *DNA Gel Extraction Kit* (Millipore), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. A continuación, entre 30 y 50 ng de ADNc se marcaron con digoxigenina utilizando el kit *DIG-High Prime* (Roche Diagnostics

Corporation), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Las sondas marcadas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Southern Blot (SB).- Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en agarosa al 1,5% durante 1 hora a 100 V. A continuación, los fragmentos de ADN fueron transferidos a una membrana de nylon *Hybond N+* (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando el sistema *Mini Trans-blot® Cell* (Biorad) (Figura 1.2). Para



Figura 1.2: Sistema Mini Trans-Blot Cell / Mini Protean 3.

desnaturalizar el ADN transferido, el gel se incubó a 4 °C durante 15 min en agitación continua, en una solución de NaOH 150 mM, y a continuación se neutralizó con una solución de TBE 0,5X (Tris 20 mM, ácido bórico 20 mM, EDTA 1 mM) durante 10 min en agitación a 4 °C. La transferencia se realizó durante 1 hora a 60 voltios, sobre una membrana de nylon equilibrada en tampón TBE 0,5X durante 15 min a 4 °C. Finalmente el ADN se fijó a la membrana con luz UV (1.200 Kj durante 3 min) en un crosslinker CL-1000 (UVP) y se secó a 60 °C durante 5-10 min.

Hibridación de ácidos nucleicos (HAN).- Las membranas se incubaron en tampón de prehibridación Hibrisol I (3 ml × cm⁻²), en el interior de

bolsas selladas, en un horno de hibridación a 45 °C durante 1,5 a 2 horas. Transcurrida la prehibridación, la solución fue sustituida por nueva solución hibrisol I (3 ml × cm⁻²), suplementada con 10 µl de la sonda previamente desnaturalizada durante 5 min a 100 °C. La hibridación se realizó durante al menos 4 horas en un horno de hibridación a 45 °C. Tras la incubación se retiró el tampón de hibridación y se procedió a lavar las membranas, primero un breve lavado con SSC 2X seguido de un lavado con una solución SSC 2X/SDS 0,1 % durante 15 min a temperatura ambiente, y a continuación un tercer lavado en solución SSC 0,1X/SDS 0,1 %, durante otros 15 min a temperatura ambiente. A continuación las membranas se lavaron con *solución de lavado* (ácido maleico 0,1 M; NaCl 0,15 M, pH 7,5; Tween 20 0,3%) durante 1 min, y se incubaron durante 30 min en la misma solución, suplementada con un 1,5% de *reactivo bloqueante* (Boehringer Mannheim). La solución de bloqueo se retiró, se añadió el anticuerpo conjugado Anti DIG-AP (Anti-Digoxigenina fosfatasa alcalina) en una relación 1:10.000 en solución de lavado, incubando 30 min. Para eliminar los restos de anticuerpo no incorporados se realizaron dos lavados consecutivos de 15 min en solución de lavado. Las membranas se trataron brevemente con tampón de fosfatasa (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM; pH 9,5) y se incubaron con CSPD (Roche) diluido 1:100 en tampón fosfatasa a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación. La membrana se secó sobre un papel de filtro, dejándola ligeramente húmeda, se introdujo en una bolsa sellada, se incubó a 37 °C durante 15 min en oscuridad y a continuación se expuso contra una película autorradiográfica durante 30-40 min.

NESTED-PCR

Para la realización de este ensayo se utilizó la pareja de cebadores internos *VHSV-cm3 intro* diseñados para amplificar el producto de RT-PCR obtenido con los cebadores *VHSV-cm3* (Figura 1.3) y que generan

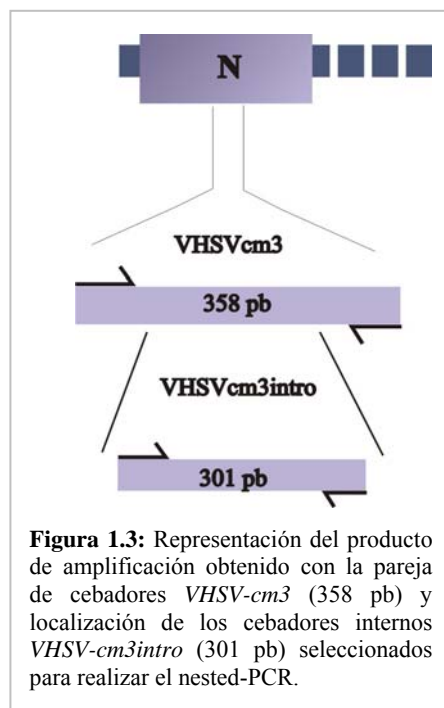


Figura 1.3: Representación del producto de amplificación obtenido con la pareja de cebadores *VHSV-cm3* (358 pb) y localización de los cebadores internos *VHSV-cm3intro* (301 pb) seleccionados para realizar el nested-PCR.

un producto de amplificación de 301 pb (Tabla 1.3). La reacción se realizó utilizando como patrón tanto el producto de RT-PCR directamente, como purificado a partir del gel de agarosa mediante el sistema *DNA Gel extraction Kit* (Millipore). Para la reacción se usaron 5 μ l de 10X *HotMaster Taq Buffer with Mg²⁺*, 1 μ l de dNTP 10 mM y 0,5 U de *HotMaster Taq DNA polimerasa*. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: incubación inicial de 2 min a 94 °C, seguido de 25 ciclos de 94 °C 30 seg, 55 °C 30 seg y 68 °C 45 seg, finalizando con una elongación de 10 min.

Tabla 1.3: Descripción de los cebadores *VHSV-cm3 intro*.

CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	POSICIÓN ¹	F (pb) ²
<i>VHSV-cm3a intro</i>	CTATGTACTCCAAGGGAAC	301-319	301
<i>VHSV-cm3b intro</i>	CGGTGAAGTGCTGCAGTTC	584-602	

¹.-Posición en el genoma de la cepa FR07/71 (AJ233396).

².-Tamaño del fragmento de amplificación, en pares de bases.

CINÉTICA DE DETECCIÓN EN CULTIVO CELULAR

Este ensayo se llevó a cabo para determinar el tiempo mínimo necesario para detectar, mediante RT-PCR, la presencia de virus en la línea celular EPC empleando la pareja de cebadores VHS_{cm3}. Para ello, según se esquematiza en la figura 1.4, cada una de las cepas de referencia se inoculó en placas de 6 pocillos con tapices semiconfluentes, a una MOI entre 0,01 y 0,1. Tras 45 min de adsorción a temperatura ambiente, el tapiz se lavó con tampón Earle's, se cubrió con EMEM sin suero (pH 7,6) y se incubó a 15 °C. A distintos tiempos (4, 6, 8, 10 y 12 horas), se rascó el tapiz en el propio medio de cultivo y el ARN de la suspensión se extrajo por el método de Trizol LS-Reagent. A continuación se realizó la RT-PCR con el kit SuperScriptTM III One-Step RT-PCR system with Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen) según se ha descrito y los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% bajo luz ultravioleta.

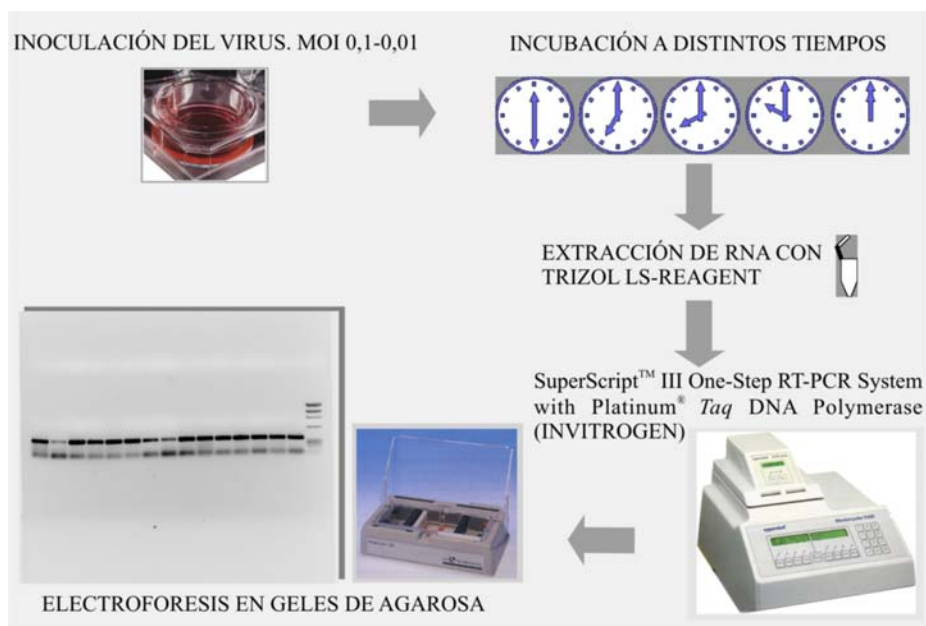


Figura 1.4: Esquema representativo del protocolo seguido en los experimentos de cinética de detección.

RESULTADOS

SELECCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL

En primer lugar se llevó a cabo una valoración, mediante espectrofotometría, de la concentración y pureza del ácido nucleico extraído por los métodos de extracción Trizol LS-Reagent y PK / FC, tanto a partir de virus semipurificado como de virus crudo. Como puede observarse en la tabla 1.4, los niveles de ARN extraído a partir de virus semipurificado fueron ligeramente superiores con Trizol (con una media entre 52,7 y 69,5 ng) que con PK / FC

(entre 30,8 y 24,3 ng). En el caso de extracciones a partir de virus crudo, los niveles se incrementaron ostensiblemente con Trizol (275,2 ng) y en menor medida con PK / FC (119,0 ng).

Tabla 1.4: Valoración de niveles de concentración y pureza del ARN extraído con los métodos de extracción Trizol LS-Reagent y Proteinasa K/ Fenol cloroformo.

	Trizol LS-Reagent		Proteinasa K/ F-C	
<i>Virus semipurificado</i>				
^a Rep	^b ARN (ng)	^c Pureza	ARN (ng)	Pureza
A1	29,4	70%	193*	80%
A2	49	71%	22,4	96%
A3	79,8	73%	39,2	92%
Media	52,7±25,4		30,8±11,9	
CV	48,2%		38,6%	
B1	110,6	71%	12,6	87%
B2	51,8	73%	32,2	88%
B3	46,2	84%	28,0	100%
Media	69,5±35,7		24,3±10,3	
CV	51,3%		42,5%	
<i>Virus crudo</i>				
Rep	ARN (ng)	Pureza	ARN (ng)	Pureza
A1	267,2	75%	149,0	90%
A2	246,3	80%	123	89%
A3	312	81%	185	93%
Media	275,2±33,6		152,0±31,1	
CV	12,2%		20,4%	

^aRéplicas ensayadas.

^bCantidad de ARN, calculado tras la cuantificación espectrofotométrica, expresado en ng totales y como media ±σ (desviación típica), CV coeficiente de variación.

^cEstima de la pureza, calculada como la relación entre los valores de absorbancia a 260 y 280 nm.

*Datos eliminados para calcular media y CV.

Los valores obtenidos en la estimación de la pureza (expresados como el ratio entre los valores de absorbancia a 260 y 280 nm) fueron altos, superiores siempre al 80%, con PK / FC y un poco inferiores con Trizol LS-Reagent. Es necesario hacer notar, sin embargo que los valores de coeficiente de variación (CV) calculado fueron extremadamente altos, como se muestra en la tabla 1.4.

Una segunda aproximación la constituyó la evaluación cualitativa de la eficacia de los métodos de extracción, analizando la utilidad del ARN extraído para ser amplificado mediante RT-PCR. Una muestra de los resultados obtenidos se presenta en la figura 1.5. Como puede observarse, la amplificación

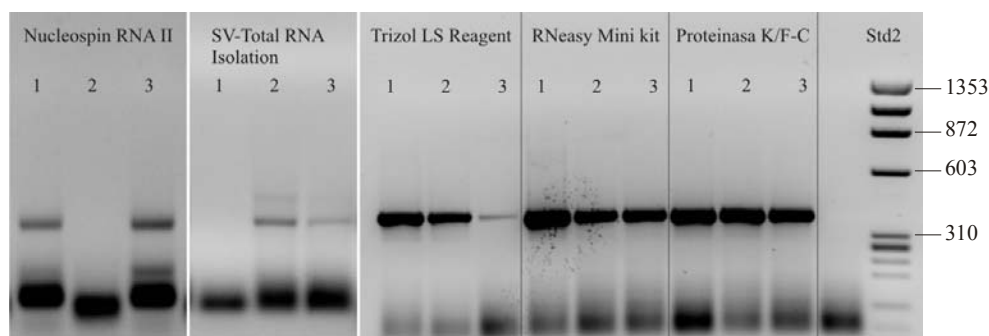


Figura 1.5: Productos de amplificación obtenidos al aplicar RT-PCR con la pareja de cebadores *VHSV-cm3*, utilizando como patrón tres replicas del ARN viral extraído (mediante los métodos Nucleospin RNA II, SV-Total RNA Isolation, Trizol LS-Reagent, RNeasy Mini kit y Proteínasa K/Fenol-Cloroformo) de virus crudo VHSV (cepa FR07/71), Std2: Estándar de tamaños moleculares ($\phi X174$ cortado con Hae III).

mediante RT-PCR solo fue efectiva en dos de las tres réplicas ensayadas, cuando el ARN fue extraído con los métodos de NucleoSpin (Macherey-Nagel) o SV-Total Isolation (Promega). Es de destacar la poca repetibilidad de estos métodos (resultados no mostrados). Además, en algunos de los ensayos realizados se obtuvieron bandas inespecíficas entre los productos de RT-PCR.

La extracción con los métodos tradicionales "proteínasa K / fenol cloroformo" (PK / FC) y Trizol, así como con el kit RNeasy (Qiagen), por el contrario, mostraron una alta eficacia. En todos los ensayos realizados empleando estos procedimientos, la detección del ARN viral extraído fue óptima. Obteniéndose productos de polimerización abundantes y específicos. En cuanto a la repetibilidad, el método proteínasa K/ fenol cloroformo es el que presenta unos resultados más constantes.

EVALUACIÓN DE CEBADORES

Evaluación de la eficacia.- Las 3 parejas de cebadores ensayadas se mostraron eficaces en la detección (Figura 1.6), mediante RT-PCR, del ARN de

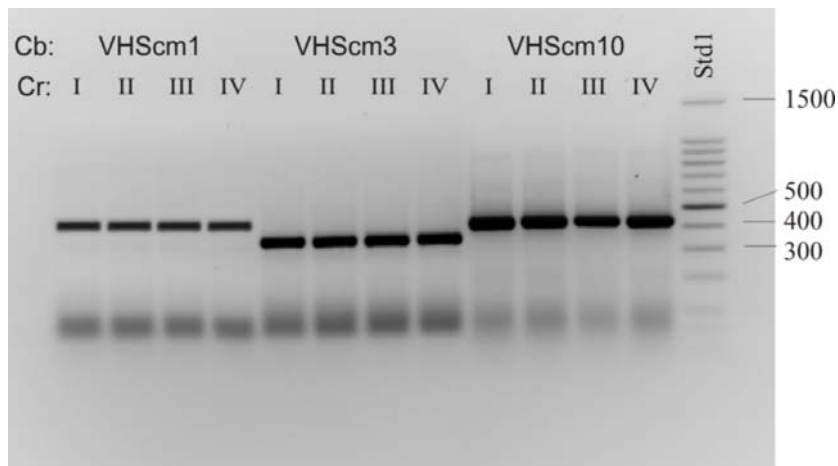


Figura 1.6: Evaluación de la eficacia de los cebadores de VHSV. Productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR con las 3 parejas de cebadores (Cb) para VHSV (*cm1*, *cm3* y *cm10*) utilizando como patrón el ARN viral extraído (mediante el método Trizol LS-Reagent) de tapices celulares infectados con cada una de las 4 cepas de referencia del virus VHSV: cepa FR07/71 (genotipo I), cepa DK5p551 (II), cepa UK860/94 (III) y cepa Makah (IV). Std1: Estándar de tamaños moleculares (*Bench Top 100bp DNA Ladder*, Promega), cuyos valores se indican en pares de bases.

las 4 cepas de referencia de VHSV, representativas de los 4 genotipos. Así, como podemos observar en la figura, la amplificación en todos los casos dio lugar a bandas nítidas, bien definidas y del tamaño esperado, con ausencia total de productos de amplificación inespecíficos.

Evaluación de la especificidad.- Las tres parejas de cebadores demostraron ser totalmente específicas para VHSV ya que no se obtuvo producto de amplificación cuando se aplicó RT-PCR al ARN extraído de cuatro cepas de IHNV representativas de los 4 electroferotipos (Figura 1.7). Este

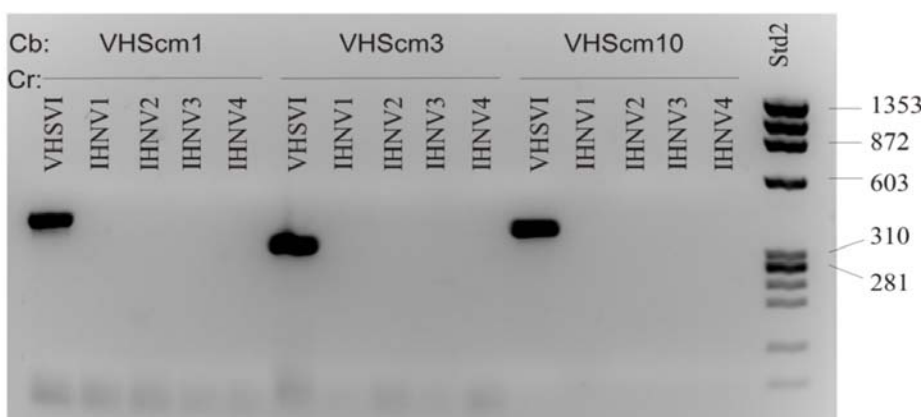


Figura 1.7: Evaluación de la especificidad de los cebadores de VHSV. Productos de amplificación obtenidos al aplicar RT-PCR con cada una de las 3 parejas de cebadores (Cb) para VHSV (*cm1*, *cm3* y *cm10*), utilizando como patrón el ARN viral extraído (mediante el método Trizol, LS-Reagent) de tapices celulares infectados con el virus VHSV (cepa FR07/71), o con cada una de las 4 cepas de referencia (Cr) del virus IHNV (1, 2, 3 y 4). Std2: Estándar de tamaños moleculares (*φX174* cortado con Hae III) cuyos valores se indican en pares de bases.

resultado se confirmó posteriormente por southern blot e hibridación con las sondas específicas de VHSV (resultados no mostrados).

Evaluación de la sensibilidad.- Como se muestra en la figura 1.8, se observaron diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad entre las 3 parejas de cebadores. Así, mientras con las parejas de cebadores *VHSV-cm1* y

VHSV-cm10 solo se consiguieron productos de amplificación a partir de la dilución más alta utilizada como patrón (1 ng), la pareja *VHSV-cm3* mostró el mayor nivel de sensibilidad al ser capaz de detectar hasta la dilución más baja de ARN (10 pg).

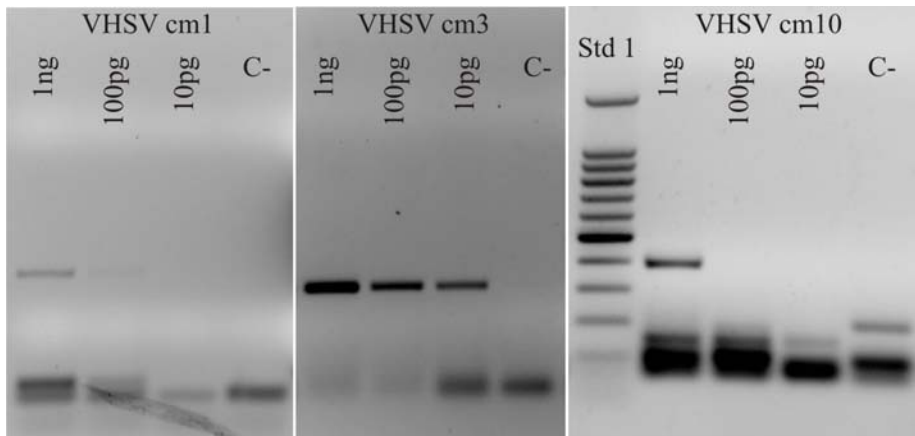


Figura 1.8: Productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR utilizando cada una de las 3 parejas de cebadores para VHSV (*cm1*, *cm3* y *cm10*) y como patrón cantidades ARN de 1 ng, 100 pg y 10 pg de ARN. C-: control negativo, constituido por ARN extraído del virus IPNV; Std1: Estándar de tamaños moleculares (*Bench Top 100bp DNA Ladder*, Promega) cuyos valores se indican en pares de bases.

Límite de detección.- Una vez seleccionada la pareja de cebadores que aportaba *a priori* una mayor sensibilidad, se llevó a cabo la determinación cuantitativa de un verdadero límite de detección. Así, como se muestra en la figura 1.9A, el límite de detección por RT-PCR, empleando la pareja de cebadores *VHSV-cm3*, fue de 10 fg. Este resultado se confirmó mediante Southern blot/HAN, comprobando además que la capacidad de detección se incrementaba en 1 lg, permitiendo la detección de 1 fg (Figura 1.9B).

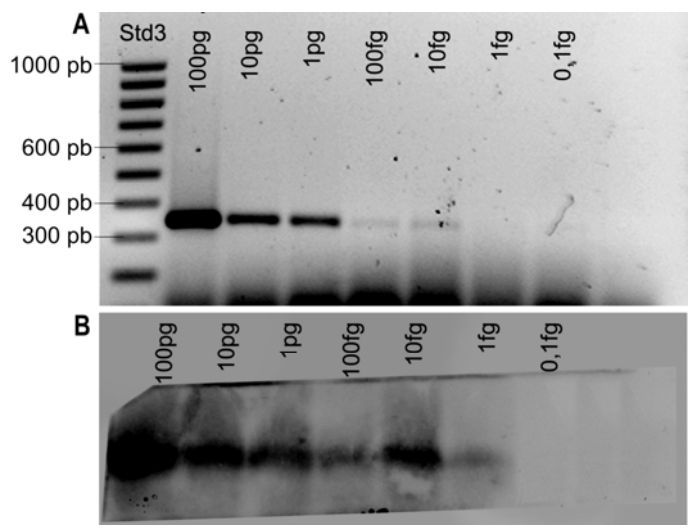


Figura 1.9: Evaluación del límite de detección por RT-PCR y RT-PCR+SB/HAN. **A.** Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR, utilizando la pareja de cebadores *VHS-cm3*, aplicado sobre diferentes cantidades de ARN (100, 10 y 1 pg; 100, 10, 1 y 0,1 fg) de la cepa FR07/71. Std3: Estándar de tamaños moleculares (*100bp DNA Ladder*, Genecraft) cuyos valores se indican en pares de bases. **B.** Southern blot e Hibridación utilizando una sonda específica para el producto de amplificación de *VHSV-cm3*.

La sensibilidad se incrementó aún más al aplicar nested-PCR al producto de RT-PCR, si bien los resultados obtenidos variaron en función del procedimiento utilizado. Así, el límite de detección se redujo en 2 logaritmos, hasta 0,1 fg, cuando se utilizó como patrón ADNc extraído del gel de agarosa (Figura 1.10B), mientras que la capacidad de detección se mantuvo igual que por southern blot (1 fg de ARN) cuando se utilizó el producto de RT-PCR directamente del vial de amplificación (figura 1.10A).

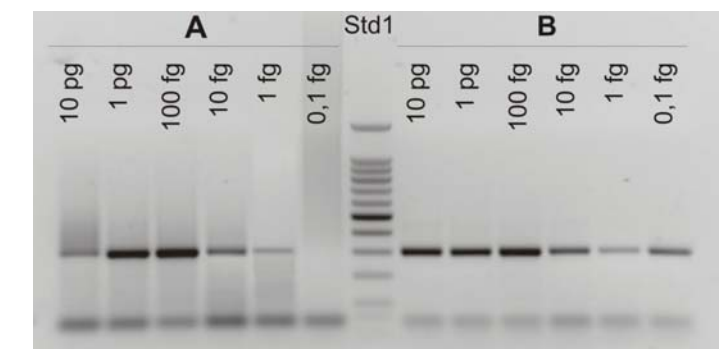


Figura 1.10: Límite de detección del ARN viral mediante RT-PCR/nested-PCR. Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación obtenidos con la pareja de cebadores *VHS-cm3 intro* (**A**) utilizando 10 μ l del producto de RT-PCR, (**B**) o utilizando ADNc extraído de un gel de agarosa. Std1: Estándar de tamaños moleculares (*Bench Top 100bp DNA Ladder*, Promega).

CINÉTICA DE DETECCIÓN

Con el fin de determinar el tiempo mínimo (p.i.) de detección de ARN viral en células infectadas con VHSV, se llevaron a cabo los experimentos de cinética cuyos resultados se muestran en la figura 1.11. Como se puede observar, entre las 4 y las 12 h p.i. se obtuvo una marcada graduación en el nivel de detección en términos de intensidad de la banda de amplificación. Entre las 8 y las 10 h se obtuvieron bandas marcadas y bien definidas con las cepas de referencia de los 4 genotipos. Con los genotipos I y III, el tiempo mínimo para la detección del virus fue de 6 h, aunque en este caso las bandas de amplificación fueron generalmente poco definidas y los resultados no siempre repetibles. Los resultados a las 4 h fueron muy poco reproducibles aunque ocasionalmente se obtuvieron bandas de amplificación. Es importante indicar que todos estos positivos fueron confirmados mediante Southern blot/HAN, técnica que además, permitió descubrir y confirmar hasta las bandas menos definidas.

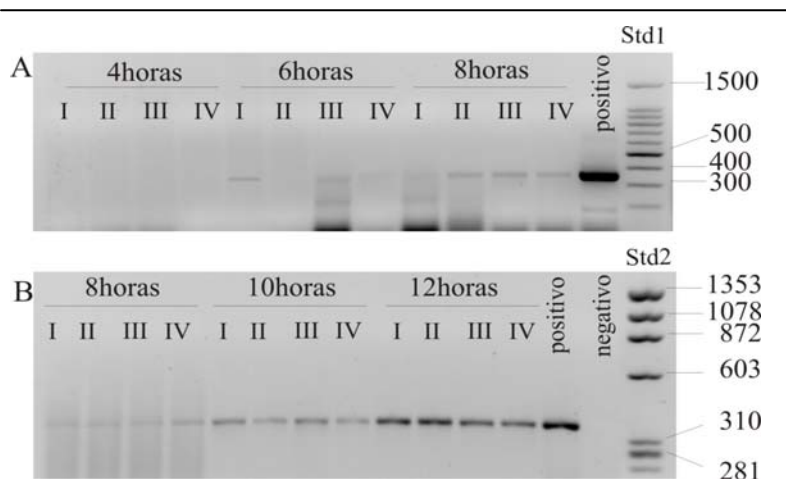


Figura 1.11: Cinética de detección de ARN viral extraído de células EPC infectadas con virus VHSV. En la figura se presentan los gels de agarosa mostrando los productos de amplificación obtenidos al aplicar RT-PCR, con la pareja de cebadores *VHS-cm3*, al ARN extraído de las células infectadas con cepas de referencia de los genotipos I, II, III y IV del VHSV, a las 4, 6 y 8 horas (A) y a las 8, 10 y 12 horas post-inoculación (B); Std1: Estándar de tamaños moleculares (*Bench Top 100bp DNA Ladder*, Promega). Std2: estándar de tamaños moleculares ϕ X174, cortado con *Hae III*.

DISCUSIÓN

Las enfermedades de origen viral son una de las causas más importantes de mortalidad en la acuicultura a nivel mundial, debido fundamentalmente a que en la actualidad no existe un método efectivo de tratamiento de las mismas; por ello, se hace imprescindible disponer de métodos de diagnóstico rápido y efectivos que permitan la pronta aplicación de medidas de control que eviten la diseminación de virus y la contaminación de lotes de peces y/o plantas de cultivo.

Por tratarse de un virus de declaración obligatoria, los métodos de diagnóstico aplicables para la detección del virus VHSV se han establecido normativamente (Directiva 93/53) en el seno de la Unión Europea. Esta normativa exige la detección del virus en cultivo celular, seguida de la identificación mediante técnicas inmunológicas. En la actualidad se emplean métodos serológicos estandarizados y algunos comerciales que, sin embargo, pueden presentar problemas de sensibilidad (Dixon y col., 1997).

Por ello, algunos autores opinan que es preferible la aplicación de métodos moleculares para el diagnóstico de este virus (Miller y col., 1998; Strømmen y Stone, 1998; Enzmann y col., 2000). Entre ellos, la técnica de RT-PCR es una de las más utilizadas. Aunque de reconocida eficacia, su utilización como técnica de diagnóstico para VHSV es controvertida (Hiney, 2000; Einer-Jensen y col., 2002; Winton y Einer-Jensen, 2002), fundamentalmente por dos motivos: En primer lugar, antes de su utilización es preciso optimizar todos los factores que pueden influir en su capacidad de detección o sensibilidad, y en segundo lugar debemos asegurar su especificidad y repetibilidad (Dopazo y Barja, 2002). La técnica de PCR permite, al menos de modo teórico, la detección de tan solo una molécula de genoma viral, lo que da un máximo de sensibilidad en la detección del virus, y hace posible la detección del virus en cultivos celulares infectados, mucho antes de que se detecte efecto citopático en los mismos, lo cual redundaría en rapidez (Bruchhof y col., 1995; Guillou y col., 1999). Por otro lado, el correcto diseño y selección de las parejas de cebadores debería asegurar la detección de cualquier cepa del virus, lo cual redundaría en su fiabilidad, además de evitar el desarrollo de falsos positivos con otros virus (asociado al concepto de especificidad). Además, la idoneidad de estas tecnologías permite su estandarización para alcanzar la máxima reproducibilidad (Dopazo y Barja, 2002)

Estas premisas, sensibilidad, especificidad, fiabilidad, reproducibilidad y rapidez, son la meta a alcanzar en el diseño de nuevas técnicas de diagnóstico,

así como en la puesta a punto de las ya conocidas. Por ello, el objetivo central de este capítulo ha sido optimizar todos los factores que pueden influir en la capacidad de detección de VHSV mediante RT-PCR in vitro.

El paso crítico por antonomasia en cualquier técnica molecular de diagnóstico y, por supuesto, en el caso de la PCR, es la extracción del ácido nucleico. Esto es así porque, para la detección del ácido nucleico viral, éste debe ser obtenido en cantidad y pureza apropiada para facilitar su amplificación enzimática (Dopazo y Barja, 2002). Un problema común relacionado con la aplicación de la PCR en un diagnóstico de rutina para VHSV es la presencia de inhibidores de la amplificación (Strømmer y Stone, 1998). La inhibición de la PCR se puede producir, además, por un exceso de ARN celular (mensajero y ribosómico) que enmascara los cebadores e impide su unión al ácido nucleico del virus. Algunos grupos han superado este problema introduciendo un paso de purificación del virus para desechar el exceso de material celular y otros inhibidores potenciales antes de la extracción del ácido nucleico (Yang y Xu 1993), aunque el riesgo de contaminación se incrementa al aumentar la manipulación de la muestra, además de reducir la eficacia en la detección debido a las pérdidas de material genómico inherentes a toda manipulación, sin descartar la ralentización que toda manipulación extra implica en el proceso de diagnóstico. Por ello, una de las primeras variables examinadas en el presente trabajo fue el método de extracción del ácido nucleico. Debemos destacar, no obstante que este ha sido, aunque profundo, un ensayo preliminar cuyo objetivo único era la selección del método de extracción que aportara una optimización de la detección del virus objeto de estudio. Queremos destacar, por otro lado, que nuestros resultados coinciden con los de un estudio mucho más amplio llevado a cabo por una parte de nuestro equipo, en el que se analizan todas las variables que afectan a la eficacia de la extracción de ácido nucleico (Olveira, 2006). En este caso, debemos destacar los resultados obtenidos con los métodos Trizol LS-Reagent (Invitrogen) y RNeasy MiniKit (Quiagen). El primero basado

en el método tradicional de extracción con fenol, además de proporcionar resultados satisfactorios, presenta la ventaja de resultar muy económico, aspecto de gran importancia en diagnóstico rutinario; aunque es un método relativamente laborioso y lento, reduce el tiempo de ejecución, respecto al método tradicional de proteinasa K/Fenol-cloroformo, el cual, no obstante aportó resultados satisfactorios. Por el contrario, cabe destacar la rapidez de los métodos basados en resinas de captación, como es el caso del kit RNeasy, aspecto que también es de especial trascendencia cuando el volumen de muestras es elevado, aunque por supuesto se trata de un método de mayor coste. Fue sorprendente, por no esperable, la poca reproductibilidad obtenida con el resto de kits de resinas ensayados que por supuesto, han sido descartados. Basándonos en nuestros resultados, tanto el Trizol como el kit RNeasy podrían ser utilizados indistintamente en el diagnóstico rutinario de VHSV. Sin embargo, en el caso de diagnóstico rutinario en número elevado apostamos por el método Trizol LS-Reagent debido a su bajo coste.

Si bien los ensayos de comparación de métodos de extracción de ácido nucleico que se presentan en este capítulo se realizaron con virus semipurificado, para asegurar una mayor pureza del ARN, la utilización de virus crudo en los ensayos de evaluación de los cebadores no presentó problemas claros de inhibición. La evaluación de 3 parejas de cebadores para la detección del virus VHSV a partir de cultivo celular infectado indicó que todas proporcionaban resultados satisfactorios en cuanto a su especificidad, si bien la pareja de cebadores *VHSV-cm3* fue la que proporcionó mejores resultados en cuanto a sensibilidad. Es interesante señalar que esta pareja de cebadores está localizada en el gen de la nucleoproteína, región del genoma de VHSV que, según algunos autores, presenta gran similitud con IHNV (Enzmann y Bruchhof, 1989) por lo que *a priori* podría dudarse de su especificidad. Sin embargo nuestros resultados han demostrado que esta pareja de cebadores es igualmente eficaz para la diferenciación entre los novirhabdovirus que las situadas en otras

regiones del genoma, principalmente en el gen G, región elegida por la mayoría de los grupos de investigación para el diagnóstico de VHSV (Bruchhof y col., 1995; Miller y col., 1998; Strømmen y Stone, 1998; Guillou y col., 1999); además de confirmar su capacidad para el diagnóstico de cualquier genotipo del virus VHSV.

La capacidad de detección del virus en cultivo celular, mediante la técnica de RT-PCR, a diferentes tiempos post-infección, parece no depender en gran medida del genotipo del virus, y está asegurada a las 8 horas post-infección; si bien es cierto que, para algunos genotipos fue posible la detección a las 6 h p.i., esta fue aleatoria y no del todo reproducible, lo que nos hace suponer que nos encontramos ante niveles que rondan el límite de detección. Comparando estos resultados con los de otros autores, se puede observar por ejemplo que con virus como IPNV se habla de tiempos mínimos de detección mediante RT-PCR de 10 h p.i., 6 h p.i. mediante HAN (Oliveira, 2006) o bien de 16 h mediante IF (Espinoza y Kuznar, 2002).

De este modo, a la alta sensibilidad debemos sumar la rapidez del método; el ARN total es extraído satisfactoriamente en menos de 1 hora (RNeasy, Qiagen), y la técnica de RT-PCR, amplificando ácido nucleico después de su paso en cultivo celular, permite el diagnóstico en 3 días lo que contrasta con el aislamiento del virus en cultivo celular que requiere al menos 20 días para dar un diagnóstico tanto negativo como positivo, y este tiempo se incrementa si se produce toxicidad o problemas de contaminaciones.

Aunque es difícil comparar los resultados entre diferentes métodos y diferentes laboratorios (Nerette y col., 2005), quizás este tipo de comparación cuantitativa sea la menos subjetiva para determinar el mejor método de diagnóstico por su fiabilidad, sensibilidad y especificidad.

El límite de detección es otro factor a tener en cuenta en la puesta a punto de la técnica de RT-PCR para la detección de cualquier virus. En este

sentido, los límites de detección obtenidos en nuestros análisis han, como mínimo, igualado los de otros autores. Así, nuestro resultado de 10 fg como mínimo detectable es similar a los resultados descritos para otros virus de interés en acuicultura como el virus de la necrosis pancreática infecciosa IPNV (Wang y col., 1997) el *gill-associated virus* GAV (Cowley y col., 2000) o el *yellow head virus* (YHV) (Wongteerasupaya y col., 1997). Aunque el Southern blot/HAN es una conocida herramienta de confirmación de la especificidad de la amplificación por PCR, creemos que esta es la primera vez en que se demuestra que su aplicación incrementa la sensibilidad de la PCR, bajando el nivel de detección a 1 fg, resultado equivalente al obtenido con la aplicación de la nested-PCR directamente sobre el producto de la primera amplificación por PCR. Esto no coincide con los resultados obtenidos por Dalla Valle y col. (2000) con *betanodavirus* quienes, usando una alícuota del producto de RT-PCR (no purificado), obtienen un incremento de la sensibilidad de al menos 2 logaritmos. No obstante, nosotros hemos alcanzado ese mismo resultado recurriendo a la purificación, previa a la nested, del producto de la primera PCR a partir del gel de agarosa.

Como conclusión podemos decir que la técnica de RT-PCR puesta a punto en el presente capítulo permite una detección específica, sensible y fiable de VHSV especialmente si se combina con Southern blot o nested-PCR, y asegurando la obtención de resultados en un corto periodo de tiempo. Además, la utilización de esta técnica para la detección del virus en cultivo celular aproxima el diagnóstico a las normativas europeas, confirmando, simultáneamente la viabilidad del virus detectado (una de las más frecuentes críticas al método de diagnóstico por PCR), evitando los largos periodos de incubación que se requerían con el simple aislamiento en cultivo celular.

CAPÍTULO 2:

**VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR PARA LA
DETECCIÓN DE VHSV EN TEJIDOS DE PECES *IN
VITRO* E *IN VIVO***

RESUMEN

En este capítulo se ha llevado a cabo la validación, *in vitro* e *in vivo*, del método de RT-PCR para diagnóstico del virus VHSV a partir de diferentes tejidos de peces infectados, incluyendo bazo / riñón y sangre.

Los ensayos *in vitro* demostraron que la técnica de RT-PCR aplicada al ARN total extraído de tejidos inoculados experimentalmente presentaba un límite de detección de 1×10^0 o $0,97 \times 10^3$ TCID₅₀/g (dependiendo de si la adsorción viral ha tenido lugar durante 1 o 24 horas, respectivamente). La confirmación de los resultados de RT-PCR, tanto mediante Southern blot como por nested-PCR, incrementaron la sensibilidad de la técnica de detección en 1 o 2 logaritmos, respectivamente.

Los resultados de los experimentos *in vivo* demostraron la superioridad, en términos de sensibilidad, del nested-PCR aplicado a muestras de sangre, ya que se obtuvo un 85% de positivos frente al 40% obtenido mediante RT-PCR y Southern blot y frente al 5% de positivos obtenidos mediante aislamiento en cultivo celular. El resultado de mayor trascendencia lo constituye el haber diseñado y validado un método de diagnóstico incruento, que permitió la selección de reproductores sanos sin necesidad del sacrificio del individuo.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura representa una importante industria en Europa, y la creciente aparición de nuevos aislados virales que afectan a los peces hace imprescindible la puesta a punto de procedimientos de diagnóstico rápidos que permitan la identificación de los diversos tipos virales con el fin de reducir las pérdidas económicas y prevenir la dispersión de los patógenos.

El virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) es el agente causante de graves pérdidas económicas en la acuicultura europea, especialmente de tipo continental (Wizigmann y col., 1980; Castric y col., 1992), aunque también ha sido el responsable de epizootias en cultivos de rodaballo y lenguado (Schlotfeldt y col., 1991; Ross y col., 1994; Takano y col., 2000). Por ello, se hace transcendental el control de las infecciones provocadas por este patógeno viral.

Los supervivientes de una infección con síntomas clínicos pueden permanecer infectados y convertirse en reservorios asintomáticos del virus. Portadores asintomáticos de este tipo se han detectado tanto en peces cultivados como salvajes (OIE, 2003). En este estado el virus es mucho más difícil de detectar por los procedimientos convencionales, que en los peces enfermos. Los métodos de detección de VHSV aprobados por la Organización Internacional de Epizootias (OIE, 2003) están basados en el aislamiento del virus en cultivo celular y su identificación mediante técnicas serológicas; este es un procedimiento relativamente laborioso y lento, que exige el sacrificio de un número variable de peces para la obtención de la muestra de tejidos. Además, este procedimiento tiene una sensibilidad baja y especificidad relativamente limitada (Winton y Einer-Jensen, 2002) ya que la propagación del virus, puede

fallar por razones de baja cantidad de partículas infectivas, inactivación del virus o toxicidad del material para el cultivo celular, entre otros motivos.

La introducción de la técnica de RT-PCR en el diagnóstico de VHSV (Bruchhof y col., 1995; Strømmen & Stone, 1998; Guillou y col., 1999) ha solventado la mayoría de los problemas descritos, dado que se trata de un método de diagnóstico rápido, altamente sensible y específico. Sin embargo, los protocolos desarrollados hasta el momento se basan en procedimientos de muestreo cruento; lo que en ciertos casos, como en el control de lotes de reproductores, implica una carga económica difícil de asumir por los piscicultores, convirtiéndose incluso en una herramienta inútil y absurda cuando se trata de seleccionar individuos libres del virus para su uso en cadenas de producción con reducción de riesgos patológicos.

En los últimos años se ha incrementado el estudio de métodos de análisis incruento que permiten determinar la presencia o ausencia de virus en peces sin necesidad de matar a los individuos y por lo tanto son de gran utilidad para el control de los lotes de reproductores en plantas comerciales, o bien especies de vida libre que se encuentran en peligro de extinción. Así, se han descrito protocolos que permiten el aislamiento de virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) a partir de muestras de sangre, mucus, branquias, piel y recto de ejemplares de salmón atlántico (*Salmo salar*) infectados experimentalmente (Munro y col., 2004). También se ha demostrado la idoneidad de las muestras de sangre para la detección y/o aislamiento de portadores asintomáticos de fletán atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Gahlawat y col., 2004) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Cutrín y col., 2005). Otros autores han notificado el aislamiento del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) a partir de muestras de fluido ovárico de peces portadores (Mulcahy y Batts, 1987), y del virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) a partir del mucus de las branquias de peces asintomáticos (Griffiths y Melville, 2000).

Por otro lado, la combinación de estas dos técnicas, análisis incruento mediante muestras de sangre y diagnóstico por RT-PCR, ha resultado muy efectiva para virus como ISAV, habiendo demostrado que el número de positivos se incrementa considerablemente (Giray y col., 2005) en comparación con los resultados de cultivo celular e IFAT (Opitz y col., 2000; Snow y col., 2003).

OBJETIVO

En el presente capítulo el objetivo principal ha sido desarrollar y optimizar un método específico y sensible para la detección de VHSV en muestras de sangre mediante RT-PCR y comparar su eficacia con la detección viral por RT-PCR aplicada directamente a los tejidos de peces, así como con los métodos tradicionales de aislamiento viral en cultivo celular.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS VIRALES Y PROPAGACIÓN EN CULTIVOS CELULARES

Para este estudio se utilizó, como referencia, la cepa F1 de VHSV, aislada originalmente a partir de trucha arcoiris (Jensen, 1965), que se propagó en frascos de 25 cm² de la línea celular EPC (Figura 2.1). Para ello, tras vaciar el medio de los frascos se inoculó 100 µl de virus a la concentración necesaria para obtener una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 - 0,01 virus por célula. Después de un período de adsorción de 45 min a temperatura ambiente y en agitación, se eliminó el resto de inóculo y el tapiz se cubrió con medio mínimo

esencial de Eagle (EMEM). La incubación se realizó a 15 °C hasta la visualización de efecto citopático (ECP) (Figura 2.1), momento en el que se procedió a recoger la suspensión viral (*virus crudo*). Una alícuota de esta suspensión se sometió a titulación viral tal y como se describe en el capítulo 1.

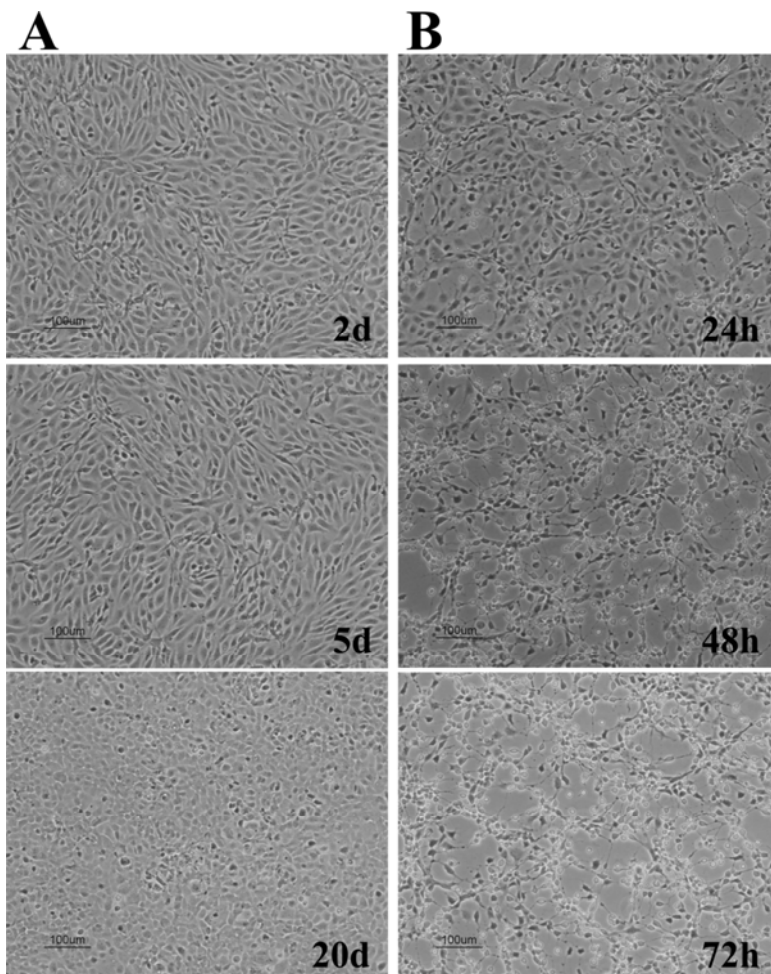


Figura 2.1: Visualización de células EPC con 2, 5 y 20 días de crecimiento (A), y de los tapices de la misma línea celular mostrando efecto citopático a las 24, 48 y 72 horas post-infección (B).

Para el reaslamiento viral tras la inoculación experimental en peces, se usaron, además de la línea EPC, las líneas celulares RTG-2 (Gónada de trucha arcoiris; Wolf y Quimby, 1962) y CHSE-214 (Embrión de salmón Chinook; Nims y col., 1970).

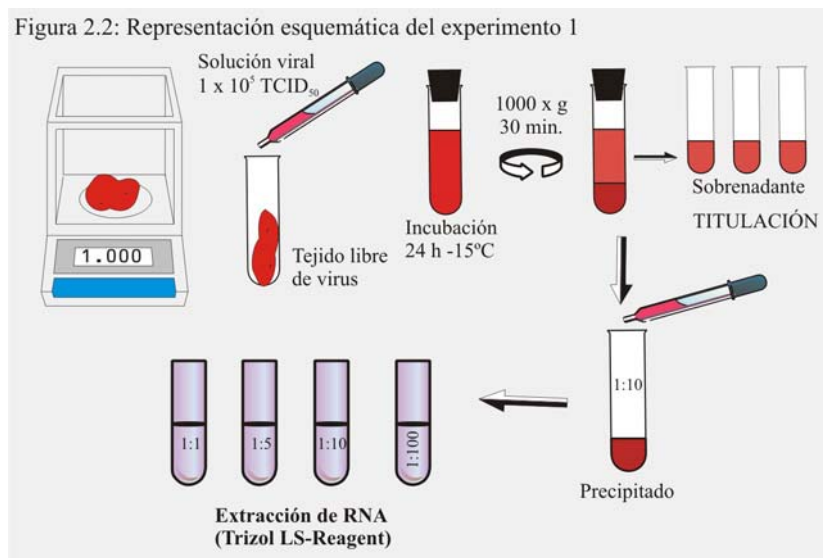
ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE LA RT-PCR *IN VITRO*

Con el fin de determinar la capacidad de detección de la RT-PCR en muestras de tejido, se diseñaron dos experimentos para los que se utilizó una suspensión viral con un título de 1×10^5 TCID₅₀ × ml⁻¹.

Experimento 1: Para este ensayo, cuya representación esquemática se puede observar en la figura 2.2, se utilizó 1 g de tejido (mezcla de bazo y riñón) procedente de un pez no infectado (confirmado por RT-PCR); a este se la añadió 1 ml de la suspensión viral original y se homogenizó utilizando un OMNI 2000. El homogenizado resultante se incubó durante 24 horas a 15 °C para permitir la adsorción y penetración del virus. Una vez transcurrido ese tiempo, la suspensión se centrifugó a $1.000 \times g$ durante 30 minutos, y el precipitado se conservó a -20 °C hasta su uso. Para determinar la cantidad de virus no adsorbido por las células del tejido, se procedió a la titulación de tres alícuotas del sobrenadante tal y como se describió en el capítulo anterior. La carga viral por gramo de tejido se determinó calculando la diferencia entre el virus inicialmente inoculado (1×10^5 TCID₅₀) y la media del título de las tres alícuotas de virus no adsorbido (3×10^3 TCID₅₀), lo que nos proporcionó un valor de virus adsorbido de $0,97 \times 10^5$ TCID₅₀ × g⁻¹.

Una vez conocida la carga viral del tejido, este se diluyó 1:10 en EMEM con antibiótico y se mezcló con distintos volúmenes de

una suspensión de tejido no infectado a relaciones de dilución de 1:1, 1:5, 1:10 y 1:100. De esta forma se prepararon las siguientes

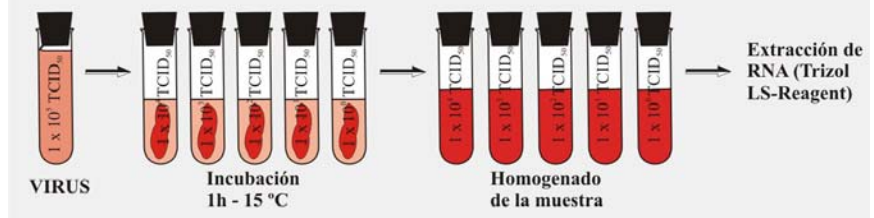


concentraciones $4,85 \times 10^3$, $1,93 \times 10^3$, $0,97 \times 10^3$ y $0,97 \times 10^2$ $\text{TCID}_{50} \times \text{ml}^{-1}$ que equivalen a $4,85 \times 10^4$, $1,93 \times 10^4$, $0,97 \times 10^4$ y $0,97 \times 10^3$ $\text{TCID}_{50} \times \text{g}^{-1}$ de tejido, respectivamente. A continuación se procedió a la extracción de ARN total, a partir de 300 μl de cada dilución del tejido homogenado, usando Trizol LS Reagent, según descrito por el fabricante, y tal y como se describe en el capítulo 1. El ARN resultante se resuspendió en 50 μl de H_2O -LN.

Experimento 2: Paralelamente se llevó a cabo un segundo experimento, siguiendo el protocolo descrito por Mikalsen y col. (2001) para otro virus de peces, el ISAV. Para ello se utilizó una alícuota de la misma suspensión de virus original (título 1×10^5 $\text{TCID}_{50} \times \text{ml}^{-1}$) a partir de la que se prepararon diluciones decimales seriadas, (en tampón Earle's suplementado con

penicilina 1.000 U.I./ ml, estreptomycin 1.000 $\mu\text{g/ml}$ y fungizona 10 $\mu\text{g/ml}$), comprendiendo un rango entre 10^5 y 10^0 $\text{TCID}_{50} \times \text{ml}^{-1}$. Cada una de las diluciones se mezcló, en una proporción 1:1, con tejido (bazo y riñón) procedente de peces no infectados y la mezcla se incubó durante 1 hora a 15 °C (Figura 2.3). Finalizado el periodo de incubación, se procedió al procesado de las muestras, siguiendo el protocolo descrito por Ledo y col. (1987).

Figura 2.3: Representación esquemática del experimento 2



Brevemente, la mezcla virus-tejidos se trituró hasta alcanzar una mezcla homogénea, se centrifugó a $2.000 \times g$ durante 20 min y el sobrenadante se incubó durante un mínimo de 4 horas a temperatura ambiente para permitir la actuación del antibiótico. Finalmente se extrajo el ácido nucleico usando Trizol LS-Reagent (Invitrogen) como se describió anteriormente.

En ambos experimentos, el ARN obtenido se sometió a RT-PCR, nested-PCR y Southern blot / hibridación de ácidos nucleicos (SB/HAN) siguiendo los protocolos descritos en el capítulo 1.

Para poder comparar los límites de detección mediante RT-PCR obtenidos en este ensayo con los obtenidos en el capítulo anterior utilizando virus parcialmente purificado, se utilizó la siguiente fórmula: $\gamma = n/N \times GL \times NcMw$; donde γ es la cantidad en gramos de ARN, correspondiente a un título viral conocido, n es el número

de moléculas de ARN equivalente al valor de TCID₅₀ (asumimos que 1 TCID₅₀ corresponde a 1 partícula viral), N es el número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$), GL es la longitud del genoma de VHSV (estimado como 11.000 nucleótidos) y NcMw es el peso molecular medio de un nucleótido de ARN monocatenal (estimado en 340,5 Da).

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DETECCIÓN *IN VIVO*

Para este ensayo se emplearon 180 ejemplares de trucha común (*Salmo trutta fario*) de unos 12 - 15 cm, proporcionadas por el *Servicio de protección da Natureza* de la Consellería de Medio Ambiente, Xunta de Galicia. Los peces se mantuvieron en las instalaciones del Instituto de Acuicultura durante un periodo de aclimatación de 30 días, en tanques de 25 l con aireación y temperatura de 10 °C. Durante este periodo se tomaron muestras de 10 individuos que se procesaron para el diagnóstico virológico y descartar la presencia del virus VHSV, IHNV e IPNV.

La infección experimental se realizó mediante inyección intraperitoneal. Para ello se inocularon 160 peces con un volumen de 0,1 ml de suspensión viral con un título de 1×10^5 TCID₅₀, como controles negativos se emplearon 10 peces inoculados con la misma cantidad (0,1 ml) del sobrenadante de un cultivo de células EPC no infectado.

A los 10 días post-infección se tomaron muestras heparinizadas de sangre de 40 peces (200 - 500 µl), mediante punción de la vena caudal de los individuos previamente anestesiados. A continuación se sacrificaron los peces y se procedió a la extracción, en condiciones asépticas y de forma individualizada, de bazo y riñón. Cada muestra se identificó con un código similar que permitiese relacionar sangre y tejidos obtenidos del mismo individuo. Las muestras se

procesaron para la extracción del ácido nucleico tal y como se describe a continuación:

Extracción de ARN viral a partir de muestras de sangre: Para la extracción del ARN de las muestras de sangre se utilizó el kit comercial *QIAamp[®] RNA blood Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones como se describe a continuación. Cada muestra de sangre heparinizada (200 μ l) se mezcló con 1 ml de tampón EL y se incubó durante 15 min en hielo. A continuación se centrifugó durante 10 min a $400 \times g$ y a $4^\circ C$, se desechó el sobrenadante y se añadió nuevo tampón EL, repitiendo la centrifugación. A continuación se añadió el tampón RLT suplementado con β -mercaptoetanol; la mezcla resultante se transfirió a la columna QIAshredder y se centrifugó 2 min a $14.000 \times g$ y a $4^\circ C$. El precipitado resultante se mezcló con 350 μ l de etanol al 70% y se transfirió a una columna QIAamp para su centrifugación durante 30 seg a $8.000 \times g$ y a $4^\circ C$. Seguidamente, el filtro de la columna se lavó una vez con tampón RW1 (30 seg, $8.000 \times g$, $4^\circ C$) y dos veces con tampón RPE ($8.000 \times g$ durante 30 seg y 3 min respectivamente). El ARN resultante se resuspendió en 50 μ l de H_2O libre de nucleasas.

Extracción de ARN viral a partir de muestras de tejido: Las muestras de tejido se procesaron siguiendo el protocolo descrito por Ledo y col. (1987), procediéndose a la extracción del ARN con Trizol LS-Reagent (Invitrogen) como se describió en el capítulo 1.

El ARN obtenido de ambos tipos de muestras se sometió a RT-PCR y los resultados se confirmaron mediante SB / HAN, o mediante nested-PCR, según se ha descrito en el capítulo 1.

El mismo procedimiento se repitió a los días 20, 30 y 40 post- infección usando en cada caso 40 peces.

Por otra parte las muestras de tejidos (bazo y riñón de cada pez) se procesaron para su inoculación en cultivo celular siguiendo las indicaciones de la Comisión Europea 2001/183/EC (exceptuando los tiempos e incluyendo las células CHSE-214 que no se recomiendan para el aislamiento de VHSV). Las muestras se inocularon por triplicado en monocapas semiconfluentes de células EPC, RTG-2 y CHSE-214 en placas de 24 pocillos y se incubaron a 15 °C. Los cultivos celulares se examinaron diariamente hasta detectar el desarrollo de ECP; después de 20 días las muestras positivas y negativas se sometieron a un segundo pase o pase en blanco que se finalizó pasados los 15 días de incubación.

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA DETECCIÓN POR RT-PCR *IN VITRO*

Los resultados obtenidos permitieron establecer un límite de detección en tejidos infectados que osciló entre $0,97 \times 10^3$ y 1×10^0 TCID₅₀ × g⁻¹ dependiendo del experimento. Así cuando el tejido se incubó durante 24 horas con la suspensión viral se visualizó producto de amplificación partiendo de una carga viral de $0,97 \times 10^3$ TCID₅₀ × g⁻¹ (Figura 2.4). Este valor corresponde a un total de 29 TCID₅₀ por 50 µl de ARN extraído (considerando que 10^3 TCID₅₀ × g⁻¹ equivalen a 10^2 TCID₅₀ × ml⁻¹, y que se utilizaron 300 µl de suspensión de tejido para la extracción del ARN). Además, teniendo en cuenta que de la suspensión final de ARN (50 µl) se emplearon únicamente 5 µl como patrón para el RT-PCR, el límite de detección absoluto se estableció en

aproximadamente 3 TCID₅₀, que se corresponden con 18,7 ag de ARN (Tabla 2.1).

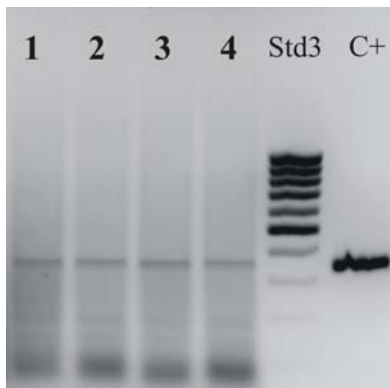


Figura 2.4: Límite de detección en tejidos correspondiente a la absorción del virus durante 24 horas. Las calles se corresponden con los siguientes títulos virales 1, $4,85 \times 10^4$ TCID₅₀; 2, $1,93 \times 10^4$ TCID₅₀; 3, $0,97 \times 10^4$ TCID₅₀ y 4, $0,97 \times 10^3$ TCID₅₀ por cada gramo de tejido. Std3: Estándar de tamaños moleculares (100bp DNA Ladder, Genecraft). C+ control positivo.

Tabla 2.1: Límite de detección de ARN viral extraído a partir de tejido (en comparación con los resultados obtenidos en el capítulo anterior con ARN de virus purificado).

Muestra	Método utilizado	Límite de detección	Equivalencia (2)
ARN viral de tejidos (1)	RT-PCR (24 horas)	3 TCID ₅₀	18,7 ag
	RT-PCR (1 hora)	0,02 TCID ₅₀	0,124 ag
ARN de virus purificado (*)	RT-PCR	10 fg	$1,6 \times 10^3$ TCID ₅₀
	RT-PCR+Southern (3)	1 fg	$1,6 \times 10^2$ TCID ₅₀
	RT-PCR+Nested (4)	1 fg	$1,6 \times 10^2$ TCID ₅₀
	RT-PCR+Nested (5)	0,1 fg	$1,6 \times 10^1$ TCID ₅₀

(1): ARN extraído a partir de tejidos incubados con VHSV (24 horas de absorción y 1 hora) detectado por RT-PCR. (2): Datos que corresponden a la equivalencia (considerando que 1 partícula viral = 1 TCID₅₀) calculado según la fórmula $\gamma = n/N \times GL \times NcMw$ donde γ es la cantidad en gramos de ARN correspondiente a un título viral conocido, n es el número de moléculas de ARN equivalente al valor de TCID₅₀, N es el número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$), GL es la longitud del genoma de VHSV (11000 nucleótidos) y NcMw es el peso molecular medio de un nucleótido de ARN monocatenal (340,5 Da). (*) Resultados obtenidos en el capítulo 1. (3): RT-PCR seguido de Southern Blot. (4): RT-PCR seguido de nested-PCR con el producto de PCR. (5): RT-PCR seguido de nested-PCR con el producto de RT-PCR purificado.

En el experimento 2, realizado incubando los tejidos con las diferentes diluciones de la suspensión viral durante 1 hora (Figura 2.5) el límite de detección bajó a $0,2 \times 10^0$ TCID₅₀ por cada 50 μ l de ARN extraído. (Teniendo en cuenta que la dilución original era 1:1 (peso: volumen), por lo que un gramo de tejido se correspondería a un volumen final aproximado de 1,5 ml de suspensión, del que como en el caso anterior se utilizaron 300 μ l para la extracción del ARN); con ello, el límite de detección absoluto en los 5 μ l utilizados para la RT-PCR se establece en 0,02 TCID₅₀ que equivale a 0,124 ag (Tabla 2.1).

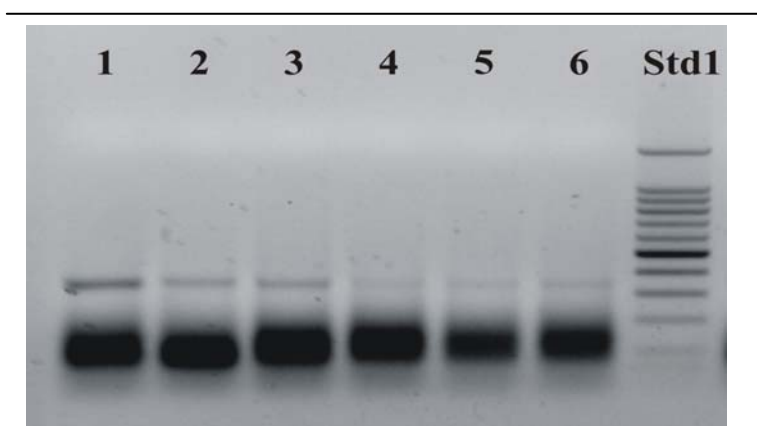


Figura 2.5: Límite de detección en tejidos correspondiente a la absorción del virus durante 1 horas. Las líneas 1 a 6 se corresponden con los títulos de virus de 10^5 TCID₅₀ hasta 10^0 TCID₅₀. Std1: Estándar de tamaños moleculares (*Bench Top 100bp DNA Ladder*, Promega).

DETECCIÓN DE VHSV EN PECES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Los peces inoculados no mostraron signos externos de enfermedad ni mortandad durante los 40 días que duró el experimento. Además, el análisis “*de visu*” de todos los peces examinados indicó ausencia de síntomas internos que pudieran revelar la presencia de patología viral.

Como se muestra en la tabla 2.2, el 80% de las muestras correspondientes a cada uno de los peces sacrificados a los 10 días p.i. reveló la presencia de VHSV mediante RT-PCR usando el ácido nucleico procedente de muestras de sangre, y un 60% de positivos usando el ARN de tejidos (bazo y riñón). Este porcentaje subió al 100% cuando se utilizó nested-PCR. Después de 20 días p.i. el porcentaje de positivos descendió hasta el 40% a partir de sangre y el 10% en tejidos (Figura 2.6), subiendo al 85 % con nested-PCR (Figura 2.7). Transcurridos 30 días p.i., solo el 10% de las muestras de sangre resultaron positivas mientras que en ninguna de las muestras de tejidos se pudo detectar la presencia de virus. En los peces sacrificados a los 40 días p.i. no se detectó virus en ninguna de las muestras testadas. Por lo tanto, para comparar los resultados obtenidos usando muestras de tejidos y sangre se usaron las muestras tomadas el día 20 p.i.

Tabla 2.2: Detección de VHSV en peces infectados experimentalmente.

		Detección de VHSV											
		10 días			20 días			30 días			40 días		
		<i>Tejido</i>		<i>Sangre</i>		<i>Tejido</i>		<i>Sangre</i>		<i>Tejido</i>		<i>Sangre</i>	
		RT-PCR	RT-PCR	Nested PCR ^a	RT-PCR	RT-PCR	Nested PCR ^a	RT-PCR	RT-PCR	Nested PCR ^a	RT-PCR	RT-PCR	Nested PCR ^a
A		24	32	40	4	16	34	0	4	16	0	0	0
B		60	80	100	10	40	85	0	10	40	0	0	0

A: Número de individuos que resultaron positivos para VHSV. **B:** Porcentaje de positivos de un total de 40 peces en cada ensayo. ^a, Nested-PCR usando 10 µl de producto purificado de RT-PCR.

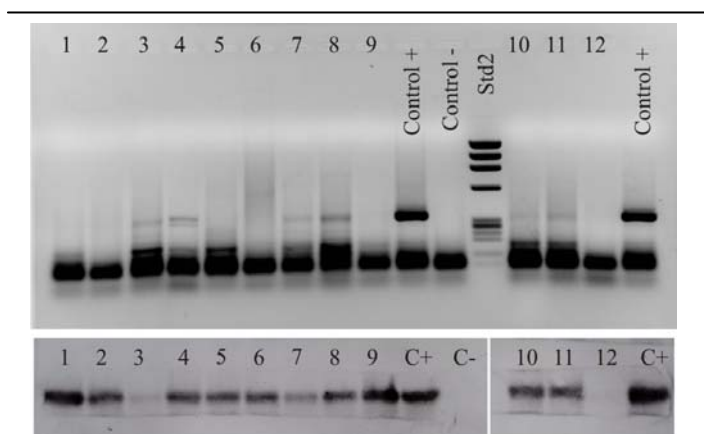


Figura 2.6: Detección mediante RT-PCR de VHSV-F1 en peces infectados experimentalmente transcurridos 20 días de la inoculación. La foto superior representa el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y la inferior la confirmación mediante southern blot, hibridación con la sonda específica para *VHSV-cm3*. Las calles se corresponden con el número de los peces analizados de un total de 40, mediante la técnica de RT-PCR. C+ control positivo. C- control negativo. Std2: Estándar de tamaños moleculares (ϕ X174 cortado con Hae III).

En la tabla 2.3 se muestra una comparativa de resultados de detección del virus en peces asintomáticos (a los 20 días p.i.), empleando distintas técnicas de diagnóstico. Como se observó, el máximo nivel de detección, en términos de porcentajes de positivos respecto al total de peces inoculados, fue del 85% empleando nested-PCR aplicado sobre productos purificados de RT-PCR, en muestras de sangre, muy por encima del 40% (correspondiente a la confirmación de 16 individuos como infectados por el virus) obtenido cuando el análisis de este tipo de muestras se realizó con RT-PCR simple, resultado que no varió tras la aplicación de southern blot. Sin embargo, es necesario destacar que, cuando el producto de RT-PCR se sometió directamente (sin purificación previa) a una reacción de nested-PCR, el porcentaje de positivos se incrementó hasta el 60% (24 peces).

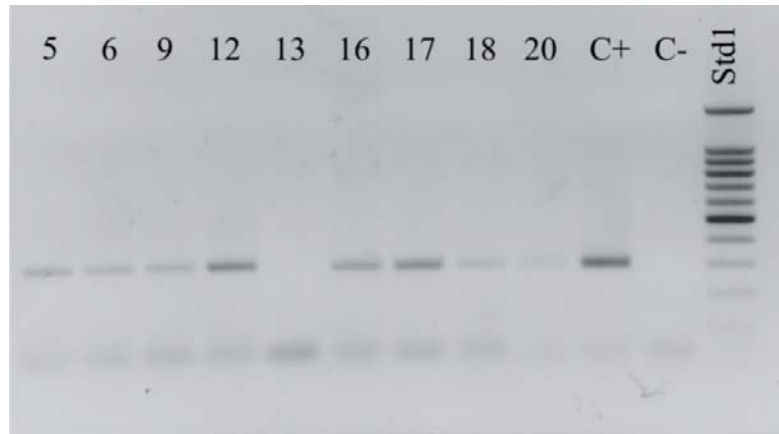


Figura 2.7: Detección de VHSV-F1 en peces infectados experimentalmente transcurridos 20 días de la inoculación. Las calles se corresponden con el número de los peces analizados de un total de 40 mediante la técnica de nested-PCR a partir de 10 μ l del producto de PCR purificado de las muestras que habían resultado negativas en la RT-PCR. C+ control positivo. C- control negativo. Std1: Estándar de tamaños moleculares (*Bench Top 100bp DNA Ladder*, Promega).

Los niveles de detección mediante PCR (en cualquiera de sus variantes) fueron claramente superadas cuando se aplicaron en sangre, en comparación con los resultados obtenidos cuando se aplicó sobre procesados de órganos. Así, el análisis de tejidos nos proporcionó un 20% de positivos en las mejores condiciones de ensayo, es decir usando nested-PCR sobre ADNc purificado de RT-PCR, cayendo hasta la mitad con RT-PCR simple.

Los resultados de aislamiento en cultivo celular fueron dramáticamente inferiores. Así, solo 1 de las muestras desarrolló efecto citopático (ECP) en las células utilizadas (EPC, RTG-2 y CHSE-214) después de 15-20 días en un primer pase y una segunda muestra necesitó de un segundo pase para producir ECP, lo que significa un 5% de los peces inoculados. La identidad de ambos aislados se confirmó mediante RT-PCR.

Tabla 2.3: Detección de VHSV por distintos métodos, a partir de muestras del día 20 p.i.

	Método de análisis						
	Cultivo celular	RT-PCR		Southern Blot ^b		Nested PCR ^c	
		Sangre	Tejidos	Sangre	Tejidos	Sangre	Tejidos
Nº de positivos	2	16	4	16	5	24 ^d /34 ^e	5/8
% positivos ^a	5	40	10	40	12,5	60/85	12,5/20

^a, de un total de 40 peces analizados. ^b, RT-PCR confirmado mediante Southern Blot. ^c, RT-PCR seguido de nested-PCR. ^d, Nested-PCR usando 10 µl de producto de RT-PCR. ^e, Nested-PCR usando 5 µl de producto purificado de RT-PCR.

DISCUSIÓN

En los últimos años la PCR y la RT-PCR se han consolidado como herramientas de gran utilidad para la detección y diagnóstico del virus VHSV (Arakawa y col., 1990; Bruchhof y col., 1995; Miller y col., 1998; Winton y Einer-Jensen, 2002) con la consiguiente mejora en cuanto a rapidez, sensibilidad y precisión en comparación con los métodos tradicionales. Si además se añaden las ventajas de realizar un diagnóstico incruento, en el cual evitamos el sacrificio del animal, pondremos a disposición del sector acuícola una herramienta de diagnóstico muy apropiada para la selección de reproductores.

En este capítulo se describe la puesta a punto y evaluación de un protocolo incruento, empleando muestras de sangre, para la detección de VHSV en peces mediante RT-PCR y nested-PCR.

En el capítulo anterior se estableció el límite de detección de la técnica de RT-PCR *in vitro* en 10 fg de ARN ($1,6 \times 10^3$ genomas virales). Este dato es muy similar a los valores de límite de detección descritos para otros virus de interés en acuicultura, como el IPNV (virus de la necrosis pancreática infecciosa), el YHV (*yellow head virus*) o el GAV (*gill-associated virus*) (Wang y col., 1997; Wongteerasupaya y col., 1997; Cowley y col., 2000). Sin embargo, cuando se llevaron a cabo ensayos para determinar el límite de detección de la RT-PCR en tejidos nos encontramos con capacidades de detección considerablemente mejores, entre 3 y 0,02 TCID₅₀ (correspondiente a 18,7 y 0,124 ag, respectivamente). Estos límites de detección son muy inferiores a los valores de 10^6 o 10^7 PFU/mg de tejido descritos por Strømme y Stone, (1998) usando RT-PCR e incluso mejoran el límite de detección obtenido por estos autores utilizando seminested PCR (10^0 - 10^2 PFU/mg) (esta comparación se llevó a cabo teniendo en cuenta el factor de conversión de 1,44 para transformar TCID₅₀ en PFU, establecido por Dulbecco y Ginsberg, 1988). En cuanto a la diferencia encontrada en los dos experimentos realizados, probablemente se deba a los diferentes tiempos de incubación de las muestras. En este sentido, es poco probable que 1 hora sea tiempo suficiente para asegurar la adsorción de todas las partículas virales a las células del tejido de modo que el ARN detectado se correspondería fundamentalmente con virus extracelular. Esta observación serviría para explicar límites de detección tan bajos como 10^0 TCID₅₀ \times g⁻¹ (0,02 TCID₅₀ en los 5 μ l empleados para la RT-PCR). Sin embargo, tras 24 horas de incubación la mayoría de las partículas virales presentes en la suspensión inicial (1×10^5 TCID₅₀ \times ml⁻¹) han infectado las células como demuestra el resultado de la titulación del sobrenadante tras este periodo ($3,1 \times 10^3$ TCID₅₀ \times ml⁻¹ de virus no adsorbido). Así, el límite de detección establecido en este experimento ($0,97 \times 10^3$ TCID₅₀ \times g⁻¹), aunque más alto que el establecido por Mikalsen y col. (2001) para el ISAV, creemos que se aproxima mucho más a la capacidad real de detección de la RT-PCR en una infección natural. Por lo tanto este resultado aconseja que para calcular el límite de detección por PCR en un diseño

experimental de este tipo, es necesario considerar tiempos de incubación que simulen lo mejor posible las condiciones naturales.

La transformación de los límites de detección obtenidos en los tejidos infectados (expresados en TCID₅₀) en cantidades de ARN (asumiendo que un TCID₅₀ equivale a una partícula viral) nos proporcionó unos valores sospechosamente bajos. Así, estos límites se establecían en 18,7 o 0,124 ag (incubación de 24 y 1 hora respectivamente), muy inferiores a los obtenidos utilizando el ARN purificado (10 fg, resultados presentados en el capítulo 1). Ante una diferencia tan grande, decidimos aplicar la fórmula utilizada en el cálculo anterior a la suspensión viral utilizada ($1,7 \times 10^8$ TCID₅₀/10 ml) para obtener el ARN del virus purificado y, teniendo en cuenta las diluciones realizadas a partir del ARN extraído (168 ng/μl), establecer el límite de detección. Estos cálculos nos proporcionaron un resultado de 1,24 ag, aproximadamente unas 8.000 veces menos que el límite de detección realmente observado (10 fg). Este tipo de cálculo, aplicado a los resultados obtenidos en otros virus de ARN monocatenal como el ISAV (Devold y col., 2000), nos proporcionó una relación similar: el valor calculado resultó 5.500 veces menor que el observado. Estos resultados indican que la asunción de que 1 TCID₅₀ equivale a una partícula viral claramente infraestima la concentración real de virus en la suspensión. Podría argumentarse que la infraestima se deba al método de titulación empleado (TCID₅₀) y que habría sido más apropiado titular el virus mediante el método de unidades formadoras de placa (PFU), que determinaría con más fiabilidad el número de partículas infectivas. Sin embargo, dado que se reconoce que 1 TCID₅₀ equivale aproximadamente a 1,44 PFU (Dulbeco y Ginsberg, 1988), los valores de titulación obtenidos por ambos métodos no difieren demasiado. Por otro lado, aún aceptando la infraestima del método, que no detectaría partículas defectivas o variantes no infectivas (Devold y col., 2000; Villanueva y col., 2000), que sí aportarían su genoma y podrían ser detectadas

por RT-PCR, la diferencia observada es tan grande que probablemente existen otros factores que contribuyen a esa divergencia.

La utilización de las técnicas de RT-PCR y nested-PCR para el diagnóstico de VHSV en muestras de sangre, obtenidas de peces infectados experimentalmente, han demostrado que la capacidad de detección de este tipo de tecnología es claramente superior a la del aislamiento en cultivo celular. La sensibilidad de las dos técnicas en muestras de tejidos, aunque inferior a la mostrada en sangre, continuó siendo superior a la del aislamiento viral. Este resultado coincide con los obtenidos por Miller y col. (1998) usando RT-PCR seguido de seminested PCR aplicado directamente a muestras de tejido, quienes demuestran que este procedimiento es mucho más sensible que los métodos virológicos convencionales.

Sin embargo, debemos remarcar que en algunos casos se podía apreciar un cierto número de bandas inespecíficas en los geles de agarosa tras la amplificación por RT-PCR de muestras de tejido, haciendo necesario el uso de hibridación mediante Southern blot para confirmar los resultados positivos, lo que permitió además incrementar la sensibilidad de detección. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por otros autores para ISAV que mantienen que el uso de Southern blot no incrementa el número de positivos detectados por RT-PCR en muestras de tejido, aunque sí confirma la especificidad de la PCR (McBeath y col., 2000).

Una de las críticas más importantes planteadas por numerosos investigadores con respecto al diagnóstico de infecciones virales mediante PCR es que esta técnica proporciona sólo una evidencia indirecta de la presencia del virus (Hiney y col., 2000; Einer-Jensen y col., 2002; Winton y Einer-Jensen, 2002), que además en muchos casos no puede confirmarse porque el patógeno no crece en cultivo celular. Es evidente que para obtener un resultado positivo mediante PCR sólo se necesita un fragmento de ADN, pero también es sobradamente conocido que la sensibilidad del cultivo celular puede ser

limitada, especialmente en peces portadores (Miller y col., 1998; Lorenzen y col., 1999; Taksdal y col., 2001). Además el diseño experimental que hemos planteado en este capítulo revela claramente que la RT-PCR está detectando partículas infectivas en lugar de simples fragmentos de ARN. De hecho el alto nivel de detección que se produce pasados los 10 días desde la inoculación tanto en sangre como en tejidos sugiere la existencia de una viremia, mientras que la progresiva disminución en los días sucesivos, donde sólo es posible detectar virus en sangre, parece indicar que la infección ha entrado en una fase de persistencia, fase en la que las partículas virales únicamente se encontrarían en el interior de los leucocitos como se ha sugerido previamente (Enzman, 1981).

Por otra parte, es interesante señalar que la utilización de los periodos de incubación recomendados por la normativa europea para el aislamiento de VHSV en cultivo celular (7 - 10 días) no habría permitido la detección de los peces infectados en este estudio ya que fue necesario esperar hasta 20 días para observar la aparición de ECP. Los resultados obtenidos en este trabajo cuestionan la idoneidad de las directivas comunitarias cuando se trata de detectar portadores de VHSV y demuestran la utilidad de las tecnologías basadas en la PCR para la detección de portadores asintomáticos en términos de sensibilidad y tiempo de detección, como se había sugerido previamente para éste y otros virus (Bruchhof y col., 1995; Dalla Valle y col., 2000; Griffiths y Melville, 2000; Rodríguez y col., 2001).

CAPÍTULO 3:

**ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE CEPAS DE VHSV
GALLEGAS Y DEL FLEMISH CAP**

RESUMEN

En este capítulo se evalúa la diversidad genética de un grupo de 31 aislados de VHSV con distinto origen, tanto geográfico como de hospedador, y se comparan con los genotipos representativos del virus mediante dos técnicas: análisis de secuencias y análisis de fragmentos de restricción (RFLP's).

En primer lugar, se comparan las secuencias de nucleótidos de una región específica del gen de la nucleoproteína que comprende una longitud de 335 nucleótidos.

Por otro lado se desarrolla un método molecular basado en RFLP's que simplifica el genotipado de rutina del virus VHSV. Para ello se emplea un fragmento de 1259 nucleótidos del gen de la glicoproteína, que se somete a restricción selectiva con uno o dos enzimas alternativos.

Los resultados obtenidos han establecido que en general los aislados objeto de estudio de origen continental se agrupan en el genotipo I y los de origen marino en el genotipo III, mientras que los aislados a partir de especies anádromas pueden encontrarse en los dos grupos.

INTRODUCCIÓN

El virus de la septicemia hemorrágica viral es especialmente conocido como patógeno de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en Europa, donde causa graves pérdidas económicas en granjas comerciales. Aunque durante muchos años se consideró a aquella el huésped principal de VHSV, el virus se ha aislado de una gran cantidad de especies tanto de vida libre como cultivados entre las que podemos citar trucha común (*Salmo trutta fario*) y salmón atlántico (*Salmo salar*) (Rasmussen, 1965), bacalao (*Gadus morhua*) (Jensen y col., 1979), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Schlotfeldt y col., 1991; Ross y col. 1994; Nishizawa y col., 2006), coregono (*Coregonus sp.*) (Ahne y Tomsen, 1985), bacalao del pacífico (*Gadus macrocephalus*) (Meyers y col., 1992), arenque (*Clupea harengus pallasii*) (Meyers y col. 1994), lenguado del pacífico (*Paralichthys olivaceus*) (Takano y col., 2000), eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) (Smail, 2000), fletán negro (*Reinhardtius hippoglossoides*) (Dopazo y col., 2002), sardina (*Sardinops sagax*) y caballa (*Scomber japonicus*) (Hedrick y col., 2003), lubina americana (Morone saxatilis) (Gagné y col., 2005) y lucio americano (*Esox masquinongy*) (Elsayed y col., 2006).

Del mismo modo que aumenta el número de especies susceptibles al virus, lo hace el rango geográfico (Figura 3.1). Así, aunque los primeros aislamientos se realizaron en aguas continentales de un número limitado de países europeos, como Dinamarca, Francia y Alemania (Ahne y Tomsen, 1985; Meier y col., 1994), en la actualidad hay descripciones de VHSV en especies de agua dulce en países como Noruega, Portugal, Grecia y Suiza (Brudeseth y Evensen, 2002; Ariel y Olsen, 2002; Knuesel y col., 2003). En lo que respecta a aislados de origen marino, las descripciones abarcan aguas

costeras europeas especialmente en Mar del Norte, Báltico, alrededores de Gran Bretaña e Irlanda (King y col., 2001a), pero también Eslovenia (Ocvirk y col., 1981), Estonia y Rusia (Ariel & Olesen, 2002) y Turquía (Nishizawa y col., 2006), costas norteamericanas del Pacífico y del Atlántico (Meyers y Winton, 1995; Hedrick y col., 2003; Gagné y col., 2005) y zonas costeras de Tailandia y Japón (Takano y col., 2000; Watanabe y col., 2002). En otros lugares donde se desarrolla la acuicultura comercial como puede ser Chile o Australia no se ha descrito hasta el momento. Los virus aislados de peces marinos son serológicamente indistinguibles de los aislados continentales (Benmansour y col., 1997) y, aunque han demostrado ser poco o nada patógenos para trucha arcoiris (Skall y col., 2004a), sí lo son para rodaballo (King y col., 2001b).



Figura 3.1: Distribución geográfica del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV).

Inicialmente la clasificación serológica de VHSV comprendía tres serotipos: el serotipo 1 representado por la cepa F1, el serotipo 2 representado por la cepa Hededam (ambos aislados de trucha arcoiris en Dinamarca) y el serotipo 3 representado por la cepa francesa 23/75 aislada de trucha común (LeBerre y col., 1977). Sin embargo, en la década de los 90 Olesen y col. (1993) apuntaban la existencia de reacciones cruzadas entre estos tres serotipos

y sugerían el uso de un antisuero policlonal y 4 anticuerpos monoclonales que definirían 4 serogrupos.

En los últimos años la clasificación serológica ha sido desplazada por la utilización de técnicas moleculares, especialmente la secuenciación de ácidos nucleicos, que permite el tipado y la clasificación del virus de una forma fiable y relativamente rápida. Aunque el genoma de VHSV está compuesto por 6 genes (3'-N-M1-M2-G-NV-L-5'), la mayor parte de los estudios de secuenciación realizados se han basado en la secuencia completa o parcial del gen correspondiente a la glicoproteína (G) (Benmansour y col., 1997; Stone y col., 1997; Nishizawa y col., 2002; Thiéry y col., 2002, Einer-Jensen y col., 2004) y en menor medida en fragmentos del gen de la nucleoproteína (N) (Snow y col., 2004). Los primeros análisis de secuencias llevados a cabo por Stone y col. en 1997, establecieron la existencia de tres genogrupos: el genogrupo I estaría representado por las cepas americanas, el genogrupo II por los aislados de bacalao atlántico H17/5 y H19/1 y el genogrupo III estaría representado por los aislados tipo europeo F1, 23-75, He o FR07/71. En este mismo año otro grupo de investigadores (Benmansour y col., 1997) realizó un genotipado diferente basado también en una secuencia parcial del gen G. Así, según estos autores el genotipo I contendría los aislados continentales europeos, el genotipo II englobaría los aislados de rodaballo en Escocia y el genotipo III estaría constituido por los aislados americanos. En 1999, Snow y col. tras la secuenciación de un fragmento del gen N de un grupo de aislados de distintos orígenes propusieron la creación de 4 genotipos que incluyen uno nuevo correspondiente a aislados de la zona del Báltico. Sin embargo, trabajos posteriores (Nishizawa y col., 2002; Thiéry y col., 2002) mantuvieron la clasificación en los 3 genotipos establecidos en 1997 por Benmansour y col. Recientemente, Einer-Jensen y col. (2004) dividen al genotipo I, correspondiente a las cepas europeas, en 5 subgrupos.

La clasificación aceptada en la actualidad (Einer-Jensen y col., 2004; 2005; Snow y col., 2004) establece la existencia de 4 genotipos tal y como se detalla a continuación. El genotipo I está constituido por aislados de Europa continental y aislados marinos, el genotipo II incluye aislados marinos obtenidos del mar Báltico, el genotipo III comprende aislados de peces cultivados o capturados alrededor de las Islas Británicas, así como el aislado francés de anguila (*Anguilla anguilla*) capturada en la parte atlántica de la región del Loira, en general se trata de aislados marinos del Mar del Norte y Atlántico Norte y por último, el genotipo IV que incluye aislados de la Costa Pacífica de Norte América. Los aislados marinos de VHSV están representados en los 4 genotipos mientras que los aislados de agua dulce pertenecen todos al genotipo I.

Sin embargo, debemos tener en cuenta que la técnica de la secuenciación no puede llevarse a cabo con facilidad en muchos laboratorios, por esta razón se han desarrollado otros mecanismos para el tipado molecular de los virus de peces, como la RPA (*Ribonuclease Protection Assay*) que se ha aplicado al estudio de IHNV (Kurath y col., 1995) y a VHSV (Snow y col., 1999a). Por otro lado la técnica de RFLP's (*Restriction fragment length polymorphism*), que aunque ha sido plenamente validada y se usa frecuentemente para el genotipado de aquabirnavirus (Cutrín y col., 2004), únicamente se ha aplicado en una ocasión reciente para el VHSV (Einer-Jensen y col. 2005b).

OBJETIVO

En este capítulo se trata de llevar a cabo el genotipado, mediante el análisis de secuencias del gen N, de los aislados de VHSV encontrados en nuestra zona así como los aislados en las aguas internacionales de Terranova

entre los años 1994 y 2002. Por otro lado, se pretende desarrollar un método de tipado alternativo basado en el análisis de RFLP's, mejorado en cuanto a sencillez y fiabilidad respecto al publicado por Einer-Jensen y col. (2005b).

MATERIAL Y MÉTODOS

AISLADOS VIRALES

Los aislados virales utilizados en este estudio fueron obtenidos de fletán negro capturado en el Flemish Cap (Terranova) y de distintas especies de vida libre o cultivados en aguas gallegas continentales y marinas (Tabla 3.1). Por otra parte, en la tabla 3.2 aparecen detalladas las cepas de referencia de los distintos genotipos de VHSV que se han empleado con fines comparativos. Los distintos aislados se propagaron en monocapas semiconfluentes de células BF-2 (pedúnculo de bluegill) con medio L15 y células EPC (epitelioma papuloso de carpa) con medio EMEM suplementados ambos con suero bovino fetal al 10% y antibióticos (según indicado en capítulos anteriores). Para los análisis filogenéticos se emplearon secuencias correspondientes a otras cepas de VHSV disponibles en las bases de datos GenBank (Tabla 3.2).

EXTRACCIÓN DEL ARN VIRAL

Cada aislado viral se inoculó en un frasco de 25 cm² con monocapas semiconfluentes de células a una MOI entre 0,1 y 1 y se incubaron a 15 °C hasta que se pudo apreciar un incipiente efecto citopático (48-72 h). El ARN se extrajo utilizando Trizol LS-Reagent (Invitrogen) tal y como se ha descrito en el capítulo 1.

Tabla 3.1: Aislados de VHSV empleados en este estudio.

Aislado	Origen geográfico	Hospedador	Año	H¹
SM2429	Pisc-1*	<i>Scophthalmus maximus</i>	1994	C
SM2456	Pisc-2*	<i>Scophthalmus maximus</i>	1994	C
SM2705	Pisc-1*	<i>Scophthalmus maximus</i>	1995	C
SM2727	Pisc-1*	<i>Scophthalmus maximus</i>	1995	C
SM2878	Pisc-1*	<i>Scophthalmus maximus</i>	1995	C
SM2897	Pisc-3*	<i>Scophthalmus maximus</i>	1995	C
SM2914	Pisc-1*	<i>Scophthalmus maximus</i>	1995	C
GH 30	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 32	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 33	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 34	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 35	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 36	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 37	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 40	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 42	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 43	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 45	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 46	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 47	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
GH 48	Flemish Cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	S
SA2648	Pisc-4*	<i>Sparus aurata</i>	1995	C
SC2645	Pisc-5*	<i>Salmo coho</i>	1995	C
SS4431	Lugo	<i>Salmo salar</i>	1999	S
SS19.01	Lugo	<i>Salmo salar</i>	2001	S
CP4370	A Coruña	<i>Chondrostoma polylepis</i>	1999	S
CP4433	Lugo	<i>Chondrostoma polylepis</i>	1999	S
STF154.01	Lugo	<i>Salmo trutta fario</i>	2001	C
STF180.01	Lugo	<i>Salmo trutta fario</i>	2001	C
STF632.01	Ourense	<i>Salmo trutta fario</i>	2001	C
OM13.01	A Coruña	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2001	C
SSP11.02	Pisc-4*	<i>Solea</i> sp.	2002	C ²

¹.- H: Tipo de huésped del que fue aislado (S, especie salvaje; C, especie en cultivo).

².- Primera generación en cultivo.

*.- En cumplimiento del compromiso de confidencialidad al que nuestro laboratorio está sujeto, en el caso de cepas aisladas de peces en cultivo, la piscifactoría se cita con referencia numérica.

Tabla 3.2: Cepas de referencia empleadas en este estudio.

Cepas	Genotipo	Hospedador	Referencia	Código de acceso**	
				Gen N	Gen G
FR-07/71	Ia	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Le Berre y col., 1977	AJ233396	AY546616
DK3592B	Ia	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Lorenzen y col., 1993		X66134
DK-1p40	Ib	<i>Rhinonemus cimbrius</i>	Mortensen y col., 1999	AJ130919	AY546575
DK-5p31	Ib	<i>Clupea harengus</i>	Skall y col. sin publicar.	AY356674	
DK-1p12	Ib	<i>Clupea harengus</i>	Mortensen y col., 1999	AY356653	AY546574
DK-1p49	II	<i>Clupea harengus</i>	Mortensen y col., 1999	AY356743	
DK5p551	II	<i>Clupea harengus</i>	Skall y col. sin publicar.	AY356690	
DK-1p53	II	<i>Clupea harengus</i>	Snow y col., 1999b	AJ130921	
DK-1p52	II	<i>Clupea sprattus</i>	Einer-Jensen y col., 2004		AY546576
UK-860/94	III	<i>Scophthalmus maximus</i>	Ross y col., 1994	AJ130915	AY546628
UK H17/5/93*	III	<i>Gadus morhua</i>	Smail, 2000	AY356727	AY546630
DK-4p101*	III	<i>Merlangius merlangus</i>	Mortensen y col., 1999	AJ130918	AY546581
IR-F13.02.97*	III	<i>Scophthalmus maximus</i>	McArdle. sin publicar	AJ130916	AY546620
UK-H17/2/95*	III	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Einer-Jensen y col., 2004		AY546629
UK DK2p51*	III	<i>Trisopterus esmarkii</i>	Mortensen y col., 1999	AJ130917	
FR-L59X*	III	<i>Anguilla anguilla</i>	Einer-Jensen y col., 2004		AY546618
UK-MLA 98/4PT1*	III	<i>Trisopterus esmarkii</i>	King y col., 2001a	AY356719	
US-Makah	IV	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Brunson y col., 1989	X59241	U28747

* Cepas empleadas solamente para el análisis de su secuencia a nivel teórico.

** Código de acceso de las secuencias genómicas disponibles en la GenBank.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS GENÓMICAS

Secuenciación de ácidos nucleicos

Para la reacción de transcripción inversa (RT), se usaron 5 µl de ARN purificado. El ADNc se obtuvo por incubación del ARN con 56 pmol de oligo (dT)₁₅ y 200 U de transcriptasa inversa (RT) *Moloney Murine Leukemia virus* (MMLV) (Invitrogen), en un volumen total de reacción de 20 µl que contenía 2 mM de cada dNTP, 0,1 M de DTT, 20 U de RNase out (Invitrogen) y tampón 5X (250 mM de Tris-HCl pH 8.3, 375 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂) (Invitrogen).

Cada producto de RT se sometió a PCR usando la pareja de cebadores VN (Snow y col., 1999), que amplifica una región de 511 pares de bases localizada dentro del gen N (Tabla 3.3). La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contienen 5 µl de producto de RT, además de 28 pmol de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTP, 2 U de BioTaq polimerasa (Bioline) y tampón de PCR 1X (160 mM (NH₂)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8.8, 0,1% Tween-20). La amplificación se llevó a cabo en 35 ciclos que comprenden 1 min a 95 °C (desnaturalización), 1 min a 55 °C (renaturalización) y 1 min a 72 °C (extensión), seguidos de una extensión final de 5 min a 72 °C, en un termociclador Techne Gernius (Techne).

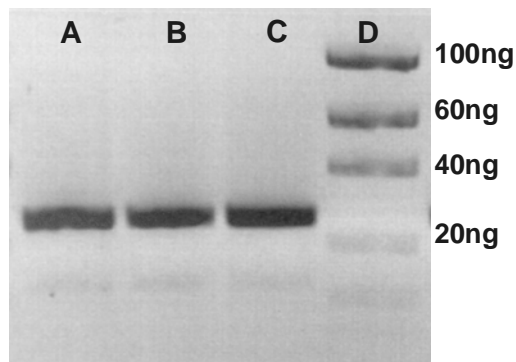
Tabla 3.3: Cebadores empleados para el análisis de secuencias

Nombre	Secuencia (5'-3')	Longitud	Posición*	Ubicación
VN	ATGGAAGGAGGAATTCGTGAAGCG	511	166-677	Gen N
VNRev	GCGGTGAAGTGCTGCAGTCC			

* Posición referida a la secuencia publicada de la cepa de referencia FR- 07/71 (Acc. no. AJ233396).

El producto de amplificación se verificó en un gel de 1,5% de agarosa y se purificó usando el kit Wizard[®] PCR *preps DNA purification system* (Promega) como se describe a continuación. A 40 µl del producto de reacción de PCR se le añadieron 100 µl del tampón de purificación y se agitó vigorosamente. A continuación se añadió 1 ml de *DNA purification resin* y se mezcló con el vórtex 3 veces en el intervalo de 1 min; la mezcla se transfirió a una columna con filtro y se lavó con 2 ml de isopropanol al 80%, centrifugando 2 min a $10.000 \times g$. Finalmente la columna se transfirió a un nuevo vial, se añadieron 50 µl de H₂O, se incubó 1 min y se centrifugó 20 seg a $10.000 \times g$. Los productos purificados se cuantificaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% empleando como referencia un estándar de concentraciones conocidas (*Low DNA Mass[™] Ladder*, Invitrogen) (Figura 3.2).

Figura 3.2: Gel de agarosa donde se muestra la cuantificación de productos de PCR purificados. En las calles A, B y C se observan las muestras de producto purificado de PCR. En la calle D se observa el estándar de concentraciones (*Low DNA Mass[™] Ladder*, Invitrogen).



La reacción de secuenciación se llevó a cabo por sextuplicado (por triplicado para cada cebador), empleando los mismos cebadores que en el PCR original (VN y VNrev) en un secuenciador automático modelo Applied Biosystem 373A, con el kit *ABI Prism[®] Big Dye[™] terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied-Biosystem). Se utilizó una cantidad aproximada de 30 ng de muestra, 1 µl de cebador (3,2 pmol) y 8 µl de mezcla de secuenciación y

se añadió una cantidad suficiente de H₂O para obtener un volumen final de 20 µl. La reacción de secuenciación constó de 25 ciclos de 96 °C (30 seg), 50 °C (15 seg) y 60 °C (4 min). Los nucleótidos no incorporados se eliminaron mediante la purificación de los productos de extensión; para ello se añadieron 2 µl de acetato sódico 3M, (pH 4,6) y 50 µl de etanol 95%, se incubaron a temperatura ambiente de 15 a 30 min, se centrifugaron 20 min a 10.000 × g y a continuación se lavaron con 250 µl de etanol 70%. Las muestras se secaron mediante vacío y se resuspendieron en 4 µl de tampón de carga conteniendo formamida desionizada y EDTA 25 mM (pH 8) con azul dextrano (50 mg×ml⁻¹) en una proporción 5:1. Finalmente, se desnaturalizaron a 95 °C durante 2 min e inmediatamente se transfirieron a hielo para cargarlos en un gel de poliacrilamida al 4% en un secuenciador ABI modelo 373A DNA.

Análisis de secuencias

Las secuencias se editaron usando los programas SeqMan II y EditSeq, ambos del paquete DNASTAR (Lasergene, v.6). El alineamiento de las secuencias se realizó usando el programa MegAlign, que también forma parte del software DNASTAR, con los siguientes parámetros de alineamiento *clustal W* con *gap penalty* de 15 y *gap length* de 6,66 en el modo *slow-accurate*. Para los alineamientos múltiples se usaron los mismos parámetros además de un retraso en las secuencias divergentes (*delay divergent seqs*) del 30% y un peso de transición de ADN (*DNA transition weight*) de 0,5. El análisis filogenético se desarrolló según el método *neighbour-joining* (NJ) modelo F84, usando el programa *Phylogeny Inference Package* (PHYLIP versión 3.63), con la frecuencia de las 4 bases normalizada en función de las bases presentes en las secuencias objeto de estudio y dando un valor de 2 a la relación entre transición y transversión. El árbol filogenético se construyó usando el programa TreeView 1.5, con *bootstrap* de 1000.

ANÁLISIS DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP's)

Selección de los enzimas de restricción

El análisis de los RFLP's se aplicó a un fragmento de 1259 pb correspondientes a una región del gen G. La selección teórica de las endonucleasas se realizó mediante el programa MapDraw de DNASTAR y su base de datos de enzimas (Lasergene, Inc.). Inicialmente se probaron alrededor de 250 enzimas y se preseleccionaron más de 100 en base a la presencia de lugares específicos de restricción en algunas de las secuencias de referencia empleadas, descartando los enzimas que a nivel teórico presentaban más de 4 dianas de restricción en una única secuencia o daban lugar a fragmentos difíciles de separar o de visualizar en geles de agarosa (por tener tamaños similares o por ser fragmentos demasiado pequeños, respectivamente). A partir de esta preselección teórica, se llevó a cabo una selección definitiva de los enzimas a ensayar, teniendo en cuenta el número de dianas de restricción esperadas para cada uno de los genotipos de VHSV, y el tamaño de los fragmentos obtenidos en la digestión.

Las 10 endonucleasas finalmente elegidas fueron: *Acc* I, *Alu* I, *Bsp* 1286 I, *Cfo* I (isozima *Hha* I), *Dde* I, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hpa* II (isozima *Msp* I), *Mbo* II y *Nci* I. El número de dianas de restricción y la posición de las mismas en los productos de PCR se determinaron en base a las secuencias publicadas correspondientes a las cepas FR07/71 (código de acceso AY546616) y DK3592B (X66134) del subgrupo **Ia**, DK1p12 (AY546574) y DK1p40 (AY546575) del subgrupo **Ib**, DK1p52 (AY546576) del genotipo **II**, UK860/94 (AY546628), UK-H17/5/93 (AY546630), DK-4p101 (AY546581), IR-F13.02.97 (AY546620), UK-H17/2/95 (AY546629) y FR-L59X (AY546618) del genotipo **III** y US- Makah (U28747) del genotipo **IV** usando el paquete de software de análisis de secuencias DNASTAR (Lasergene, Inc).

Predicción de la fiabilidad del sistema de tipado

Tras la selección de los mejores enzimas, se llevó a cabo una evaluación teórica del sistema de tipado (mediante el software de Lasergene) englobando todas las secuencias disponibles en la base de datos GeneBank (70 secuencias: 35 de subgrupo **Ia**, 16 de **Ib**, 3 de **Ic**, **Id** y genotipo **II**, 9 de genotipo **III** y 1 del genotipo **IV**), y los resultados se expresaron como porcentaje esperado de cepas con un determinado RFLP.

Obtención de los RFLP's

RT-PCR

Para este ensayo se utilizó la pareja de cebadores (*90103U* y *90103L*) localizadas en el gen G y que dan lugar a un producto de amplificación de 1259 pb (Tabla 3.4).

Tabla 3.4: Cebadores empleados para el análisis mediante RFLP's

Nombre	Secuencia (5'-3')	Longitud	Posición*	Ubicación
<i>90103U</i>	TCCCGATTTCGACCAGCTCAACTCA	1259	3119-4377	Gen G
<i>90103L</i>	CCCTCCCACAACCCCATCC			

* Posición referida a la secuencia publicada de la cepa de referencia FR- 07/71 (Acc. no. AJ233396).

Con el fin de conocer la temperatura óptima para la reacción de transcripción inversa, ésta se llevó a cabo en ensayos previos, empleando un gradiente de temperaturas que abarcó de los 40 a los 49 °C. Una vez optimizada esa fase, la reacción de RT-PCR se llevó a cabo con el Kit *GeneAmp® Gold RNA PCR core* (Applied Biosystem) en un

termociclador *MyCycler* (BioRad). En una primera fase, al ARN viral desnaturalizado a 94 °C durante 2 min, se le añadió la mezcla de reacción para la transcripción inversa (RT-PCR *buffer* 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 1 mM de dNTP, 0,5 U/μl *RNAse inhibitor*, 10 mM de dTT, 1,25 μM de *random hexamers* y 0,75 U/μl del enzima *MultiScribe*; Applied Biosystem) se incubó a 25 °C durante 10 min y a 42 °C durante 30 min.

Al igual que en el paso anterior para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se aplicaron ensayos previos para determinar la temperatura óptima de renaturalización, por lo que para este paso se ensayó un gradiente de temperatura desde 50 a 59 °C. Una vez optimizado este paso, la reacción de PCR se llevó a cabo preparando una mezcla de reacción con 0,15 μM de los cebadores específicos, dNTP 0,8 mM, 1,75 mM de MgCl₂, *RT-PCR buffer* 1X y 0,05 U/μl de *AmpliTaQ Gold DNA polimerasa*, al que se añadieron 5 μl del producto de la RT. La reacción se llevó a cabo comenzando con una incubación de 95 °C 10 min, seguido de 45 ciclos de PCR con una desnaturalización de 60 seg a 94 °C, renaturalización de 55 °C, 90 seg y una amplificación de 90 seg a 72 °C. La polimerización se concluyó con un período de extensión de 10 min a 72 °C.

Los productos de RT-PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 1,5% con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV. A continuación se procedió a cortar las bandas específicas y el ADN se purificó usando el sistema *DNA Gel extraction Kit* (Millipore) según descrito en el capítulo 1.

Tratamiento con endonucleasas de restricción

La mezcla de reacción se preparó con aproximadamente 1 μg de ADNc, 1U del enzima seleccionado, 2 μl de tampón de restricción suministrado por el fabricante (específico para cada endonucleasa) y una cantidad de

H₂O ajustada para un volumen final de 20 µl. A continuación se incubó a 37° C entre 3 y 4 horas.

Los fragmentos de ADN, producto de la digestión, se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%; a continuación los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) durante 30 min y se visualizaron bajo luz ultravioleta. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por comparación con la migración de un marcador de pesos moleculares (Bench Top 100 bp DNA ladder, Promega, o 100 bp DNA ladder, Genecraft).

RESULTADOS

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

El análisis de la secuencia de un fragmento de 335 nucleótidos del gen de la nucleoproteína nos permitió establecer una serie de homologías entre los aislados analizados en este estudio y las cepas de referencia representativas de los distintos genotipos de VHSV; estos resultados se presentan ordenados según el genotipo (Tabla 3.5), o la especie huésped del aislado, en la tabla 3.6. Así, analizando cada una de las cepas y aislados por separado, podemos apreciar dos grupos de similitud, con los mayores porcentajes de homología de secuencias: un primer grupo, con homologías en torno al 98% con las cepas de referencia aisladas en epizootias de rodaballo cultivado (IR-F13.02.97 y UK860/94) y un segundo grupo con absoluta identidad de secuencia con la cepa FR07/71, cepa de referencia de trucha arcoiris (Tabla 3.5). Un análisis de las secuencias de nuestros aislados, agrupados según el huésped original, aportó datos interesantes. Así, observamos que prácticamente la totalidad de

		Porcentaje de Identidad																											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25			
Divergencia	1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.5	96.1	96.1	86.6	86.6	86.9	89.0	88.7	89.0	88.1	87.5	89.3	87.5	86.9	87.2	87.2	87.2	87.2	83.6	1		
	FR-07-71																												
	2	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.5	96.1	96.1	86.6	86.6	86.9	89.0	88.7	89.0	88.1	87.5	89.3	87.5	86.9	87.2	87.2	87.2	87.2	87.2	83.6	2	
	STF180.01 (a)																												
	3	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.5	96.1	96.1	86.6	86.6	86.9	89.0	88.7	89.0	88.1	87.5	89.3	87.5	86.9	87.2	87.2	87.2	87.2	87.2	83.6	3	
	Ssp 11.02																												
	4	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	95.5	96.1	96.1	86.6	86.6	86.9	89.0	88.7	89.0	88.1	87.5	89.3	87.5	86.9	87.2	87.2	87.2	87.2	87.2	83.6	4	
	OM13.01																												
	5	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	95.5	96.1	96.1	86.6	86.6	86.9	89.0	88.7	89.0	88.1	87.5	89.3	87.5	86.9	87.2	87.2	87.2	87.2	87.2	83.6	5	
	CP4370 (b)																												
	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	95.5	96.1	96.1	86.6	86.6	86.9	89.0	88.7	89.0	88.1	87.5	89.3	87.5	86.9	87.2	87.2	87.2	87.2	87.2	83.6	6	
	SS19.01 (c)																												
	7	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	98.8	99.4	98.8	99.4	86.9	86.9	87.2	89.0	88.7	89.0	88.7	88.1	88.7	87.8	87.8	87.8	87.8	87.8	82.4	7		
	DK-1p40																												
	8	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	99.4	99.4	99.4	86.9	86.9	87.2	89.0	88.7	89.0	88.7	88.1	89.3	88.1	87.5	87.8	87.8	87.8	87.8	83.0	8		
	DK-5p31																												
	9	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	0.3	0.6	0.6	87.5	87.5	87.8	89.6	89.3	89.6	89.3	88.7	89.3	88.7	88.1	88.4	88.4	88.4	88.4	83.0	9		
	DK-1p12																												
	10	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	14.3	14.7	13.9	100.0	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	85.7	10	
	DK-1p49																												
	11	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	14.3	14.7	13.9	0.0	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	85.7	11	
	DK-1p53																												
	12	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	13.9	14.3	13.5	0.3	0.3	89.3	89.0	89.6	89.3	88.7	89.3	88.7	89.3	89.0	88.4	88.7	88.7	88.7	88.7	85.7	12	
	DK-5p551																												
	13	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	11.8	12.1	11.4	11.3	11.3	11.7	12.0	0.9	99.1	97.9	97.6	97.0	97.9	97.3	96.7	97.0	97.0	97.0	97.0	86.0	13	
UK-MLA98.4PT1																													
14	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	11.8	12.5	11.7	11.7	11.7	12.0	0.9	98.2	97.9	97.3	98.2	97.9	97.3	98.2	97.6	97.0	97.3	97.3	97.3	85.7	14		
DK-4P101																													
15	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	11.8	12.1	11.4	11.0	11.0	11.4	11.4	2.1	1.8	99.1	98.5	98.5	98.8	98.2	97.6	97.9	97.9	97.9	97.9	86.0	15		
IR-F13.02.97																													
16	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2	12.2	12.5	11.7	11.3	11.3	11.7	12.4	2.1	0.9	99.4	99.4	98.5	98.8	98.2	97.6	97.3	97.6	97.6	97.6	85.1	16		
UK-H17.593																													
17	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9	12.9	13.2	12.5	12.1	12.1	12.4	3.1	2.7	1.5	0.6	97.9	97.3	96.7	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	85.1	17		
DK-2P51																													
18	11.7	11.7	11.7	11.7	11.7	11.7	12.2	11.8	11.8	11.8	11.4	11.4	11.7	2.1	1.8	1.2	1.5	2.1	98.2	97.6	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	85.7	18		
UK-86094																													
19	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	12.9	13.3	12.5	11.7	11.7	12.1	2.7	2.4	1.8	2.1	1.8	99.4	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	86.3	19		
SM2914 (d)																													
20	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	13.7	14.0	13.2	12.4	12.4	12.8	3.4	3.1	2.4	2.7	3.4	2.4	0.6	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	85.7	20		
GH34																													
21	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	13.3	13.6	12.9	12.1	12.1	12.4	3.1	2.7	2.1	2.4	3.1	2.1	0.3	0.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	86.0	21		
GH40 (e)																													
22	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	13.3	13.6	12.9	12.1	12.1	12.4	3.1	2.7	2.1	2.4	3.1	2.1	0.3	0.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	86.0	22		
S42648																													
23	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	13.3	13.6	12.9	12.1	12.1	12.4	3.1	2.7	2.1	2.4	3.1	2.1	0.3	0.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	86.0	23		
SM2705 (f)																													
24	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	13.3	13.6	12.9	12.1	12.1	12.4	3.1	2.7	2.1	2.4	3.1	2.1	0.3	0.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	86.0	24		
SC2645																													
25	18.9	18.9	18.9	18.9	18.9	18.9	20.1	19.6	19.6	16.2	16.2	16.2	15.7	16.1	15.7	16.8	16.8	16.1	15.3	16.1	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7	25			
US-Makab																													

Tabla 3.5: Porcentaje de homología y divergencia entre las secuencias de un fragmento del gen N de las cepas virales. En la parte superior del triángulo se muestra los porcentajes de homología y en la parte inferior los porcentajes de divergencia.

(a), se incluye a otras dos cepas con un 100% de homología en la secuencia: STF154.01 y STF632.01; (b), se incluye a CP4433; (c), se incluye SS4433; (d), se incluye a SM2429, SM2456, SM2727 y SM 2897; (e), se incluye a todas las cepas GH, excepto GH34.

Tabla 3.6: Relaciones de similitud entre grupos de cepas (de referencia y aislados)

Cepas de referencia (por genotipo)	Aislados agrupados por especie de Inúsped													
	Ia	Ib	II	III	IV	STF	Ssp	OM	CP	SS	SA	SC	SM	GH
100±0	95,9±0,3	86,7±0,2	88,6±0,7	83,6±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	87,2±0	87,2±0	87,4±0,1	87,2±0,1
	99,6±0,5	87,2±0,3	88,9±0,4	82,8±0,3	95,9±0,3	95,9±0,3	95,9±0,3	95,9±0,3	95,9±0,3	95,9±0,3	88±0,3	88±0,3	88,2±0,3	88±0,3
		99,9±0,2	89,4±0,3	85,7±0	86,7±0,2	86,7±0,2	86,7±0,2	86,7±0,2	86,7±0,2	86,7±0,2	88,9±0,2	88,9±0,2	89,1±0,2	88,9±0,2
			98,7±1	85,6±0,4	88,6±0,6	88,6±0,7	88,6±0,7	88,6±0,6	88,6±0,6	88,6±0,6	97,5±0,4	97,5±0,4	97,7±0,4	97,4±0,4
				100±0	83,6±0	83,6±0	83,6±0	83,6±0	83,6±0	83,6±0	86±0	86±0	86,2±0,1	86±0,1
					100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	87,2±0	87,2±0	87,4±0,1	87,2±0,1
						100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	87,2±0	87,2±0	87,4±0,1	87,2±0,1
							100±0	100±0	100±0	100±0	87,2±0	87,2±0	87,4±0,1	87,2±0,1
								100±0	100±0	100±0	87,2±0	87,2±0	87,4±0,1	87,2±0,1
									100±0	100±0	87,2±0	87,2±0	87,4±0,1	87,2±0,1
										100±0	100±0	100±0	99,8±0,1	100±0,1
											100±0	100±0	99,8±0,1	100±0,1
												100±0	99,9±0,1	99,8±0,2
														100±0,1

Cada valor representa la media y la desviación típica de homologías entre grupos.

Grupo STF: Trucha común; Grupo Ssp: Lengüado; Grupo OM: Trucha arcoiris; Grupo CP: Boga; Grupo SS: Salmón atlántico; Grupo SA: Dorada; Grupo SC: Salmón coho; Grupo SM: Rodaballo; Grupo GH: Fletán negro.

aislados obtenidos de peces marinos, fletán negro (grupo GH), rodaballo (grupo SM), y dorada (grupo SA) mostraban el mayor nivel de homología con el genotipo III, al igual que el aislado de salmón coho (grupo SC). Por su parte los aislados de peces de aguas continentales, trucha arcoiris (grupo OM), trucha común (grupo STF) y boga (grupo CP) junto con los aislados de salmón atlántico (grupo SS) presentaban una homología del 100% con el genotipo I, en concreto con el subgrupo Ia. Asimismo, es necesario destacar la total similitud observada entre el aislado de lenguado (grupo Ssp) con el mismo genotipo y subgrupo Ia.

La secuencia de nucleótidos de los aislados del Flemish Cap obtenidas en el presente estudio han sido depositadas en la base de datos de secuencias GenBank con números de acceso del AJ849477 al AJ849490.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Con el objetivo de examinar las relaciones existentes entre los aislados secuenciados en este capítulo y otros aislados de VHSV previamente secuenciados, se elaboró el árbol filogenético que se representa en la figura 3.3. La topología del árbol se corresponde con la de otros estudios previos (Einer-Jensen y col., 2004; Snow y col., 1999, 2004), manteniendo los 4 genotipos establecidos (I - IV) con el apoyo de valores significativos de *bootstrap*. Dentro del genotipo I se identificaron los 2 subgrupos Ia y Ib, pudiendo observar que todos nuestros aislados de origen continental, así como los de salmón atlántico, aparecen incluidos en el subgrupo Ia, junto con la cepa de referencia FR07/71; curiosamente también se engloba aquí el aislado de lenguado (Ssp11.02), coincidiendo con los resultados de homología anteriormente expuestos. Los aislados de origen marino, así como el aislado de salmón coho, aparecen agrupados con las cepas de referencia del genotipo III, entre los que se encuentran aislados del mar del Norte y de aguas costeras de Gran Bretaña e



Figura 3.3: Relaciones filogenéticas de los aislados objeto de estudio y las cepas de referencia de los distintos genotipos de VHSV. El árbol filogenético se obtuvo usando *Neighbour-joining* incluido en el programa PHYLIP (Phylogeny Inference Package) versión 3.63. Los valores de *Bootstrap* están indicados como porcentajes de 1000 repeticiones. Los valores inferiores a 30 no se representan.

Irlanda. La relación genética entre los miembros del genotipo III ilustrada en el árbol demuestra claramente dos brazos sustentados en valores de *bootstrap* de 100, donde podemos observar de nuevo que nuestros aislados se encuentran estrechamente relacionados con las cepas aisladas de rodaballo en Escocia e Irlanda, especialmente con la cepa UK860/94.

RFLP's

Evaluación de enzimas de restricción

De los 11 enzimas seleccionados a nivel teórico, únicamente las endonucleasas *Hpa* II (*Msp* I) y *Mbo* II presentaron perfiles diferenciados para cada genotipo de VHSV. Sin embargo estas enzimas presentan demasiados puntos de corte, como puede verse esquematizado en la figura 3.4, lo que daría lugar a fragmentos de tamaños relativamente pequeños (inferiores a 100 bp), lo que dificultaría su visualización en geles de agarosa y generaría cierta confusión para diferenciar los RFLP's. Un problema similar se presentó con la endonucleasa *Dde* I, que teóricamente permitiría la diferenciación de los 4 genotipos, pero en realidad presenta patrones electroforéticos confusos dado que abundan los fragmentos de pequeño tamaño debido a la existencia de varias dianas de restricción. Además de la evaluación teórica negativa, se llevó a cabo una serie de ensayos a nivel práctico que confirmaron que estas enzimas no resultaban apropiados para el genotipado de los VHSV (resultados no mostrados).

En la figura 3.4 se muestra el patrón de restricción a nivel teórico de un cuarto enzima, la endonucleasa *Alu* I, que no se reprodujo a nivel práctico. Así, a pesar de que teóricamente distinguían entre genotipo I, II, III y IV, al llevar a cabo el ensayo agrupó a los genotipos I y II en un único RFLP.

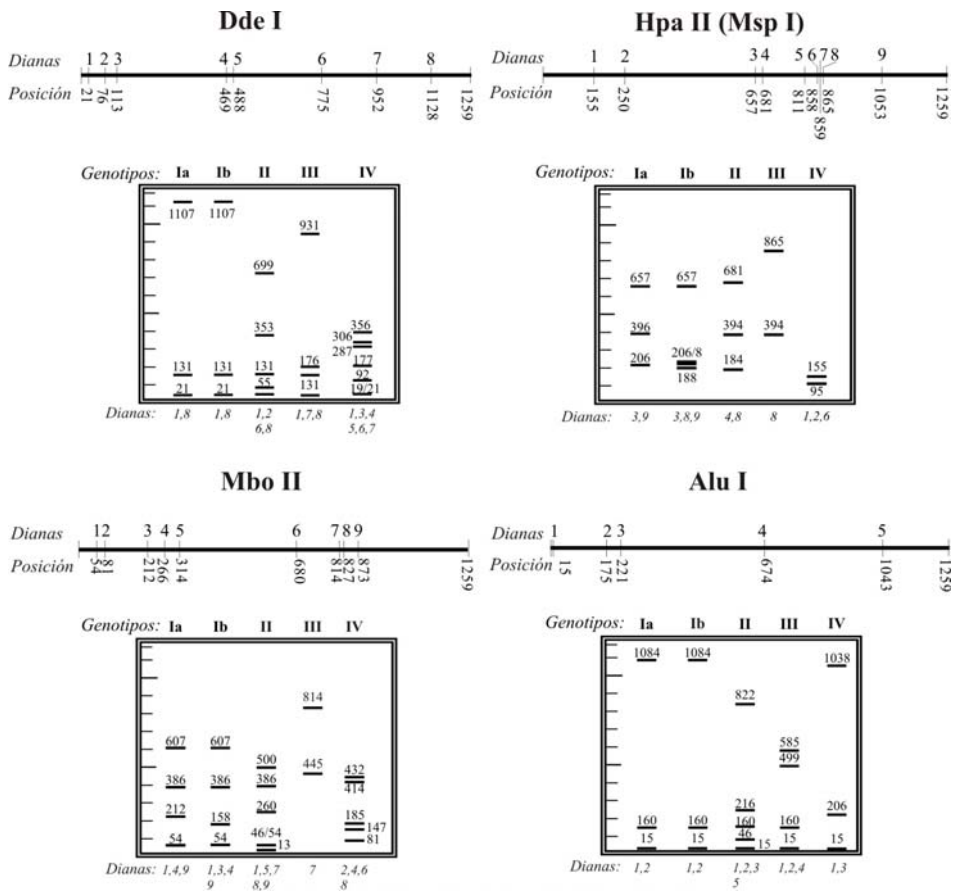


Figura 3.4: Representación a nivel teórico de los puntos de corte y de los patrones de restricción esperados de las endonucleasas, *Dde I*; *Hpa II* (Isozima: *Msp I*) *Mbo II* y *Alu I*. En la parte superior se muestra una representación del mapa genómico de VHSV basado en la secuencia de la cepa FR-07/71 (acc. no.AY546616), con el número de la diana de restricción (*Diana*) y su posición en el genoma (*posición*). En la parte inferior se muestra el patrón electroforético esperado para cada RFLP correspondiente con las cepas de referencia de cada genotipo. **Ia** (FR07/71), **Ib** (DK1p40, DK1p12), **II** (DK1p52), **III** (UK860/94) y **IV** (US-Makah).

La visualización en gels de agarosa de los fragmentos generados por el resto de los enzimas utilizados reveló que tampoco cumplían, por separado, las expectativas de identificación de todos los genotipos; además, en algunos casos el resultado observado, en cuanto a número y tipo de perfiles de restricción

(RFLP's), difirió en mayor o menor medida del esperado según el análisis teórico. Así, 3 era el número esperado de dianas de restricción con el enzima *Acc I*, en las posiciones 361, 448 y 997 del fragmento específico (Figura 3.5A), generando 4 RFLP's que deberían diferenciar los genotipos IA, II y IV (con una diana) y IB y III (sin diana de restricción). Como puede verse en la figura 3.5B, con el enzima *Acc I* solo se pudieron diferenciar tres perfiles, agrupando en un único patrón caracterizado por la ausencia de dianas de restricción a las cepas de los genotipos II y III. Las cepas del subgrupo Ia presentaron una diana de

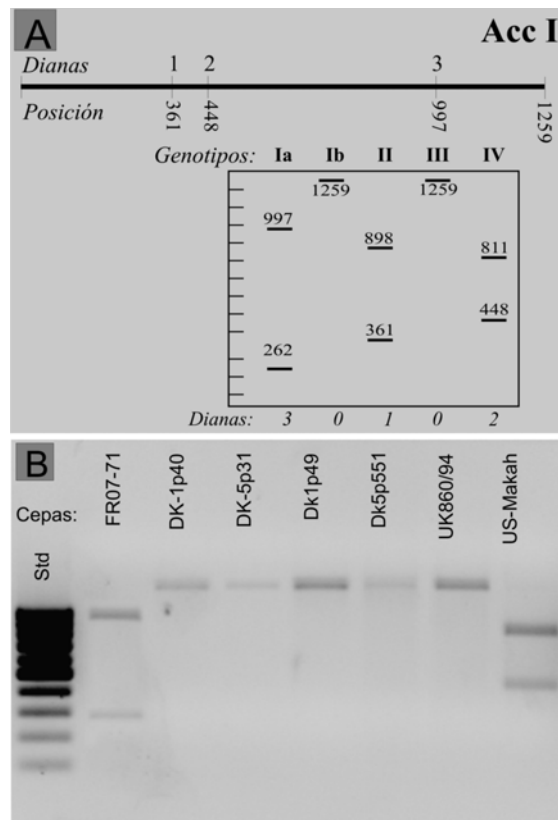


Figura 3.5: A. Representación teórica de las dianas de restricción y su posición, así como el patrón electroforético esperado para la endonucleasa *Acc I*. B. Gel de agarosa que muestra los patrones electroforético obtenidos experimentalmente con las cepas de referencia para cada genotipo. Std (100bp DNA Ladder, Genecraft).

restricción que dio lugar a dos fragmentos de 262 y 997, como se esperaba, al igual que ocurrió con las cepas del genotipo IV, que se caracterizaron por la presencia de una diana de restricción que proporcionó un perfil de dos fragmentos de 811 y 448 pares de bases.

Los resultados obtenidos con la endonucleasa *Bsp* 1286 I siguieron los RFLP's esperados a nivel teórico (Figura 3.6). Así este enzima generó 3 perfiles electroforéticos que se correspondieron con los genotipos Ia, III, IV y un cuarto

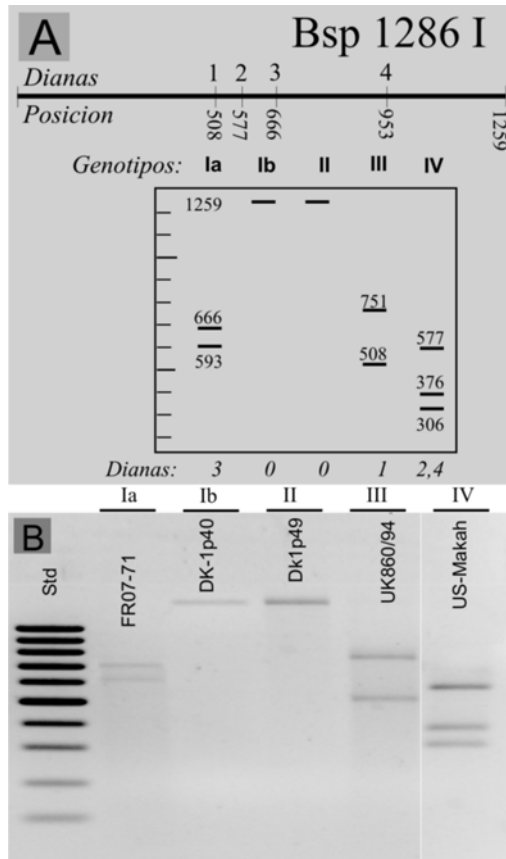


Figura 3.6: A. Representación teórica de las dianas de restricción y su posición, así como el patrón electroforético esperado para la endonucleasa *Bsp* 1286 I. B. Gel de agarosa que muestra los patrones electroforéticos obtenidos con las cepas de referencia para cada genotipo. Std (100 bp DNA Ladder, Genecraft).

perfil que engloba las cepas pertenecientes a los genotipos Ib y II. El subgrupo Ia se caracterizó por la presencia de una única diana de restricción que originó dos fragmentos de 666 y 593 pares de bases. El segundo perfil que representa a los grupos Ib y II se caracterizó por la ausencia de dianas de restricción de modo que pudo verse el fragmento completo. El RFLP correspondiente al genotipo III presentó dos fragmentos de 751 y 508 pb como resultado de un único punto de corte; finalmente el genotipo IV mostró un RFLP que se caracterizó por la presencia de 2 dianas de restricción que dan lugar a tres fragmentos de 577, 376 y 306 pares de bases.

La evaluación experimental de la endonucleasa *Cfo* I reveló que producía los perfiles esperados (Figura 3.7). Así, los genotipos Ia y II presentaron el mismo patrón electroforético, correspondiente a la presencia de una única diana de restricción, dando lugar a 2 fragmentos de 951 y 308 pb; los genotipos Ib y III presentaron también un mismo RFLP con dos dianas de restricción y tres fragmentos de 666, 308 y 285 pares de bases; el genotipo IV presentó un perfil diferente, caracterizado por una única diana de restricción en la posición 462, dando lugar a dos fragmentos de 797 y 462 pb.

Los enzimas de restricción *Eco* RI y *Eco* RV se ensayaron no tanto por su capacidad para diferenciar los distintos genotipos como por sus posibilidades en la resolución de algunos grupos específicos; de hecho, a nivel teórico, ambos enzimas mostraban inconvenientes, ya fuera por generar un número reducido de RFLP's (*Eco* RI), o por dar RFLP's difíciles de diferenciar (*Eco* RV). Así como se puede apreciar en la figura 3.8 en los ensayos experimentales la endonucleasa *Eco* RI generó 2 RFLP's, uno caracterizado por la ausencia de dianas de restricción, y que engloba a la mayoría de los genotipos, y otro con un punto de corte a nivel del nucleótido 729 dando lugar a dos fragmentos de 530 y 729 pb, este RFLP lo presenta únicamente la cepa UK860/94 perteneciente al genotipo III. Mientras que *Eco* RV generó 3 RFLP's diferentes; el primero, correspondiente al genotipo I, se caracterizó por la aparición de 3 fragmentos

(704, 459 y 96) como consecuencia de 2 puntos de corte; los genotipos II y IV mostraron perfiles de restricción con dos fragmentos de alrededor de 820 y 439 pb; finalmente, el genotipo III mostró un RFLP correspondiente a la presencia de una diana de restricción, con fragmentos de 936 y 323 pb.

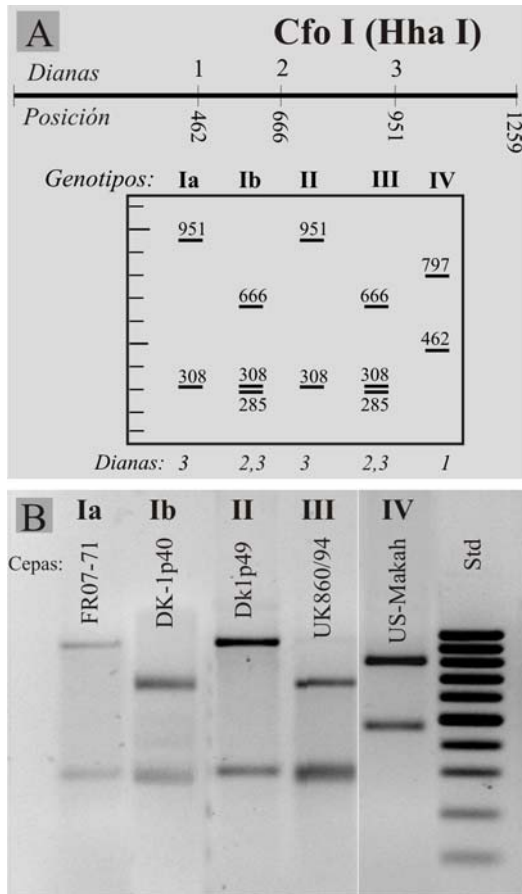


Figura 3.7: A. Representación teórica de las dianas de restricción y su posición, así como el patrón electroforético esperado para la endonucleasa *Cfo I*. B. Gel de agarosa que muestra los patrones electroforético obtenidos con las cepas de referencia para cada genotipo. Std: 100 bp DNA ladder, Genecraft.

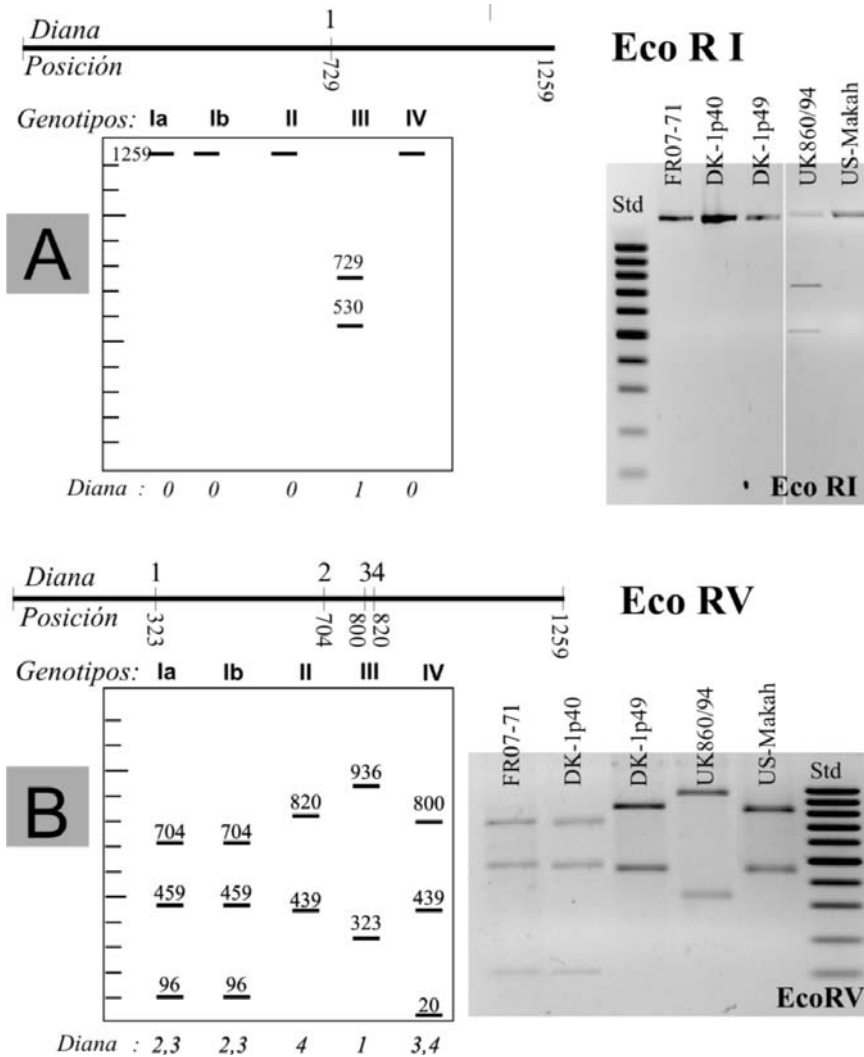


Figura 3.8: A. Representación teórica de las dianas de restricción y su posición, con la representación de los patrones electroforético para la endonucleasa *Eco RI*. A su derecha puede observarse un gel de agarosa con los perfiles electroforéticos obtenidos con cada genotipo. B. Representación teórica de las dianas de restricción y su posición, así como el patrón electroforético para la endonucleasa *Eco RV*. A la derecha de esta figura se puede apreciar el gel de agarosa mostrando los perfiles electroforéticos obtenidos con cada genotipo Std: 100 bp DNA ladder, Genecraft.

Por último, la endonucleasa *Nci* I (figura 3.9) tal y como se esperaba, presentó un mismo patrón electroforético para los genotipos II y III, con una diana de restricción en la posición (865) que dio lugar a dos fragmentos, de 865

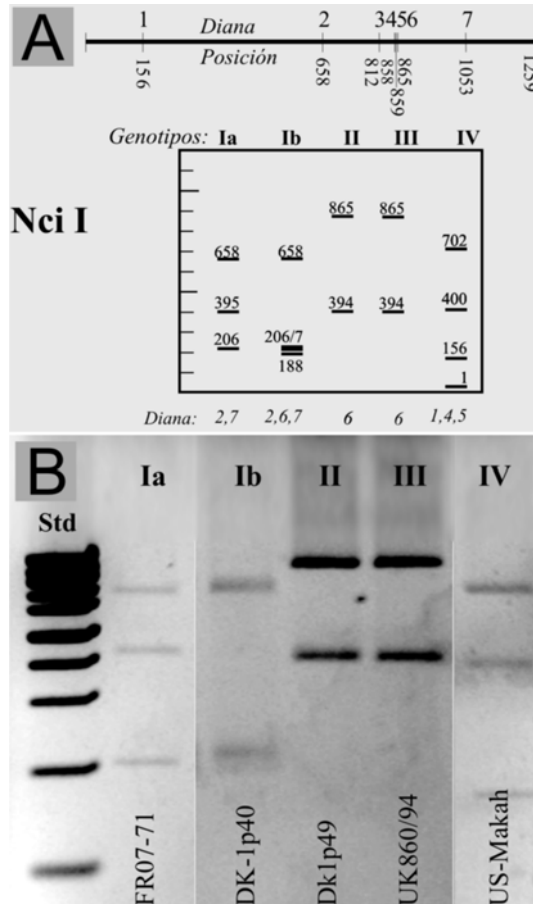


Figura 3.9: RFLP's de VHSV obtenidos con la endonucleasa *Nci* I. **A.** Representación esquemática de las dianas de restricción y la posición de las mismas. **B.** Perfiles electroforéticos obtenidos en los ensayos de restricción con la endonucleasa *Nci* I para una cepa de referencia de cada uno de los genotipos de VHSV. Std: 100 bp DNA ladder, Genecraft.

y 394 pb. Sin embargo, permitió diferenciar entre los dos subgrupos del genotipo I (Ia y Ib), ya que las cepas del subgrupo Ia presentaron dos dianas de restricción, dando lugar a tres fragmentos, de 658, 395 y 206 pb y las del subgrupo Ib mostraron 3 dianas, con resultado de cuatro fragmentos de 658, 206, 207 y 188 pb. Finalmente, el genotipo IV se caracteriza a nivel teórico, por la presencia de 3 dianas de restricción que deben producir cuatro fragmentos, de 702, 400, 156 y 1 pb; sin embargo como se muestra en la figura 3.9B, solo se visualizan las 3 bandas de mayor tamaño, por ser indetectable la banda de 1 pb.

Como resumen, en la tabla 3.7 se muestran los RFLP's generados en los ensayos experimentales con cada enzima. Como podemos observar, los enzimas *Acc I*, *Alu I* y *Cfo I* generaron únicamente tres perfiles, de tal forma que agruparon a los genotipos Ib, II y III (*Acc I*), a los genotipos I y II (*Alu I*), o al genotipo Ia y II por un lado y Ib y III por otro (*Cfo I*). Las endonucleasas *Hpa II* y *Dde I* presentaron 4 RFLP's, pero los resultados con ambas enzimas no siempre pudieron ser reproducidos y ocasionalmente aparecieron diferentes resultados cuando se emplearon los isozimas. Aunque el enzima *Mbo II* generó 5

Tabla 3.7: RFLP's obtenidos con las endonucleasas aplicadas a los genotipos de VHSV.

Endonucleasa	RFLP				
	1	2	3	4	5
<i>Acc I</i>	Ia	Ib, II, III	IV	----	----
<i>Alu I</i>	I ¹ , II	III	IV	----	----
<i>Bsp I286 I</i>	Ia	Ib, II	III	IV	---
<i>Cfo I (Hha I)</i>	Ia, II	Ib, III	IV	----	----
<i>Dde I</i>	I ¹	II	III	IV	---
<i>Eco RI</i>	III	I ¹ , II, IV	----	----	----
<i>Eco RV</i>	I ¹	II	III	IV	---
<i>Hpa II (Msp I)</i>	Ia	Ib	II, III	IV	----
<i>Mbo II</i>	Ia	Ib	II	III	IV
<i>Nci I</i>	Ia	Ib	II, III	IV	----

¹.-Genotipo I, incluye el subgrupo Ia y Ib.

RFLP's con las cepas de referencia, la interpretación de los resultados directamente en un gel de agarosa puede ser difícil, tanto por la falta de coincidencia entre los resultados esperados y los observados para el genotipo II, como por la dificultad de diferenciar las cepas del genotipo I entre sí (subgrupos Ia y Ib) debido al reducido tamaño de las bandas (inferiores a 100 bp) que dificultarían su visualización en geles de agarosa y generarían cierta confusión para diferenciar los RFLPs.

Por último los enzimas *Bsp* 1286 I, *Eco* RV y *Nci* I resuelven la mayoría de los genotipos. Así, *Bsp* 1286 I muestra 4 perfiles electroforéticos, uno para cada genotipo, aunque el *RFLP* 2 agrupa al subgrupo Ib y al genotipo II. El enzima *Eco* RV presenta 3 perfiles diferentes para los genotipos II, III y IV y un único RFLP para el genotipo I (subgrupos Ia y Ib). Con el enzima *Nci* I se obtienen 3 RFLP's para los genotipos Ia y Ib y IV respectivamente y agrupa al genotipo II y III en el mismo RFLP.

Desarrollo de un sistema de genotipado rápido y simple para VHSV

Los resultados obtenidos en los ensayos de análisis de restricción con cada uno de los enzimas indicaron que ninguno de los enzimas ensayados permite diferenciar de forma individual todos los genotipos conocidos; por ello, para el desarrollo de un sistema de genotipado de VHSV se optó por un sistema alternativo en 2 pasos. Dado que los enzimas que generaban 4 o 5 RFLP's permitían la separación de la mayoría de los genotipos, parecían ser los más adecuados para su utilización en este sistema.

Para la selección de los enzimas más adecuados se tuvo en cuenta la sencillez de interpretación y repetibilidad de resultados (aspecto por el que fue descartado el enzima *Mbo* II), así como los análisis de fiabilidad a nivel teórico (robustez), en términos de repetibilidad de resultados con todas las cepas de cada genotipo con secuencias disponibles en GenBank (resultados no mostrados). En

este sentido el único enzima que aportó un 100% de robustez fue *Bsp* 1286I, por lo que fue inmediatamente seleccionada como enzima primaria para el diseño del test de tipado; los restantes enzimas dieron porcentajes inferiores o muy inferiores, principalmente dentro de los genotipos I y III, exceptuando el enzima *Nci* I, con porcentajes de robustez ligeramente inferiores al 100% para los genotipos I y II, por lo que fue seleccionada como enzima secundario.

De este modo, el sistema de genotipado por análisis de restricción en dos pasos (2-SRA) quedó diseñado de la siguiente manera (Tabla 3.8): el análisis de restricción con el enzima *Bsp* 1286I como enzima primario podría dar lugar a tres resultados resolutivos, con aislados de VHSV de los genotipos Ia, III y IV; solo en el caso de cepas de los genotipos Ib y II, que generarían un mismo RFLP, sería necesario aplicar al fragmento original, el enzima secundario *Nci* I, que permite separar ambos genotipos en 2 RFLP's bien diferenciados.

Tabla 3.8: Sistema de genotipado de cepas de VHSV mediante análisis de restricción en 2 pasos (2-SRA).

Enzima 1	RFLP	Genotipo	Enzima 2	RFLP	Genotipo
<i>Bsp</i> 1286I	1	Ia	<i>Nci</i> I	1	Ib
	2	Ib, II		2	II
	3	III			
	4	IV			

Aplicación del método de 2-SRA para aislados de VHSV

En la tabla 3.9 se muestran los RFLP's obtenidos con cada uno de los enzimas ensayados, con los aislados de VHSV objeto de estudio, y una asociación con los genotipos de referencia. Como se observa, solo el enzima *Nci* I proporcionó un tipado homólogo al obtenido en el análisis de secuencias. Es

destacable, además, que los enzimas *Bsp* 1286 I, *Dde* I y *Eco* RV aportaron un tipado de los aislados marinos (excepto el de lenguado) completamente diferenciativo respecto a los demás aislados, e incluso respecto a los genotipos de referencia.

Tabla 3.9: Patrones de restricción característicos obtenidos con endonucleasas (RFLP's) aplicados a los distintos genotipos y aislados de VHSV utilizados en este estudio.

Endonucleasa	Patrones de restricción				
	1	2	3	4	5
<i>Alu</i> I	I ¹ , OM, Ssp, CP, STF, SS, II, GH. SM, SA, SC	III	IV		
<i>Bsp</i> 1286I	Ia, OM, Ssp, CP, STF, SS	Ib, II	III	IV	GH. SM, SA, SC
<i>Cfo</i> I	Ia, OM, Ssp, CP, STF, SS, II, GH. SM, SA, SC	Ib, III	IV		
<i>Dde</i> I	I ¹ , OM, Ssp, CP, STF, SS	II	III	IV	GH. SM, SA, SC
<i>Eco</i> RI	III	Ia (OM, Ssp, CP, STF, SS), Ib, II, GH. SM, SA, SC y IV			
<i>Eco</i> RV	I ¹ , OM, Ssp, CP, STF, SS	II	III	IV	GH. SM, SA, SC
<i>Nci</i> I	Ia, OM, Ssp, CP, STF, SS	Ib	II, III, GH. SM, SA, SC	IV	

¹.-Genotipo I que incluye los subgrupos Ia y Ib.

La aplicación del sistema de tipado 2-SRA a los aislados de VHSV objeto de este estudio reveló que la utilización del primer enzima *Bsp* 1286 I permite la caracterización inequívoca de los aislados pertenecientes al genotipo I, subgrupo Ia (Figura 3.10) se trata de los grupos de aislados continentales, de trucha arcoíris, trucha común, salmón atlántico y boga además del aislado de lenguado. Sin embargo, el patrón obtenido con los aislados de origen marino

(dorada, salmón coho, rodaballo y fletán negro) no se correspondía con ninguno de los perfiles definidos para las cepas de referencia, apreciándose 3 fragmentos de 593, 508 y 158; resultantes de la presencia de 2 dianas de restricción.

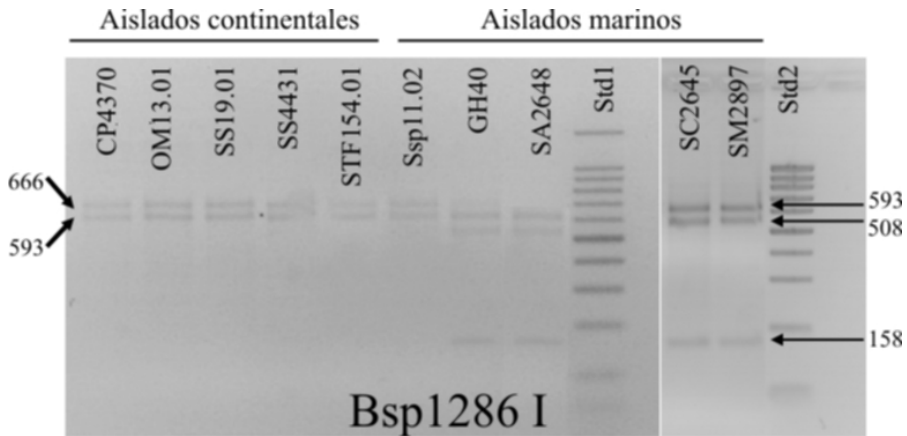


Figura 3.10: Perfiles electroforéticos obtenidos con aislados de VHSV en ensayos de restricción con la endonucleasa *Bsp1286I*. Como estándar se usó Std 1 (*Bench Top 100bp DNA Ladder*, Promega) y Std 2 (*100 bp DNA Ladder*, Genecraft).

La utilización del segundo enzima propuesto para el tipado en dos pasos, el *Nci I* (Figura 3.11), también permitió el tipado de todos los aislados del subgrupo Ia, pero no del resto de aislados de origen marino, ya que presentaban un patrón electroforético igual al obtenido para los genotipos II y III, con una diana de restricción en posición 865 dando lugar a 2 fragmentos de 865 y 394 pb.

Los ensayos realizados con la endonucleasa *Eco RV* permitieron agrupar los aislados objeto de estudio en dos grupos bien definidos, como se puede observar en la figura 3.12. Por una parte, los aislados continentales y el aislado de lenguado mantuvieron el patrón electroforético esperado para cepas pertenecientes al subgrupo Ia, con tres bandas de 658, 395 y 206 pb (aunque

indistinguible del RFLP esperado para el subgrupo Ib), mientras que el resto de aislados (de origen marino) presentaron un patrón electroforético caracterizado por la ausencia de dianas de restricción, observándose un único fragmento que 1259 pb que corresponde a la longitud total de ADNc amplificado.

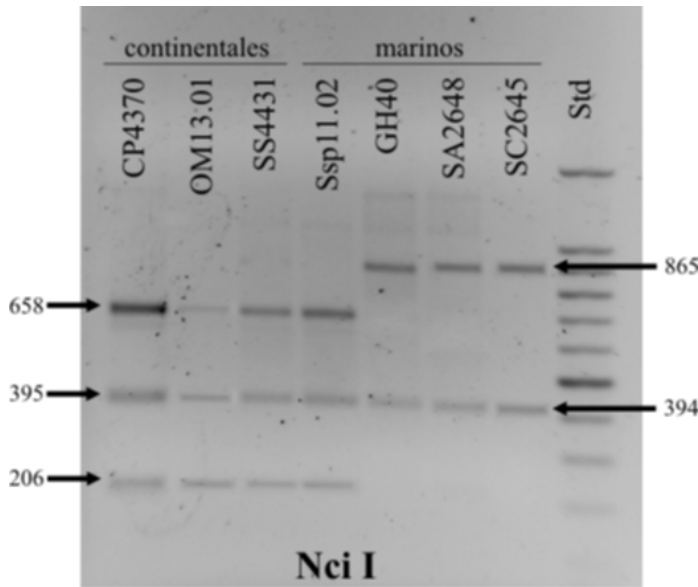


Figura 3.11: Perfiles electroforéticos obtenidos con aislados de VHSV en ensayos de restricción con la endonucleasa *Nci* I. Como estándar de tamaños moleculares se usó Std (*Bench Top 100bp DNA Ladder*, Promega).

Aunque este resultado difiere del patrón que presenta la cepa de referencia empleada en este estudio para el genotipo III, UK860/94 (dos fragmentos de restricción), a nivel teórico otras cepas de referencia del genotipo III se caracterizan por la ausencia de dianas de restricción para este enzima *Eco* RV (resultado no mostrado). Queremos hacer resaltar un resultado interesante obtenido con el aislado marino Ssp11.01 que, a pesar de proceder de lenguado, se agrupó, con ambas enzimas, con los aislados de origen continental y no con los restantes de origen marino.

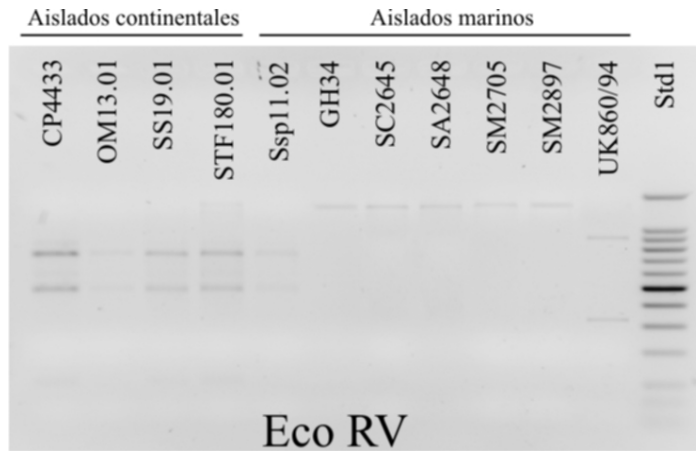


Figura 3.12: Perfiles electroforéticos obtenidos con aislados de VHSV en ensayos de restricción con la endonucleasa *Eco RV*. Como estándar de tamaños moleculares se usó Std1 (*Bench Top 100 bp DNA Ladder*, Promega).

DISCUSIÓN

La existencia de 4 genotipos dentro de VHSV directamente relacionados con el área geográfica de los aislados se ha demostrado en base a estudios filogenéticos, usando tanto el gen N (Snow y col., 1999, 2004) como el gen G (Einer-Jensen y col., 2004, 2006).

Hasta el momento el genotipo III incluía aislados marinos del Mar del Norte y aguas costeras de las Islas Británicas junto con 2 aislados producto de brotes de VHS en granjas de rodaballo de Escocia e Irlanda (Einer-Jensen y col., 2004; Snow y col., 2004), así como un aislado de anguila capturada en el norte de Francia (Thiéry y col., 2002). Los resultados obtenidos en este estudio, tras la secuenciación de un fragmento de 335 nucleótidos de una región

correspondiente al gen N, indican que los aislados de rodaballo y salmón (atlántico y coho) cultivados en las costas gallegas deben ser agrupados dentro del genotipo III. Además, es interesante señalar que los aislados del Flemish Cap se agruparon en este mismo genotipo, extendiendo así el área geográfica comprendida por el genotipo III. El Femish Cap (Terranova), como sabemos, está alejado de las aguas europeas donde se han obtenido el resto de los aislados pertenecientes a este genotipo, sin embargo, la dispersión del virus se puede explicar si se tienen en cuenta los patrones migratorios del fletán. En este sentido los peces pertenecientes a esta especie están ampliamente distribuidos por el Atlántico Norte y sus movimientos migratorios pueden extenderse a grandes distancias que van desde Noruega e Islandia hasta los grandes bancos de Terranova (Vis y col., 1997). Además, las rutas migratorias del salmón atlántico salvaje relacionan directamente, a través de un área de alimentación (Sur de Groenlandia, Islandia y Feroes) a todas las poblaciones de esta especie, desde Canadá a los países escandinavos, y desde Galicia hasta Escocia (Anónimo 2001); por supuesto la interacción de las poblaciones de esta especie con otras especies a lo largo de sus rutas migratorias, podría explicar la diversidad geográfica y de huésped de las cepas del genotipo III.

Los aislados de fletán negro del Flemish Cap (grupo GH) exhiben entre si una variabilidad baja, que podría extrapolarse a la totalidad de la población, lo que sugiere que estas cepas estarían compartiendo un origen común y relativamente reciente.

La inclusión de los aislados gallegos y los de fletán dentro del genotipo III incrementa la variabilidad dentro de este genotipo. De hecho el número de diferencias entre algunos de los aislados de fletán y otros miembros del genotipo III, previamente secuenciados, es del orden de 7 a 10 nucleótidos en un fragmento de 335. En un estudio previo, Snow y col. (2004) mostraron una media de 4 nucleótidos de diferencias en unas 30 cepas de este genotipo, y solo 3 de ellas exhibían unas diferencias similares a las observadas en este estudio.

Los aislados del Flemish Cap muestran una alta similaridad (homologías del 97,4%) con las cepas del genotipo III empleadas como referencia: UK860/94 e IR-F13.02.97. Este alto nivel de homología con dos cepas que han estado implicadas en epizootias en granjas de rodaballo (Ross y col., 1994) advierte sobre el riesgo que las especies marinas de vida libre pueden representar para las piscifactorías de rodaballo, riesgo que ha sido sugerido ya por otros autores (Snow y Smail, 1999; King y col., 2001b; Snow y col., 2004). La homología de los aislados del Flemish Cap es incluso superior con los aislados gallegos (obtenidos de peces cultivados con síntomas de enfermedad), con niveles del 99,8 al 100%, lo que corrobora la relación entre los aislados de peces de vida libre y los cultivados, y cuestiona las normas de la Unión Europea para VHSV, basadas en el establecimiento de zonas autorizadas donde la enfermedad o el agente no han sido detectados. Resulta curioso que los aislados gallegos presenten una mayor homología con los aislados del Flemish Cap, que con aislados más próximos geográficamente y procedentes de la misma especie hospedadora. Dado que esta comparación se ha hecho sobre un fragmento relativamente pequeño, se podría pensar que obtendríamos una mayor resolución de resultados empleando un fragmento más grande y comparando con distintas regiones del genoma, sin embargo Einer-Jensen y col. (2005a) observaron que los resultados eran similares empleando un fragmento del gen N o bien la totalidad de los genes G o NV.

Con respecto a los aislados de origen continental (SS, CP, STF, OM), estos presentan un nivel del 100% de homología con relación a la cepa de referencia del genotipo I, subgrupo Ia (FR07/71) aislada de trucha arcoiris. Es interesante señalar que en este grupo se incluye también la cepa Ssp 11.02, aislada de lenguado, y que hasta la fecha los aislados marinos de Europa se habían agrupado en los genotipos Ib, II y III (Einer-Jensen y col., 2004; Snow y col., 2004).

Para realizar los análisis por RFLP's se escogió el gen G debido sobre todo a la presumiblemente superior presión evolutiva sufrida por este gen, y con la esperanza de observar una mayor variabilidad entre los aislados. Sin embargo, no se esperaba obtener diferencias en el tipado en base a los similares resultados de genotipado obtenidos por otros autores con secuencias completas o parciales de los genes N, P, G o NV (Snow y col., 1999, 2004; Einer-Jensen y col., 2004; 2005).

El tipado mediante endonucleasas de restricción se basa en la presencia de dianas de restricción para cada endonucleasa en puntos distintos del fragmento elegido que generan patrones de restricción (RFLP's) que se puedan correlacionar específicamente con los genotipos establecidos. Así, aunque no hemos encontrado un único enzima que nos permita la diferenciación de todos los genotipos reconocidos para VHSV, hemos diseñado un nuevo método de tipado (2-SRA) de los nuevos aislados virales, sencillo y fiable que puede realizarse simplemente en dos pasos de análisis de restricción. Así, se usaría como primer enzima *Bsp* 1286 I que permite identificar el genotipo al que pertenece el aislado, salvo en el caso de los subgrupo Ib y genotipo II, que presentan el mismo RFLP. Si se obtiene este resultado se deberá aplicar, sobre el fragmento original de 1259 pb, un segundo enzima, el *Nci* I, que permite la distinción entre los aislados de estos dos grupos. En todo caso, analizando nuestros resultados debemos decir que sería posible usar, con resultados satisfactorios, cualquier combinación de 2 enzimas entre los tres siguientes: *Bsp* 1286 I, *Nci* I y *Eco* RV; sin embargo debemos puntualizar que el análisis de robustez, y por lo tanto la fiabilidad, de los resultados aconseja emplear el método de tipado 2-SRA como se indica en este trabajo. Además, se recomienda el uso simultáneo de dos enzimas, cuando pretendemos hacer un análisis de rutina, con el fin de minimizar el riesgo potencial de una clasificación errónea de los aislados, provocado por un potencial error de un enzima; ya que los RFLP's dependen de la presencia de una secuencia exacta que marca el sitio de

reconocimiento de cada enzima, por lo que un solo cambio en esa secuencia podría proporcionar un patrón de restricción diferente al esperado, y conducir a un genotipado alterado.

Es interesante destacar que los aislados que hemos clasificado, en base a la secuenciación de un fragmento del gen N, como miembros del genotipo III (entre ellos los aislados de fletán, rodaballo y dorada), no se clasificaron, mediante RFLP's, dentro del genotipo III con la mayoría de los enzimas, mientras que algunos produjeron un RFLP específico y diferenciativo. Esto significa que dentro del genotipo III existe una alta diversidad y corrobora los resultados obtenidos por secuenciación. Lejos de cuestionar la fiabilidad del método de RFLP's, de los resultados obtenidos se deduce la existencia de dos grupos dentro del genotipo III; de hecho, es posible esta diferenciación empleando determinados enzimas, y los resultados son característicos y distinguibles de otros genotipos.

El análisis mediante RFLP's, como se expone en este trabajo, permite una correlación directa con el genotipado por secuenciación ahorrando en tiempo y recursos económicos. En este sentido, Einer-Jensen y col. (2005b) han publicado un estudio similar, donde analizan un elevado número de aislados de VHSV en base a la secuencia del gen G y proponen el uso de 3 enzimas para diferenciar los genotipos de VHSV. Aunque indudablemente se trata de un trabajo novedoso y útil, el método que se propone en el presente trabajo simplifica el tipado de VHSV ya que en la mayoría de los casos sería suficiente un solo enzima para diferenciar los genotipos, y sólo si se obtiene un patrón de RFLP determinado sería necesario el uso de un segundo enzima para separar entre genotipos.

En resumen, los resultados obtenidos por secuenciación indican que los aislados continentales de VHSV, junto con el obtenido de lenguado, pertenecen al genotipo I, concretamente al subgrupo Ia, y los aislados marinos al genotipo III. La inclusión de los aislados marinos en el genotipo III incrementa la

variabilidad que existe dentro de este genotipo ya reconocida por Snow y col. (2004). Estos datos han sido corroborados por los resultados obtenidos mediante RFLP's. Por último, la técnica 2-SRA, de análisis de RFLP's en dos pasos se presenta como una alternativa rápida y relativamente simple al análisis de las secuencias para el tipado de nuevos aislados de VHSV.

CAPÍTULO 4:

**SUSCEPTIBILIDAD DE RODABALLO *Scophthalmus*
maximus Y TRUCHA COMÚN *Salmo trutta fario* A
AISLADOS DE VHSV**

RESUMEN

En este capítulo se ha examinado la susceptibilidad de ejemplares de rodaballo y trucha común ante cepas del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) de distintos orígenes.

En las inoculaciones experimentales de rodaballo se utilizaron ejemplares de 25 g. Se realizaron 2 ensayos; en el primero se realizó una inoculación intraperitoneal con 2 dosis de virus (10^5 y 10^6 TCID₅₀ / pez) a 2 temperaturas (8 y 15 °C); en el segundo experimento se utilizaron 3 vías de infección: inyección intraperitoneal (IP), Cohabitación (Coh) e Inmersión (I), con una sola dosis (1×10^5 TCID₅₀ / pez) y se probó asimismo el efecto de la temperatura (8 y 15 °C). Los resultados obtenidos demuestran que las cepas empleadas son virulentas para rodaballo por i.p., mientras que son poco patógenas por inmersión. Sin embargo, sí se demostró el establecimiento de una infección subclínica en los peces infectados por inmersión ya que se pudo detectar el virus, y en algunos casos aislarlo, de los grupos de individuos supervivientes. Asimismo, los síntomas clínicos y la mortalidad observada en los ensayos de cohabitación con la cepa GH40 demostraron la transmisión horizontal del virus y el incremento de la virulencia para rodaballo tras su pase por pez.

En los ensayos con trucha común se utilizaron ejemplares de unos 10 a 12 cm y se ensayaron los 3 modelos de infección descritos a ambas temperaturas. De este ensayo debemos destacar que, aunque no se apreciaron signos externos de enfermedad, ni mortalidad en ninguno de los grupos, sí se demostró la entrada y replicación viral en los peces mediante la detección por nested-PCR. Asimismo se ha demostrado por primera vez la supervivencia de un aislado marino de VHSV en agua dulce y la transmisión horizontal de este aislado en trucha común.

INTRODUCCIÓN

La septicemia hemorrágica viral (VHS) es la enfermedad más grave que puede producirse en una explotación industrial de trucha arcoiris, tanto desde el punto de vista patológico como económico. Al igual que otros virus de salmónidos, el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) afecta especialmente a los individuos más jóvenes de la población, causando una enfermedad aguda con mortalidades en alevines que pueden llegar al 90%. No se han observado diferencias entre sexos en cuanto a la enfermedad, pero sí en el curso de la infección, ya que los portadores asintomáticos son más frecuentemente hembras. El punto de entrada del virus son las branquias, donde puede detectarse ya a los 2 días de la infección; otro punto de entrada, aunque en menor medida, es por el tracto gastrointestinal; por otro lado, la eliminación del virus se produce principalmente por la orina, lo que demuestra el relevante papel que presenta el riñón en la dispersión de la enfermedad (Neukirch, 1984, 1986), e incluso a través del mucus de la piel. La transmisión se realiza de forma horizontal, ya sea directa a través del contacto entre peces o indirecta, por la manipulación inadecuada por parte del piscicultor, o por medio de otras especies animales que actuarían como reservorios de la enfermedad (Wolf, 1988).

En los últimos años se ha comprobado que esta enfermedad afecta también a peces no salmónidos. Se han descrito epizootias en especies de agua dulce en Centro Europa (Meier y col., 1994), así como en distintas especies de peces marinos salvajes y cultivados a lo largo del hemisferio norte, en Alemania (Schlotfeldt y col., 1991), Alasca (Meyers y col., 1992, 1994), Escocia (Ross y col., 1994) o Japón (Takano y col., 2000).

Como su nombre indica, la VHS es una enfermedad de tipo hemorrágico. Se caracteriza por producir graves lesiones en los órganos productores de las células sanguíneas y en los vasos sanguíneos de los animales infectados. De

hecho, la multiplicación del virus se produce en las células endoteliales del sistema vascular sobre todo de riñón y bazo, donde el título infectivo es más alto y comienza la viremia. Es reseñable el elevado porcentaje de reaislamiento del virus en cerebro, lo que explicaría los signos nerviosos con que cursa el estado clínico de VHS.

La patología de la enfermedad está descrita ampliamente en trucha arcoiris, en la que transcurre en tres formas, conocidas como *aguda*, *crónica* y *nerviosa*, seguidas por el estado de portador de los peces supervivientes. El estado *agudo*, se manifiesta en los peces de los 0 a 30 días, a temperaturas entre 8 y 12 °C y se caracteriza por la aparición de peces enfermos en el fondo del tanque, o con natación en espiral; a continuación se produce un progresivo aletargamiento de los animales que evitan toda actividad y se dejan llevar por el movimiento del agua. Externamente se observa oscurecimiento de la piel y exoftalmia bilateral; las branquias aparecen pálidas, y en la base de las aletas y en la piel se pueden ver pequeñas manchas hemorrágicas. Internamente la cavidad abdominal está llena de líquido seroso. Los análisis hematológicos demuestran un significativo descenso en el recuento de eritrocitos y del nivel de hemoglobina (Wolf, 1988). El estado *crónico* refleja una infección persistente sin signos externos evidentes; las truchas supervivientes aparecen con el abdomen retraído y una contracción clara en la línea longitudinal del cuerpo; desaparecen la anemia branquial, la exoftalmia y la distensión abdominal; se produce además un descenso en el nivel de glucosa y los valores de mortalidad son bajos (Řehulka, 2003). La fase *nerviosa* está caracterizada por la natación errática, que se asocia con el tropismo que presenta el virus por el cerebro, donde puede llegar a alcanzar un título de 1×10^9 TCID₅₀/g (Smail, 1999). Aunque las causas del tropismo nervioso se desconocen, se cree que puede estar relacionado con la interacción específica de la glicoproteína de estos virus envueltos con la membrana lipoproteica de las células diana del tejido nervioso. En este sentido, Bearzotti y col. (1995) identificaron dos aminoácidos en la

glicoproteína de VHSV que estarían asociados con la reducción de virulencia y el incremento del tropismo por el tejido nervioso.

Peces no salmónidos, como lucio, coregono o salvelino europeo, que sufren epizootias debidas a VHSV exhiben signos externos y lesiones histológicas idénticas a las descritas para trucha arcoiris (Meier y col., 1994). Por su parte, la sintomatología de los peces marinos, en especial de rodaballo, se caracteriza por una marcada exoftalmia y distensión abdominal, con hemorragias del músculo esquelético, de la retina, del tracto digestivo y de la piel. El examen histológico revela colapso generalizado del músculo cardíaco y necrosis muy marcadas en las fibras ventriculares así como en las células del hígado (Ross y col., 1994; Brudeseth y col., 2005). El ataque cardíaco es probablemente la primera causa de muerte en los rodaballos infectados por VHSV, patología que no ha sido descrita en salmónidos (Smail, 1999; Brudeseth y col., 2005).

Es conocido que la temperatura es determinante entre los numerosos factores ambientales que pueden influir sobre el desencadenamiento de la enfermedad. La VHS es una enfermedad de aguas frías, ya que la temperatura óptima para la replicación del virus en el pez varía entre los 9 y los 12 °C. Las epizootias más frecuentes ocurren durante la primavera y el otoño, cuando la temperatura del agua es de 10 a 12 °C (Nicholson, 1982) coincidiendo con la temperatura óptima para la replicación del virus. Por otro lado la multiplicación del virus en trucha arcoiris se inhibe a temperaturas superiores a 15 °C, de modo que a 20 °C el virus es ya indetectable a las dos semanas de infección (Jørgensen, 1982). En contraposición la infección persiste hasta 400 días en trucha arcoiris mantenidas a 4 °C (Neukirch, 1986). Las epizootias en peces no salmónidos se han desarrollado también a temperaturas de 10-12 °C (Meier y col., 1994), mientras que en rodaballo se produjeron cuando la temperatura del agua oscilaba entre los 13 y 15 °C (Schlotfeldt y col., 1991; Ross y col., 1994).

Además, otros factores ambientales (salinidad, contaminación...), de manipulación o factores inherentes al pez (estatus nutricional, edad...) pueden afectar al desarrollo de la enfermedad. Entre los factores inherentes al pez, se ha observado que las truchas se vuelven más resistentes a la infección por VHSV a medida que se incrementa su edad y peso. Así, mientras que en alevines infectados con una cepa virulenta de VHSV la mortalidad puede alcanzar entre el 80 y el 100% a temperatura óptima, bajo las mismas condiciones supondrían una mortalidad del 10-50% si se trata de juveniles o adultos (Smail, 1999). Sin embargo, las epizootias naturales descritas en rodaballo se han notificado en peces adultos, con tamaños que pueden oscilar de los 500 a 2.000 g de peso (Schlotfeldt y col., 1991; Ross y col., 1994).

El elevado número de aislamientos de VHSV procedente de diferentes especies de peces, especialmente marinos, tanto de vida libre como cultivados, asintomáticos o con signos evidentes de enfermedad (Tabla 4.1), ha propiciado el desarrollo de numerosos estudios encaminados a determinar el grado de virulencia de algunos de estos aislados sobre distintas especies de peces, así como la susceptibilidad de determinadas especies marinas de interés comercial para cepas de VHSV de distinto origen (Tabla 4.2).

En este sentido, se ha comprobado que aislados de VHSV de origen marino no son patógenos o muestran poca virulencia en trucha arcoiris (Snow y col., 2000; Ito y col., 2004; Skall y col., 2004) aunque se advierte de un incremento de la virulencia de estos virus en los sucesivos pases en el pez (Snow y col., 2000). Por otra parte, se ha observado la alta susceptibilidad del rodaballo frente a cepas de VHSV de origen continental (Castric & Kinkelin, 1984), así como ante distintas cepas de origen marino (Snow y col., 1999b, 2005a; King y col., 2001b; Brudeseth y col., 2005).

Tabla 4.1: Especies de las cuales se ha aislado el virus VHSV

Hospedador	Nombre científico	Referencia
Trucha arcoiris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Jensen, 1965
Trucha salvelino	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Rasmussen, 1965
Salmón atlántico	<i>Salmo salar</i>	Rasmussen, 1965
Trucha lacustre	<i>Salvelinus namaycush</i>	Ghittino, 1973
Bacalao	<i>Gadus morhua</i>	Jensen y col., 1979
Salvelino europeo	<i>Thymallus thymallus</i>	Wizigmann y col., 1980
Lucio	<i>Esox lucius</i>	Meier y Jorgensen, 1980
Coregono	<i>Coregonus sp.</i>	Meier y col. 1986
Salmón <i>coho</i>	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Brunson y col., 1989
Salmón <i>chinook</i>	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Hopper, 1989
Rodaballo	<i>Scophthalmus maximus</i>	Schlotfeldt y col., 1991
Bacalao del pacífico	<i>Gadus macrocephalus</i>	Meyers y col., 1992
Trucha común	<i>Salmo trutta fario</i>	de Kinkelin y Le Berre, 1977
Anguila	<i>Anguilla anguilla</i>	Castric y col., 1992
Arenque del pacífico	<i>Clupea harengus pallasii</i>	Meyers y col., 1994
Perca	<i>Cymatogaster aggregata</i>	Traxler y col., 1995
Arenque atlántico	<i>Clupea harengus</i>	Dixon y col., 1997
Espadín	<i>Sprattus sprattus</i>	Mortensen y col., 1999
Pez plata (Argentina)	<i>Argentina sphyraena</i>	Mortensen y col., 1999
Merlán	<i>Merlangius merlangus</i>	Mortensen y col., 1999
Faneca	<i>Trisopterus esmarkii</i>	Mortensen y col., 1999
Barbada	<i>Rhinonemus cimbrius</i>	Mortensen y col., 1999
Bacaladilla	<i>Micromesistius poutassou</i>	Mortensen y col., 1999
Abadejo de Alasca	<i>Theragra chalcogramma</i>	Meyers y col., 1999
Bolo del pacífico	<i>Ammodytes hexapterus</i>	Hershberger y col., 1999
Bacalao negro	<i>Anaplopoma fimbria</i>	Traxler y col., 1999
Sardineta	<i>Sardinops sagax</i>	Traxler y col., 1999
Lenguado del pacífico	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Takano y col., 2000
Eglefino	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Smail, 2000
Eperlano del Pacífico	<i>Thaleichthys pacificus</i>	Kaufman y Holt, 2001
Capelán	<i>Trisopterus minutus</i>	King y col., 2001a
Fletán negro	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Dopazo y col., 2002
Bolo japonés	<i>Ammodytes personatus</i>	Watanabe y col., 2002
Caballa del pacífico	<i>Scomber japonicus</i>	Hedrick y col., 2003
Limanda	<i>Limanda limanda</i>	Skall y col., 2005
Bolo	<i>Ammodytes sp</i>	Skall y col., 2005
Lubina americana	<i>Morone saxatilis</i>	Gagné y col., 2005
Trucha marrón	<i>Salmo trutta trutta</i>	Gagné y col., 2005
Espinillo	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Gagné y col., 2005
<i>Mummichogs</i>	<i>Fundulus heterocitus</i>	Gagné y col., 2005
Lucio americano	<i>Esox masquinongy</i>	Elsayed y col., 2006

Tabla 4.2: Especies que muestran susceptibilidad experimentalmente ante VHSV

Hospedador	Referencia
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Castric & de Kinkelin, 1984
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Snow y col., 1999b, 2005b; Bowden, 2003
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Isshiki y col., 2003
<i>Epinephelus akaara</i>	Isshiki y col., 2003
<i>Sebastes schlegelii</i>	Isshiki y col., 2003
<i>Pagrus major</i>	Ito y col., 2004
<i>Seriola quinqueradiata</i>	Ito y col., 2004

OBJETIVO

El objetivo de este capítulo ha sido conocer el grado de virulencia, sobre rodaballo y trucha común, de aislados de VHSV de distintos orígenes, utilizando como control dos cepas de referencia altamente virulentas para cada una de ambas especies.

MATERIAL Y METODOS

LÍNEAS CELULARES Y AISLADOS VIRALES

La línea celular utilizada para la propagación viral fue EPC (Epitelioma papuloso de carpa) que se cultivó en medio EMEM suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y antibióticos, tal y como se ha descrito en el capítulo 1. Las células se propagaron a una temperatura óptima de crecimiento de 25 °C

hasta alcanzar la semiconfluencia celular. La incubación de los tapices infectados se realizó a 15 °C hasta la visualización del ECP; momento en el que se recogieron los restos del tapiz en suspensión con el medio de cultivo. Esta suspensión se tituló mediante el método de TCID₅₀, según se ha descrito en capítulos anteriores.

Se utilizaron 3 aislados de VHSV de distintos orígenes y dos cepas de referencia (Tabla 4.3). Los aislados virales empleados en este estudio fueron: GH40, obtenido a partir de ejemplares de fletan negro (*Reinhardtius hippoglossoides*) aparentemente sanos capturado en el Flemish Cap (Dopazo y col., 2002); SM2897, procedente de ejemplares de rodaballo cultivado que exhibieron úlceras en la piel y STF170.01, obtenido a partir de trucha común asintomática cultivada en Galicia. Las cepas de referencia utilizadas con fines comparativos fueron UK860/94, cepa altamente patógena para rodaballo que fue aislada de una epizootia en una piscifactoría de rodaballo en Escocia (Ross y col., 1994) y FR07/71, una cepa altamente virulenta aislada de trucha arcoiris (Le Berre y col., 1977).

Tabla 4.3: Descripción de los virus ensayados en el presenta estudio.

Cepa	Genotipo	Origen	Hospedador	Año	Referencia
FR07/71	Ia	Francia	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1977	LeBerre y col. 1977
STF170.01	Ia	Galicia	<i>Salmo trutta fario</i>	2001	Este trabajo
UK860-94	III	Escocia	<i>Scophthalmus maximus</i>	1994	Ross et al. 1994
SM2897	III	Galicia	<i>Scophthalmus maximus</i>	1995	Este trabajo
GH40	III	Flemish cap	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	1994	Dopazo y col. 2002

INFECCIONES EXPERIMENTALES EN RODABALLO (*Scophthalmus maximus*)

En este ensayo se utilizaron 3 aislados de origen marino: GH40, SM2897 y la cepa de referencia UK860/94.

Infección experimental 1

Se emplearon 220 rodaballos de unos 25 g de peso obtenidos de una granja comercial, que se dividieron en dos grupos y se mantuvieron en las instalaciones del Instituto de Acuicultura durante un periodo de 15 días para adaptarlos a la temperatura deseada (8 °C ó 15 °C). Antes de la infección experimental, se procesaron 20 individuos (10 de cada grupo) para realizar un análisis virológico y descartar la presencia de VHSV, IHNV (virus de la necrosis hematopoyética infecciosa) e IPNV (virus de la necrosis pancreática infecciosa).

Durante la duración del ensayo, la temperatura del agua osciló un máximo de $\pm 0,5$ °C y la salinidad se mantuvo en 35‰, los peces se alimentaron diariamente.

Una vez aclimatados, los peces se dividieron en 6 tanques (30 peces en cada uno) identificados por un número, indicativo de la cepa inoculada (1 para la cepa UK860/94, 2 para GH40 y 3 para SM2897) y una letra (A o B) correspondiente a la temperatura de mantenimiento (8 ó 15 °C respectivamente). Todos los peces recibieron una inyección intraperitoneal de 0,1 ml de suspensión viral; la mitad de los individuos de cada tanque se marcaron y se inocularon con una dosis de 1×10^6 TCID₅₀ por pez (dosis alta), mientras que la otra mitad recibió una dosis de 1×10^5 TCID₅₀ por pez (dosis baja).

Como control negativo, a cada temperatura se inocularon 10 peces con 0,1 ml del sobrenadante de un cultivo de células EPC no infectado.

Infección experimental 2

Para este ensayo se emplearon un total de 300 rodaballos de unos 25 g, de un origen diferente al de los peces utilizados en el experimento anterior. Como en el experimento anterior, se dividieron en dos grupos para su aclimatación gradual a la temperatura deseada (8 °C y 15 °C) durante unos 15 días; a cada temperatura, un grupo de 10 individuos fueron sacrificados y procesados para el análisis virológico.

En este segundo diseño experimental se utilizaron 3 vías de infección: inyección intraperitoneal (IP), cohabitación (Coh) e inmersión (I).

Inoculación intraperitoneal e infección por cohabitación. Tal y como se describió en el experimento anterior, los rodaballos se distribuyeron en 6 tanques (30 peces en cada tanque) identificados por un número y una letra indicativos de la cepa inoculada y la temperatura de mantenimiento (8 y 15 °C). De cada tanque se retiraron 15 individuos que se inocularon con 0,1 ml de la suspensión viral ajustada a un título de 1×10^5 TCID₅₀ por pez, se marcaron para su identificación y se devolvieron a los tanques para cohabitar con los otros 15 peces (no inoculados) en una proporción 1:1. Como control negativo, para cada temperatura se emplearon 10 peces, que recibieron, mediante inyección i.p., una cantidad de 0,1 ml del sobrenadante de un cultivo de células EPC no infectado.

Infección por inmersión. En este experimento se utilizaron 60 rodaballos distribuidos en 6 tanques (10 peces/tanque) identificados como en el ensayo anterior; los rodaballos se expusieron a una

concentración viral de 1×10^5 TCID₅₀, en un volumen de 5 l, durante 3 horas. A continuación se incrementó el volumen de agua hasta alcanzar los 30 l por tanque. Como control negativo se utilizaron 10 rodaballos por cada temperatura, que se sometieron a las mismas condiciones de inmersión en agua y se expusieron al sobrenadante de un cultivo de células EPC no infectadas.

INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN TRUCHA COMÚN (*Salmo trutta fario*)

En este ensayo se utilizó un aislado continental STF170.01, un aislado de origen marino GH40 y la cepa de referencia de origen continental FR07/71.

Infección experimental 3

Se emplearon un total de 300 truchas de unos 10-12 cm, que fueron proporcionadas por el *Servicio de Protección da Natureza* de la Consellería de Medio Ambiente (Xunta de Galicia). Los peces, como en los experimentos anteriores, se dividieron en dos grupos (150 peces en cada uno) para su aclimatación gradual a la temperatura deseada (8 °C y 15 °C) durante 15 días. Antes de la infección experimental, un grupo de 10 individuos de cada temperatura fue sacrificado y procesado para proceder al análisis virológico. Al igual que en el experimento anterior se utilizaron 3 vías de infección: inyección intraperitoneal (IP), cohabitación (Coh) e inmersión (I).

Inoculación intraperitoneal e infección por cohabitación. Los peces se dividieron en 6 tanques (30 truchas en cada tanque) identificados por un número, indicativo de la cepa inoculada (1 para la cepa FR07/71, 2

para la cepa GH40 y 3 para la STF170.01) y una letra (A o B) correspondiente a la temperatura de mantenimiento (8 o 15 °C, respectivamente). De cada tanque se retiraron 15 individuos que se inocularon con 0,1 ml de la suspensión viral ajustada a un título de 1×10^5 TCID₅₀ por cada pez, se marcaron para su identificación y se devolvieron a los tanques para cohabitar con otras 15 truchas no inoculadas en una proporción 1:1. Como control negativo se emplearon 10 truchas por cada temperatura, que recibieron, mediante inyección i.p. una cantidad de 0,1 ml del sobrenadante de un cultivo de células EPC no infectado.

Infección por inmersión. En este experimento se utilizaron 60 truchas que se distribuyeron en 6 tanques (10 truchas/tanque) y que se identificaron como se describió en el experimento anterior. Los peces se expusieron a una concentración viral de 1×10^5 TCID₅₀ en un volumen de 5 l durante 3 horas. A continuación se incrementó el volumen de agua hasta alcanzar los 30 l por tanque. Como control negativo se utilizaron 10 truchas por cada temperatura, que se sometieron a las mismas condiciones de inmersión en agua y se expusieron al sobrenadante de un cultivo de células EPC no infectadas.

EXAMEN VIROLÓGICO

Los peces se observaron diariamente para comprobar si presentaban algún tipo de síntoma característico de la enfermedad, así como para retirar las bajas. Una vez retirados los peces muertos se extrajeron asépticamente los órganos (bazo y riñón) y se almacenaron a -80 °C en lotes de 5 individuos hasta su análisis. En el caso de las truchas también se retiraron los cerebros, que se conservaron y analizaron separadamente del resto de los tejidos. El ensayo se finalizó a los 60 días

momento en el que se sacrificaron los peces supervivientes y se procedió al procesamiento de todas las muestras.

Aislamiento viral

Las muestras de tejidos (bazo, riñón y cerebro) se procesaron para su inoculación en cultivo celular siguiendo las indicaciones de la Comisión Europea (2001/183/EC). Las muestras se inocularon en monocapas semiconfluentes de células EPC tal y como se describe en el capítulo 2. La identidad de los aislados virales se confirmó mediante RT-PCR, tal y como se describe a continuación.

RT-PCR

Para la extracción del RNA total a partir de cultivos celulares se empleó el método Trizol LS-Reagent (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante como se describe en el capítulo 1. De modo similar se extrajo el ARN total a partir de los tejidos de peces.

La RT-PCR se llevó a cabo con el kit comercial SuperScriptTM III One-Step RT-PCR system with Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen), siguiendo el protocolo indicado en el capítulo 1 y utilizando la pareja de cebadores *VHSV-cm3a/3b* (a una concentración final de 1 μ M). Los productos de RT-PCR se visualizaron en geles de agarosa 1,5%.

Nested-PCR

La reacción se llevó a cabo utilizando 8 μ l del producto de RT-PCR purificado mediante el sistema *Gel extraction device filtrate vial* (Millipore), y los dos cebadores internos *VHSV-cm3a/b intro* siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 1.

RESULTADOS

Los ensayos realizados previamente a la infección experimental confirmaron que los peces utilizados, de ambas especies ensayadas, estaban libres de virus VHSV, IHNV e IPNV. Los peces empleados como control permanecieron vivos durante todo el experimento y no mostraron síntomas externos o internos de enfermedad. Al final del ensayo estos mismos peces control fueron sacrificados, no habiéndose detectado presencia de VHSV en ninguno de los individuos, mediante RT-PCR seguida de nested-PCR.

Infección experimental 1

Las cinéticas de mortalidad observada a las 2 temperaturas ensayadas (8 y 15 °C) se muestran en las figuras 4.1 y 4.2.

Como se observa en la figura 4.1, a 15 °C las primeras mortalidades se produjeron a los 5 días p.i. en el grupo inoculado con la dosis alta (1×10^6 TCID₅₀) de la cepa UK860/94. En los peces inoculados con las cepas GH40 y SM2897 las mortalidades empezaron a partir de los días 6 y 9 p.i. respectivamente. Sin embargo, en los tanques mantenidos a 8 °C no se detectó mortalidad antes de los 11-13 días en los grupos de peces inoculados con las dosis altas y 11-19 días con las dosis bajas (Figura 4.2).

La mortalidad acumulada en los peces inoculados con las cepas UK860/94 y GH40 a la temperatura de 15 °C alcanzó el 100% tanto con la dosis alta como con la baja (Tabla 4.4); sin embargo, es importante destacar que la máxima mortalidad se alcanzó mucho antes (a los 13 y 15 días p.i.) a la dosis más alta (Figura 4.1 y Tabla 4.4), retrasándose entre 2 y 3 semanas más a la dosis de 1×10^5 TCID₅₀. También es destacable el hecho de que a 8 °C se logró el 100% de mortalidad cuando se empleó la dosis alta con cualquiera de las tres cepas del virus (Figura 4.2 y Tabla 4.4).

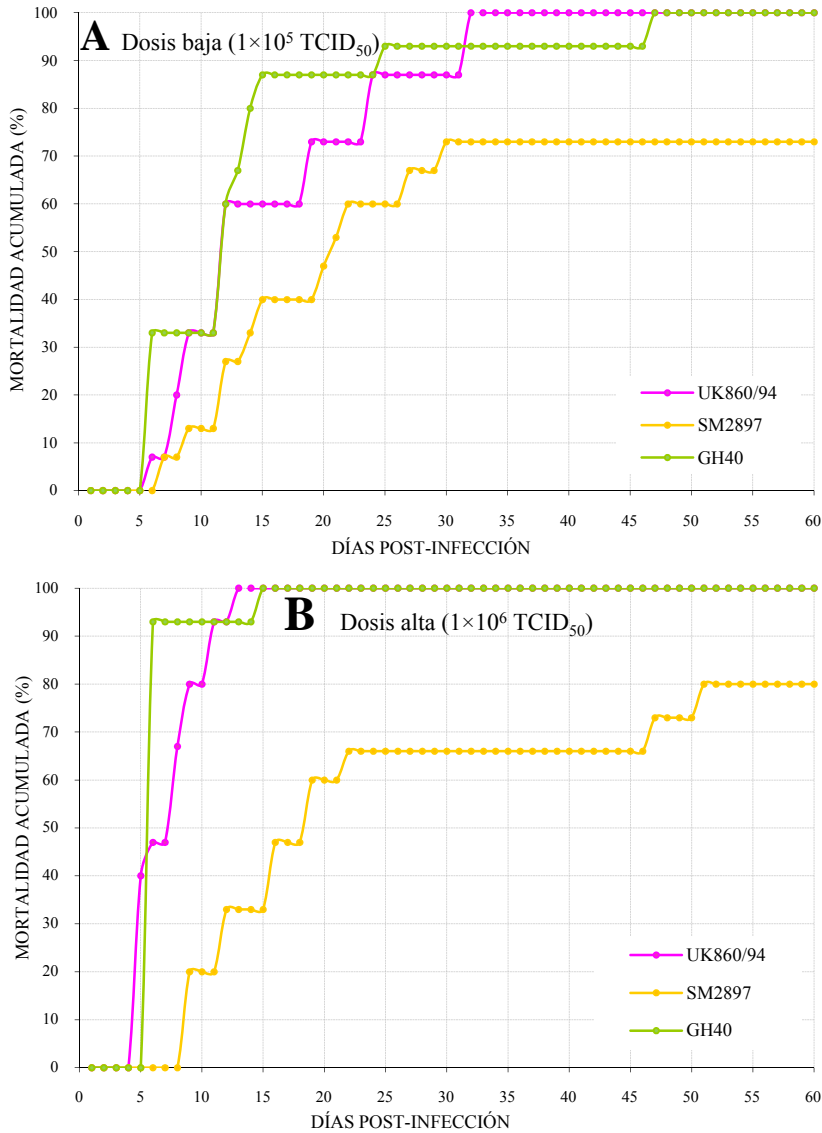


Figura 4.1: Cinética de mortalidad acumulada (a 15 °C) en peces inoculados mediante i.p. con los aislados de VHSV UK860/94, SM2897 o GH40. Los virus se administraron en un volumen de inoculo de 100 μ l, en dosis de 1×10^5 TCID₅₀ (A: dosis baja) o 1×10^6 TCID₅₀ (B: dosis alta).

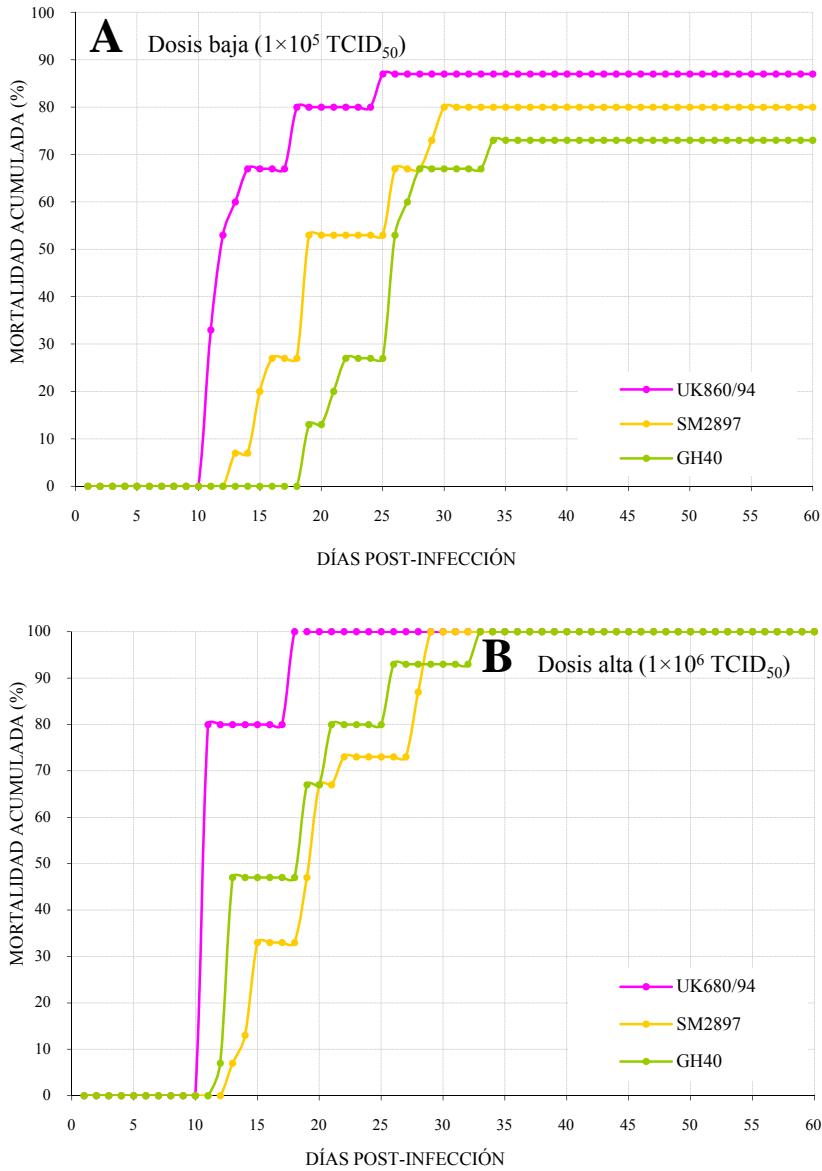


Figura 4.2: Cinética de mortalidad acumulada (a 8 °C) en peces inoculados mediante i.p. con los aislados de VHSV UK860/94, SM2897 o GH40. Los virus se administraron en un volumen de inóculo de 100 µl, en dosis de 1×10^5 TCID₅₀ (**A**: dosis baja) o 1×10^6 TCID₅₀ (**B**: dosis alta).

Las mortalidades causadas por la dosis alta del aislado SM2897 no empezaron a observarse hasta los 9 días post-infección en los peces mantenidos a 15 °C y los 13 días en los incubados a 8 °C. En lo que respecta a esta cepa, se observó una clara correlación entre nivel de mortalidad, temperatura y dosis ensayada. Así, mientras el 100% de los peces inoculados con la dosis alta y mantenidos a 8 °C habían muerto a los 29 días, a 15 °C sólo se observaba un 66% de mortalidad, alcanzando el nivel máximo, por debajo del 100% (80%), a los 51 días (Figura 4.1 y Tabla 4.4). La inoculación con la dosis baja proporcionó valores de mortalidad entre el 73 y el 80% a 15° y 8 °C, respectivamente.

Tabla 4.4: Mortalidad acumulada en rodaballo por efecto de 3 cepas de VHSV a dos temperaturas.

Cepa	Temperatura	i.p. (10 ⁶) ^a		i.p. (10 ⁵)	
		Mortalidad ^b	d.p.i. ^c	Mortalidad	d.p.i.
GH40	8 °C	100	12-33	73.3	19-34
	15 °C	100	6-15	100	6-47
SM2897	8 °C	100	13-29	80	13-30
	15 °C	80	9-51	73.3	7-30
UK860/94	8 °C	100	11-18	86.7	11-25
	15 °C	100	5-13	100	6-32

^a Dosis inoculada mediante i.p. y expresada como TCID₅₀ por pez.

^b Mortalidad máxima acumulada, expresada en porcentaje.

^c Días post-infección (desde la primera baja hasta alcanzar la máxima mortalidad acumulada).

En general, los individuos muertos a los primeros días p.i. no exhibieron signos de enfermedad, mientras que a partir de los días 10-15 la mayoría

de los peces muertos mostraron los signos típicos de infección por VHSV, como exoftalmia, hemorragias en la zona de las aletas y alrededor de los ojos y oscurecimiento de la piel. Además, en el grupo de peces inoculados con el aislado GH40 se apreció una clara distensión abdominal y acumulación de líquido ascítico.

El virus se detectó por RT-PCR en todos los lotes de peces muertos (Tabla 4.5 y Figura 4.3), así como en los lotes de peces supervivientes,

Tabla 4.5: Resumen de resultados obtenidos tras la infección de *Scophthalmus maximus* (vía i.p.) con cepas de VHSV.

G ^a	Dosis ^b (T ⁹)	CEPA														
		GH40				SM2897					UK860/94					
		dpi ^c	M ^d	P ^e	N ^f	C ^g	dpi	M	P	N	C	dpi	M	P	N	C
1	10 ⁶ (8 °C)	12-13	5	+	+	+	13-15	5	+	+	+	10-11	5	+	+	+
2		17-19	5	+	+	+	18-20	5	+	+	+	10-11	5	+	+	+
3		20-33	5	+	+	+	22-29	5	+	+	+	11-18	5	+	+	+
4	10 ⁵ (8 °C)	19-26	5	+	+	+	13-16	5	+	+	+	11	5	+	+	+
5		26-28	5	+	+	+	19-26	5	+	+	+	12-14	5	+	+	+
6		33-34	1	+	+	-	28-30	2	-	-	-	18-25	3	+	+	+
7	10 ⁶ (15 °C)	6-7	5	+	+	+	9-12	5	+	+	+	5	5	+	+	+
8		6-7	5	+	+	+	15-19	5	+	+	+	5-8	5	+	+	+
9		7-15	5	+	+	+	46-51	2	+	+	-	9-13	5	+	+	+
10	10 ⁵ (15 °C)	6-7	5	+	+	+	7-14	5	+	+	-	6-9	5	+	+	+
11		11-13	5	+	+	+	15-27	5	+	+	+	12	5	+	+	+
12		14-47	5	+	+	+	29-30	1	+	+	-	19-32	5	+	+	+

^a Grupo de 5 peces usados para la detección y aislamiento.

^b Dosis inoculada expresada como TCID₅₀ por pez.

^c Días post-infección.

^d Número de peces muertos en cada grupo de 5 individuos.

^e Detección mediante RT-PCR y visualización del producto de amplificación.

^f Detección mediante RT-PCR seguido de nested-PCR.

^g Desarrollo de efecto citopático en células EPC.

con la excepción de un lote correspondiente a peces inoculados con la dosis baja de la cepa SM2897 mantenidos a 8 °C.

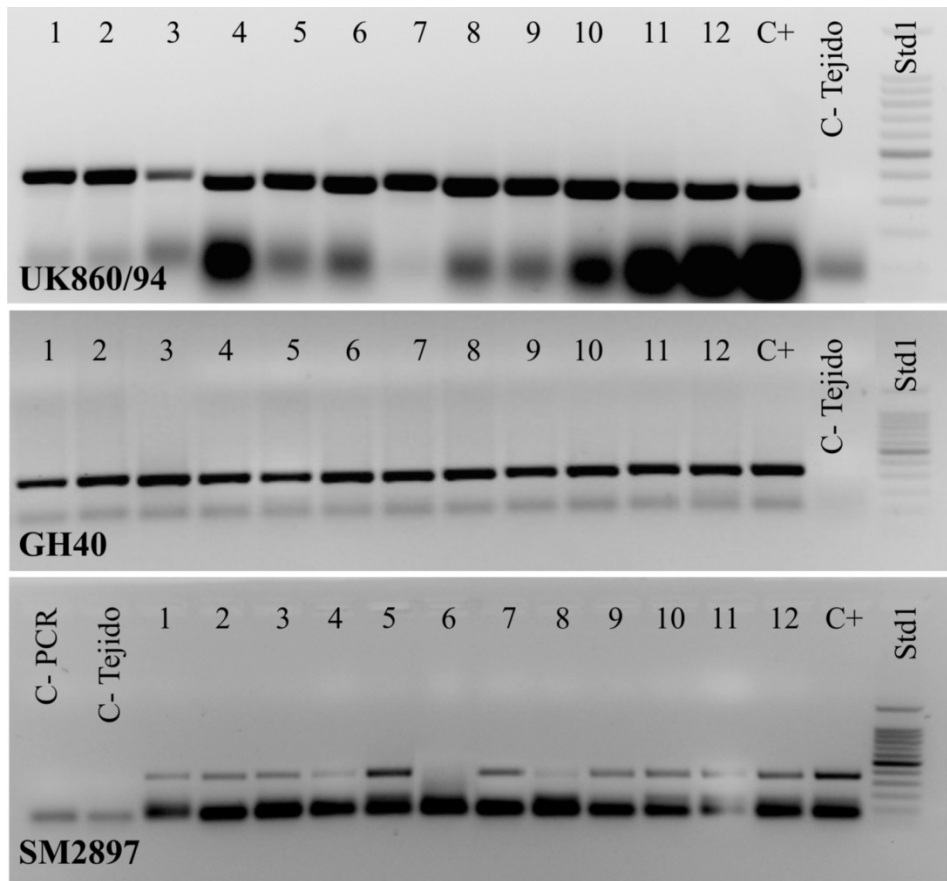


Figura 4.3: Gel de agarosa mostrando los productos de RT-PCR para los grupos de peces (1 a 12) inoculados con las cepas Uk860/94, GH40 y SM2897 en el experimento 1. C- PCR: control negativo de la RT-PCR (H₂O-libre de nucleasas); C- Tejido: RNA obtenido de los tejidos de los peces que formaban el control negativo de inoculación. Std1: Marcador de tamaños en pb que van de 100 en 100 exceptuando de 1000 que pasa a 1500 pb (*Bench Top 100bp DNA Ladder*, Promega).

En cultivo celular se recuperó el virus de todos los lotes que contenían mayoritariamente o en su totalidad peces muertos. Así, se consideraron positivos por este procedimiento todos los lotes infectados con la cepa

UK860/94, incluyendo el único formado por peces supervivientes (2 de 5). Sin embargo no se obtuvo ECP a partir de un lote de peces infectados con la cepa GH40 que contenía 4 supervivientes y una baja, ni en 2 lotes infectados con la dosis baja de la cepa SM2897 que incluían entre 3 y 4 supervivientes. Es de destacar que tampoco se pudo recuperar el virus de un lote de peces infectados con la cepa SM2897 constituido en su totalidad por individuos muertos en los primeros días de la infección, mientras que sí resultó positivo para VHSV por RT-PCR.

Infección experimental 2

Los datos de las mortalidades máximas acumuladas mediante las tres vías de infección ensayadas aparecen detallados en la tabla 4.6. Durante el transcurso de este experimento se observaron mortalidades relativamente altas en todos los lotes de peces inoculados mediante i.p., mientras que las otras dos vías de infección ensayadas, cohabitación e inmersión, presentaron resultados de mortalidad muy bajos; de hecho, mediante cohabitación sólo se observó mortalidad en el grupo de peces inoculados con la cepa GH40, y mediante inmersión se observó entre un 10 y un 20% de mortalidad en el grupo de peces inoculados con la cepa SM2897.

Infección intraperitoneal y Cohabitación. En los peces inoculados intraperitonealmente las primeras mortalidades se observaron en el grupo infectado con el aislado SM2897 a los 7 u 8 días p.i., a 8 o 15 °C, respectivamente, y se registraron hasta el día 28 p.i. a 8 °C (100% de mortalidad) y el día 22 p.i. a 15 °C, alcanzándose en este caso una mortalidad acumulada del 73,3% (Tabla 4.6. y Figura 4.4).

Tabla 4.6: Mortalidades acumuladas en rodaballo por efecto de 3 cepas de VHSV (a dos temperaturas) mediante tres modelos de infección.

CEPA	T ^d	i.p.(10 ⁵) ^a		Cohab ^b		I (10 ⁵) ^c	
		M% ^e	d _{p.i} ^f	M%	d _{p.i}	M%	d _{p.i}
GH40	8 °C	40	10-56	13.3	14-48	0	-
	15 °C	20	13-24	0	31*	0	-
SM2897	8 °C	100	7-28	0	-	20	43-48
	15 °C	73,3	8-22	0	-	10	46
UK860/94	8 °C	80	10-34	0	-	0	-
	15 °C	46.7	9-14	0	-	0	-

^a Dosis inoculada mediante i.p. expresada como TCID₅₀ por individuo.

^b Grupo de peces que cohabitaron con los inoculados mediante i.p.

^c Dosis inoculada mediante inmersión, expresada como TCID₅₀ × ml⁻¹

^d Temperatura de mantenimiento

^e Valor máximo de mortalidad acumulada, expresada en porcentajes.

^f Días post-infección, desde la primera baja hasta alcanzar el máximo de mortalidad acumulada.

* En el día 31 hay un pez muerto, pero no se detectó el virus por ninguno de los métodos utilizados, por lo que no se consideró mortalidad debida al virus.

La mortalidad en los grupos de peces infectados con los aislados UK869/94 y GH40 se inició un poco mas tarde (nunca antes del día 9 p.i.) y en ningún caso se alcanzó el 100% de mortalidad. El valor más alto de mortalidad acumulada se observó en el grupo de peces mantenidos a 8 °C (80% en los peces infectados con UK860/94 y 40% con GH40), mientras que a la otra temperatura ensayada (15 °C) el porcentaje de mortalidad acumulada rondó el 45% para UK860/94 y no superó el 20% en los peces inoculados con GH40.

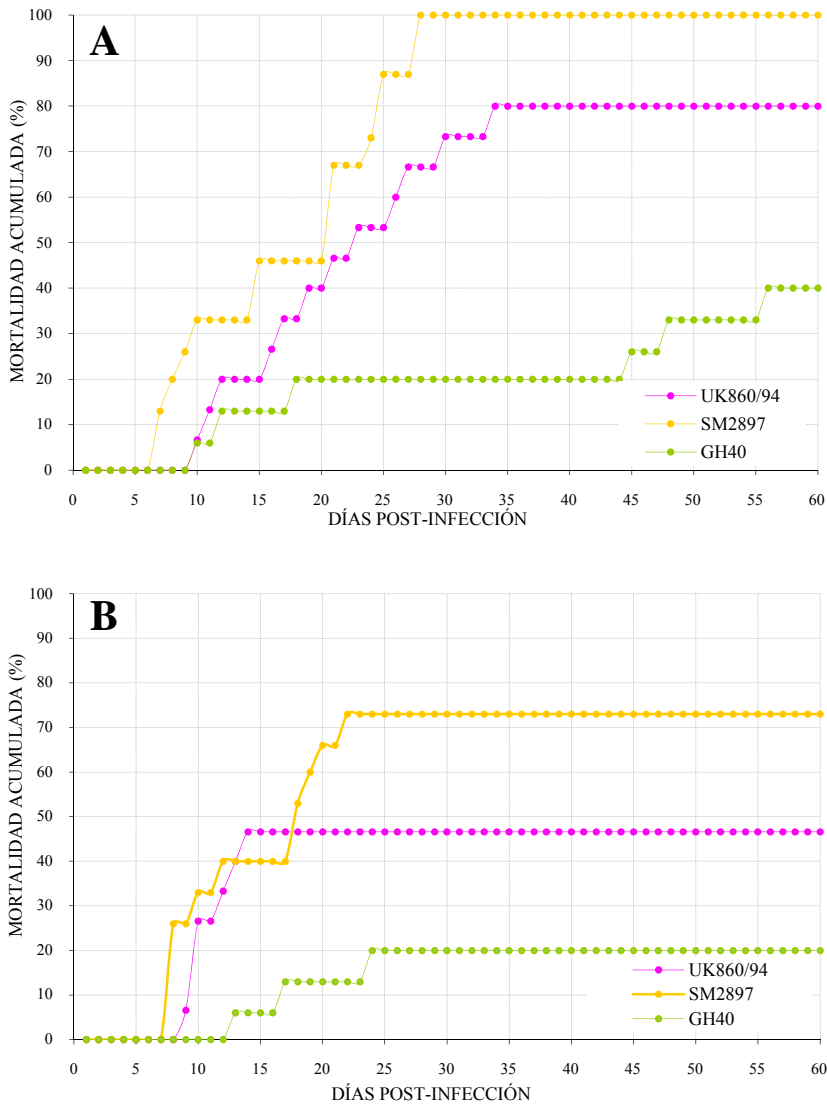


Figura 4.4: Cinética de mortalidad acumulada de rodaballos inoculados vía i.p. con los aislados de VHSV UK860/94, SM2897 y GH40. Los virus se administraron en un volumen de 100 μ l con una dosis de 1×10^5 TCID₅₀. El gráfico superior corresponde con los grupos mantenidos a 8° C (**A**) y el inferior con los mantenidos a 15° C (**B**).

En cuanto al experimento de cohabitación, sólo se apreció mortalidad en el grupo de peces que compartían el tanque con los rodaballos inoculados con la cepa GH40 a 8 °C, registrándose 2 bajas de peces no inoculados en los días 14 y 48 (Tabla 4.6), que mostraban la sintomatología propia de estos virus, lo que supone un 13,3% de mortalidad acumulada. Aunque en el grupo mantenido a 15 °C apareció también un individuo muerto el día 31 p.i., esta muerte no se pudo atribuir a la multiplicación viral ya que no se detectó VHSV por ninguno de los métodos empleados, y por lo tanto no se tuvo en cuenta para los cálculos de mortalidad acumulada.

En la tabla 4.7 se presenta una comparación de los resultados obtenidos en las inoculaciones mediante i.p. llevadas a cabo en los experimentos 1 y 2. Como se muestra, se observaron claras discrepancias entre los resultados obtenidos con la cepa GH40, mientras que los valores de mortalidad inducidos por la cepa SM2897 fueron similares en ambos experimentos. Con respecto a la cepa de referencia UK860/94 se obtuvo un claro descenso en los valores de mortalidad obtenidos a 15 °C en el segundo ensayo.

Tabla 4.7: Comparación de los resultados obtenidos por i.p. (dosis 10^5 TCID₅₀).

Cepa	IP (<i>Experimento 1</i>)		IP (<i>Experimento 2</i>)	
	8 °C (dpi) ^a	15 °C (dpi)	8 °C (dpi)	15 °C (dpi)
GH40	73,3% (34)	100% (47)	40% (56)	20% (24)
SM2897	80% (30)	73,3% (30)	100% (28)	73,3% (22)
UK860/94	86,7% (25)	100% (32)	80% (34)	46,7% (14)

i.p.: inoculación mediante inyección intraperitoneal.
^a Día post-infección al que se alcanzó la máxima mortalidad acumulada).

Infección mediante inmersión. En los ensayos de infección por inmersión solamente se detectó mortalidad en los peces infectados con la cepa SM2897, a ambas temperaturas. La mortalidad observada a 15 °C se limitó a una baja en el día 46 p.i. (10%), mientras que a 8 °C aparecieron dos individuos muertos entre los días 43 y 48 post-infección, lo que equivale a un máximo de 20% de mortalidad acumulada. No se apreciaron signos clínicos en ninguno de los peces correspondientes a este ensayo.

La observación de la sintomatología mostrada por los peces recogidos muertos a lo largo del experimento reveló que la mayoría mostraban síntomas claros de presencia de VHSV, tales como hemorragias externas principalmente en la base de cola y aletas e internas en cuerpo, músculo y vísceras y una marcada distensión abdominal debida al líquido ascítico que invadía la cavidad interna (Figura 4.5). Al igual que ocurría en el



Figura 4.5: Ejemplares de rodaballo inoculados mediante i.p. mostrando hemorragias en cabeza y base de las aletas y abdomen hinchado. En el pie de foto se identifica el aislado de VHSV inoculado.

experimento 1, los peces muertos en los estados iniciales de la infección presentaban síntomas menos apreciables. Si se analiza la aparición de síntomas en relación a la cepa ensayada, se observó que el 57% de los peces muertos tras la inoculación i.p. con la cepa de referencia UK860/94 presentaban síntomas clásicos de VHS a 15 °C, porcentaje que se incrementó hasta el 83% a 8° C. Con respecto a los aislados inoculados con el aislado SM2897, se observaron síntomas en el 72% de los peces muertos a 15 °C y en el 86% a 8 °C. Estos porcentajes aumentaron hasta el 100% de peces sintomáticos en el grupo inoculado con GH40 a 8 °C. Los individuos muertos que habían cohabitado con los



Figura 4.6: Ejemplares de rodaballo infectados mediante cohabitación en un tanque con individuos infectados mediante i.p. con el aislado GH40. Se aprecian hemorragias en boca orbitas oculares y abdomen.

inoculados mediante i.p. con la cepa GH40 también mostraron síntomas propios de la enfermedad, como se puede apreciar en la figura 4.6. Los peces infectados por inmersión no mostraron síntomas propios de la enfermedad.

Los resultados de la detección por RT-PCR y recuperación del virus en cultivo celular a partir de los peces infectados aparecen detallados en la tabla 4.8. El virus se detectó mediante RT-PCR en todos los grupos infectados mediante i.p. que contenían peces muertos (100% de detección por RT-PCR) (Figura 4.7). Aunque no aparecieron mortalidades

asociadas a los grupos de peces infectados con GH40 o UK860/94 mediante inmersión, el virus sí fue detectado mediante RT-PCR en uno

Tabla 4.8: Resumen de los resultados obtenidos tras la infección de *Scophthalmus maximus* mediante i.p., cohabitación e inmersión con tres cepas de VHSV procedentes de peces salvajes y de cultivo.

G ^a	Vía de infección	CEPA														
		GH40				SM2897				UK860/94						
		dpi ^b	M ^c	P ^d	N ^e	C ^f	dpi	M	P	N	C	dpi	M	P	N	C
1	IP ^g (8 °C)	10-48	5	+	+	+	7-10	5	+	+	+	10-17	5	+	+	+
2		56	1	+	+	-	17-22	5	+	+	+	19-27	5	+	+	+
3		60	0	-	+	-	25-28	5	+	+	+	30-34	2	+	+	-
4	Cohab ^h (8 °C)	14-48	2	+	+	+	60	0	-	+	-	60	0	-	+	-
5		60	0	-	+	-	60	0	-	+	-	60	0	-	+	-
6		60	0	-	-	-	60	0	+	+	+	60	0	-	-	-
7	I ⁱ (8 °C)	60	0	-	-	-	43-48	2	-	+	-	60	0	-	+	-
8		60	0	+	+	+	60	0	-	+	-	60	0	-	+	-
9	IP (15 °C)	13-24	3	+	+	+	8-10	5	+	+	+	9-12	5	+	+	+
10		60	0	-	-	-	12-20	5	+	+	+	13-14	2	+	+	-
11		60	0	-	-	-	22	1	+	+	-	60	0	-	+	-
12	Cohab (15 °C)	31	1	-	-	-	60	0	-	+	-	60	0	-	+	-
13		60	0	-	-	-	60	0	-	-	-	60	0	-	+	-
14		60	0	-	-	-	60	0	-	-	-	60	0	-	-	-
15	I (15 °C)	60	0	-	+	-	46	1	+	+	-	60	0	-	+	-
16		60	0	+	+	-	60	0	-	+	-	60	0	-	+	-

^a Grupo de 5 peces usados para la detección y aislamiento.

^b Días post-infección.

^c Numero de peces muertos en cada grupo de 5 individuos.

^d Detección mediante RT-PCR y visualización del producto amplificado.

^e Detección mediante RT-PCR seguido de nested-PCR.

^f Desarrollo de efecto citopático en células EPC.

^g Inyección intraperitoneal (con una dosis 1×10^5 TCID₅₀).

^h Cohabitación con rodaballos infectados mediante i.p., en una relación 1:1.

ⁱ Inmersión

de los lotes infectados con la cepa GH40 a las dos temperaturas y por nested-PCR en todos los lotes exceptuando uno infectado con la cepa GH40 a 8 °C. Además debemos destacar que en un grupo de los peces infectados con GH40 a 8 °C no solo se detectó el virus mediante RT-PCR sino que también fue posible aislarlo en cultivo celular. También se detectó el virus mediante RT-PCR en el lote de peces infectados por inmersión con la cepa SM2897 que contenía un pez muerto a 15 °C y por nested-PCR en todos los lotes incluyendo el que contenía los 2

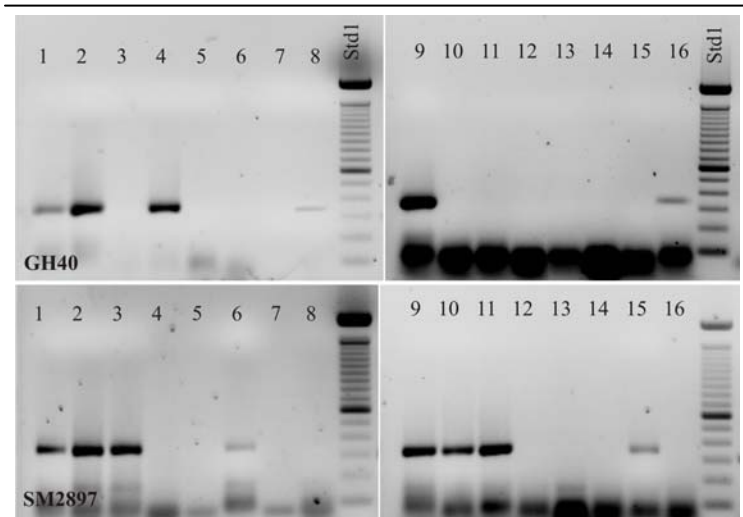


Figura 4.7: Gel de agarosa mostrando los resultados obtenidos mediante RT-PCR para los grupos de peces de 1 a 16 inoculados con la cepa GH40 y SM2897 en el experimento 2. Std1: Marcador de tamaños (*Bench Top 100bp DNA Ladder*, Promega).

muertos a 8 °C.

El virus se aisló del 71,4% de los grupos compuestos por peces muertos tras la infección mediante i.p., pero no se aisló a partir de los peces supervivientes. Cabe destacar que se observó replicación viral en cultivo celular en dos muestras procedentes de peces de los experimentos de

cohabitación a 8 °C. Un lote incluía los dos peces muertos que habían cohabitado con rodaballos infectados con la cepa GH40 y el otro incluía peces vivos que compartían tanque con los infectados con la cepa SM2897. En cuanto a los grupos infectados mediante inmersión, se ha recuperado el virus en un lote de peces infectado con la cepa GH40 a 8 °C. La identidad de todos los aislados virales se confirmó mediante RT-PCR, con los cebadores específicos para VHSV.

La comparación de los niveles de detección de las técnicas utilizadas indicó que por cultivo celular se alcanzó un 27% de positivos mientras que cuando las muestras se analizaron mediante RT-PCR, el nivel de positivos alcanzó un 39,6% valor que se incrementó hasta el 77% mediante nested-PCR.

Infección experimental 3

Durante el transcurso de este experimento (de inoculación experimental en trucha común) no se observó mortalidad en ninguno de los grupos ensayados. Transcurridos 60 días se sacrificaron los peces infectados para proceder a la detección y/o aislamiento de VHSV.

Infección intraperitoneal y Cohabitación. Ningún individuo inoculado mostró signos de padecer la enfermedad durante el periodo de duración del ensayo. En el momento en que se sacrificaron los peces (60 días p.i.) no fue posible detectar el virus mediante RT-PCR en ninguno de los grupos inoculados vía i.p.; sin embargo, resultaron positivos mediante nested-PCR el 36% de los lotes inoculados por esta vía (Figura 4.8). Como se puede comprobar en la tabla 4.9, el análisis de los resultados de detección indicó un mayor número de lotes positivos en el grupo de peces inoculados i.p. con la cepa STF170.01, aislada de trucha común, con un 50% de detección en tejido y un 25% en cerebro (agrupando los

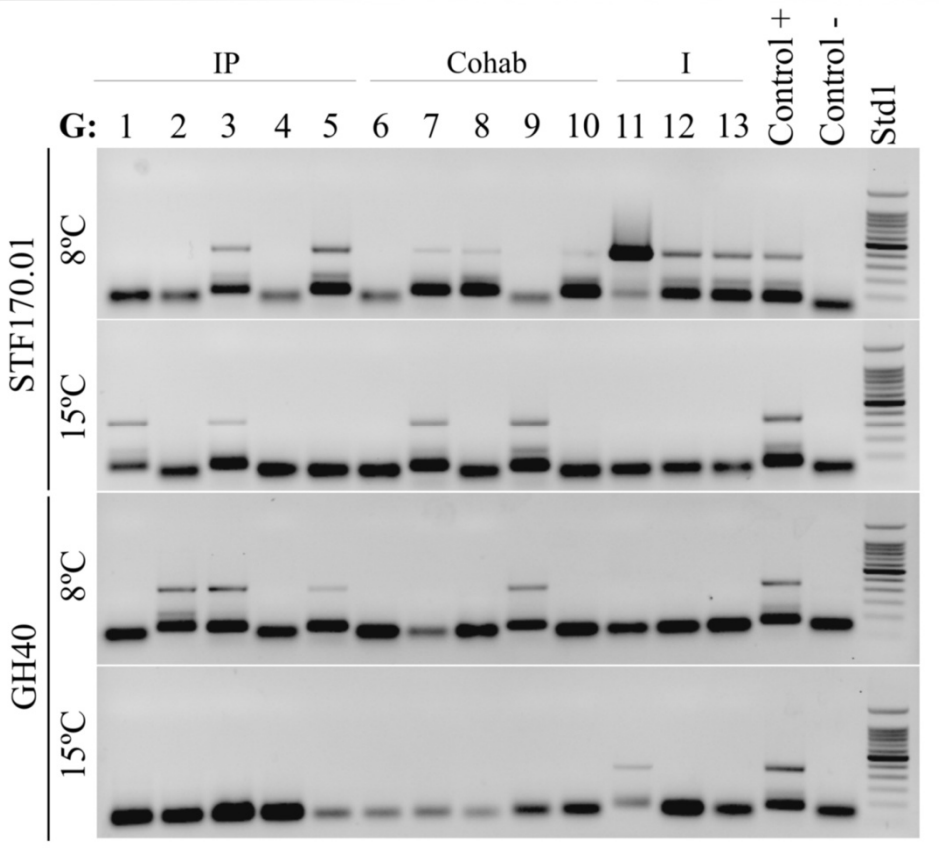


Figura 4.8: Electroforesis en geles de agarosa mostrando los productos de amplificación por nested-PCR a partir del producto purificado de la PCR con la pareja de cebadores *VHSV-cm3 intro*. **G:** grupo de peces procesados para la detección viral; **1, 2 y 3:** muestras de tejidos (bazo y riñón) de un lote de 5 peces inoculados mediante i.p. (IP); **4 y 5:** muestras de cerebros de un lote de 7 y 8 peces inoculados mediante IP; **6, 7 y 8:** muestras de tejidos (bazo y riñón) de un lote de 5 peces inoculados mediante cohabitación (Cohab); **9 y 10:** muestras de cerebros de un lote de 7 y 8 peces inoculados mediante cohabitación; **11 y 12** muestras de tejidos (bazo y riñón) de un lote de 5 peces inoculados mediante inmersión (I); **13:** muestras de cerebros de un lote de 10 peces inoculados mediante inmersión, Control+ (control positivo), control- (control negativo), Std1 (Marcador de tamaños; *Bench Top 100bp DNA Ladder*, Promega).

resultados a ambas temperaturas. Si bien se obtuvo un mayor número de lotes de tejidos positivos a 15 °C, a esta temperatura no fue posible detectar el virus en las muestras de cerebro, mientras que a 8 °C se

detectó en uno de los dos lotes analizados. En los grupos inoculados con la cepa de referencia FR07/71 sólo se detectó el virus a 15 °C, con un 66% (2/3) de positivos en tejido y el 100% en cerebro. Por último en las truchas inoculadas con la cepa de origen marino GH40, aunque no se detectó el virus a 15 °C, sí se detectó a 8 °C en dos lotes de tejido (66%) y en uno de cerebro (50%).

Tabla 4.9: Resumen de los resultados de detección mediante nested-PCR obtenidos tras la infección de *Salmo trutta fario* mediante i.p., cohabitación e inmersión con tres cepas de VHV.

G ^a	Muestra ^b	Vía de infección ^d	CEPA					
			GH40		STF170.01		FR07/71	
			8 °C	15 °C	8 °C	15 °C	8 °C	15 °C
1	T (5) ^c	IP	-	-	-	+	-	+
2	T (5)	IP	+	-	-	-	-	-
3	T (5)	IP	+	-	+	+	-	+
4	C (7)	IP	-	-	-	-	-	+
5	C (8)	IP	+	-	+	-	-	+
6	T (5)	Cohab	-	-	-	-	-	-
7	T (5)	Cohab	-	-	+	+	-	-
8	T (5)	Cohab	-	-	+	-	-	-
9	C (7)	Cohab	+	-	-	+	-	-
10	C (8)	Cohab	-	-	+	-	-	-
11	T (5)	I	-	+	+	-	-	+
12	T (5)	I	-	-	+	-	-	-
13	C (10)	I	-	-	+	-	-	+

^a Grupo de peces utilizados para la detección y aislamiento. ^b Tipo de muestra: T (Tejidos que incluyen bazo y riñón) y C (cerebros). ^c Número de órganos por muestra. ^d Vía de infección: IP (Inyección intraperitoneal), Cohab (Cohabitación con truchas infectadas mediante i.p., en una relación (1:1), I (Inmersión).

Al igual que los peces inoculados i.p., los ejemplares que cohabitaban en el mismo tanque no manifestaron ningún síntoma externo o interno de la infección. Sin embargo se detectó el virus en los peces que compartían tanque con los inoculados con la cepa STF170.01 a ambas temperaturas: dos lotes de tejido positivos y uno de cerebro a 8 °C y un lote de tejido y otro de cerebro a 15 °C. Asimismo, se detectó el virus en un solo lote de cerebro perteneciente a ejemplares que cohabitaban con truchas infectadas con la cepa GH40 a 8 °C.

Infección mediante inmersión. En los grupos de peces infectados mediante inmersión tampoco se detectó mortalidad ni sintomatología. Aunque al igual que en los casos anteriores no fue posible detectar el virus mediante RT-PCR, mediante nested-PCR se detectaron un total de 6 lotes positivos (4 de tejido y 2 de cerebro), lo que supone un 33% de los lotes analizados y que incluye al menos un lote de peces infectado por cada cepa (Figura 4.8, Tabla 4.9).

Cabe destacar que en el grupo de peces infectados con la cepa STF170.01 por inmersión se detectó el virus en todos los lotes (tejido y cerebro) de peces mantenidos a 8 °C, pero no fue posible detectarlo a 15 °C. Sin embargo, en los grupos infectados con las cepas FR07/71 y GH40 el virus sólo se detectó a 15 °C en un lote de tejido y 1 de cerebro (cepa FR07/71) y un lote de tejido (cepa GH40) (Tabla 4.9).

No fue posible aislar el virus de ninguno de los lotes formados por los tejidos o cerebros de las truchas infectadas.

DISCUSION

El virus VHSV presenta un amplio rango de huéspedes no solo en agua dulce sino también en el medio marino (Smail, 1999; Skall y col., 2005) y ha sido causante de epizootias tanto en especies salvajes como cultivadas. El creciente número de aislados de origen marino ha propiciado la realización de numerosos estudios encaminados a determinar la virulencia de aislados continentales y marinos de VHSV para trucha arcoiris y distintas especies marinas; estos estudios han demostrado que, mientras los aislados continentales son altamente patógenos para trucha arcoiris y rodaballo, la virulencia de los aislados marinos es muy variable (King y col., 2001b; Bowden, 2003; Skall y col., 2004; Takafumi y col., 2004; Snow y col., 2005a, b).

En el presente estudio los ensayos de inoculación experimental en rodaballo han demostrado que los tres aislados de VHSV utilizados (GH40, SM2897 y UK860/94), son virulentos para alevines de rodaballo por inyección intraperitoneal, tanto a 8° como a 15 °C, provocando el desarrollo de signos clínicos muy similares a los ya descritos previamente para esta especie (Snow y Smail, 1999, King y col., 2001b). Sin embargo, los porcentajes de mortalidad acumulada revelaron diferencias entre los dos experimentos aplicados a esta especie. Así, en el experimento 1 se obtuvieron datos de mortalidad elevados (73,3 - 100%) con cualquiera de las tres cepas y a ambas temperaturas. Por otro lado, en el segundo experimento, solo los virus aislados de rodaballo (UK860/94 y SM2897) fueron igualmente responsables de altas mortalidades a 8 °C (80 - 100%), mientras que los peces inoculados con la cepa GH40 (procedentes de fletán negro) mostraron un nivel de mortalidad considerablemente inferior (40%). En este mismo experimento, en los peces mantenidos a 15 °C el descenso de la mortalidad fue incluso más evidente, tanto en el grupo inoculado con GH40 como con UK860/94. Este descenso se podría atribuir a un incremento en

la temperatura del agua, que alcanzó un pico de 18 °C que se mantuvo durante 6 o 7 horas, en el segundo día post-infección. Sin embargo los niveles de mortalidad provocados por la cepa SM2897 no se vieron afectados por este pico de temperatura; de hecho, se obtuvieron porcentajes idénticos en los experimentos 1 y 2 a 15 °C, lo que sugiere una mejor tolerancia de esta cepa a las altas temperaturas. Esta tolerancia podría tener relación con el hecho de que esta cepa en particular había sido aislada en un mes de Junio caluroso, en el que la temperatura del agua en los tanques de rodaballos en la planta de cultivo osciló entre los 16 y 18 °C.

Las epizootias de VHS en peces marinos han ocurrido en un rango de temperaturas bastante grande; así, los brotes en rodaballo cultivado se produjeron con temperaturas del agua entre 13 y 15 °C (Schlotfeldt y col., 1991; Ross y col., 1994), mientras que se han descrito mortalidades en poblaciones naturales de arenque y merluza del pacífico a 4-5 °C (Meyers y col., 1999). Por otra parte, en los ensayos de infección experimental también se han utilizado temperaturas muy diferentes, con descripciones de mortalidades en todos los casos. Así, Castric y de Kinkelin, (1984) en inoculaciones experimentales de rodaballo con aislados de VHSV de agua dulce comprobaron que a 20 °C no se producía mortalidad, mientras que a 18 °C la mortalidad alcanzaba el 50% y a 12,5 °C, el 100%. Posteriormente, Snow y Smail (1999) describieron mortalidades del 100% en rodaballos infectados con la cepa UK860/94 mantenidos a 10 ±1 °C, y Hedrick y col. (2003) indicaron que temperaturas entre 8 y 10 °C son óptimas para la infección experimental de VHSV en otras especies, como arenque del pacífico. Algunos autores han sugerido que podría existir una tolerancia a la temperatura entre cepas de VHSV de distintos orígenes geográficos (Hedrick y col., 2003), lo que explicaría el amplio rango de temperaturas asociado a epizootias naturales en especies marinas y la diferente respuesta a la temperatura en ensayos de laboratorio.

Nosotros hemos observado una variación considerable en el nivel de mortalidad inducido por la cepa GH40 en los experimentos 1 y 2 a la misma temperatura de 8 °C, lo que en principio descarta el efecto de ese factor ambiental. En un ensayo de infección experimental como el realizado en este estudio hay varios factores que pueden influir en una variación de los resultados, como es el caso de la preparación del inóculo, el tamaño del pez o el stock genético de los mismos u otros factores ambientales (Snow y col., 2005a). Las variaciones encontradas en este estudio difícilmente se pueden explicar por las condiciones medioambientales, ya que como se ha mencionado previamente en ambos experimentos se mantuvo la temperatura de 8 °C sin oscilaciones significativas y el agua de mar utilizada procedía del mismo tanque de almacenamiento; tampoco se podría achacar al tamaño de pez puesto que se usaron individuos de la misma talla (aproximadamente 25g). Sin embargo, no podemos descartar el efecto de otros factores como la preparación del virus o el stock genético de los 2 grupos de peces empleados. En cuanto a la preparación viral, aunque en ambos experimentos se utilizaron cultivos virales con un número similar de pases en células EPC y con idéntico título, es posible que la propagación del virus en cultivo celular favoreciese el crecimiento de diferentes “quasispecies” en las dos preparaciones virales, lo cual podría explicar la variación en la virulencia (Snow y Smail, 1999; Bowden, 2003). Por otro lado, se emplearon rodaballos de distintos orígenes en los dos experimentos, de modo que las diferencias genéticas entre ambos stock de peces podrían también afectar a la variabilidad observada. Sin embargo, la diferencia de susceptibilidad entre los dos grupos de rodaballos se observó solo frente a la cepa GH40, por lo que es razonable pensar que el origen del aislado viral podría ser la causa de esta diferencia. En este sentido las cepas UK860/94 y SM2897 han sido aisladas de rodaballo de modo que estas cepas deben estar bien adaptadas a esta especie, mientras que la cepa GH40, dado que procede de una especie de pez distinta, el fletán negro, puede ser más sensible a diferentes niveles de actividad del sistema inmune del nuevo huésped. De hecho, ya se ha discutido con anterioridad sobre

la variabilidad en la virulencia de diferentes cepas de VHSV marinos para rodaballo (King y col. 2001b), pero hasta el momento, no se conocían datos sobre la variabilidad en virulencia de una cepa en particular sobre rodaballos de diferentes orígenes.

En cuanto al análisis de las rutas de infección, aunque la inoculación intraperitoneal asegura la estandarización de la dosis viral, las otras dos vías empleadas en el experimento 2 (cohabitación e inmersión) reflejan mejor la vía natural de infección, que ocurre por transmisión horizontal a través del agua (Wolf, 1988). En este estudio se ha recuperado VHSV de rodaballos supervivientes tras la infección por medio de baño con la cepa GH40, tanto a 8 como a 15 °C y de peces muertos que cohabitaron a 8 °C con los infectados mediante i.p. con esta misma cepa. Este hallazgo indica que, aunque la exposición al virus mediante baño no provoca signos clínicos, el virus puede sobrevivir en el agua de mar e infectar mediante transmisión horizontal. De hecho, la observación de mortalidad en el grupo de peces que compartían el tanque con peces inoculados por i.p. sugiere que el virus diseminado por los peces infectados mediante i.p. difiere del virus original (procedente de un cultivo celular) de modo que el pase por pez incrementa la virulencia de la cepa GH40 para rodaballo. En este sentido un aumento de la virulencia de cepas de VHSV de origen marino tras su pase por distintas especies ha sido notificado ya por otros autores (Snow y Cunningham, 2000).

El virus se recuperó también a partir de peces supervivientes que cohabitaron con rodaballos infectados mediante i.p. con la cepa SM2897, sin embargo no se pudo recuperar de los infectados con UK860/94 ni en el grupo de cohabitación ni en el de inmersión. Es interesante señalar que la cepa UK860/94, según ha sido demostrado, se incluyó en este estudio debido a su alto nivel de virulencia para rodaballo por las tres vías de inoculación experimental, por Snow y Smail (1999), y que los resultados de mortalidad inducidos por i.p. obtenidos en este trabajo, son similares a los publicados previamente por estos autores. Sin

embargo, la ausencia de mortalidad y la imposibilidad de recuperación del virus en los otros dos ensayos de infección (cohabitación e inmersión) difieren claramente de otros resultados publicados hasta el momento (Snow y Smail, 1999, King y col., 2001b, Bowden, 2003, Snow y col., 2005a). Como hemos indicado con anterioridad y también han señalado otros autores (Snow y col., 2005a), hay una serie de factores inherentes a las infecciones experimentales, relacionadas tanto con el virus como con el pez, que pueden ser la causa de diferencias notables entre experimentos y/o laboratorios. La coincidencia de los porcentajes de mortalidad obtenidos en la infección mediante i.p. con otros trabajos, sugiere que las diferencias en las otras vías de infección no tienen relación con la preparación del virus y podría asociarse más a las condiciones del pez. De hecho, debemos precisar que los peces usados en este estudio (en ambos experimentos) tenían un tamaño superior (unas 4 veces) al de los empleados en los ensayos previos. Los mecanismos de respuesta inmune localizados en la piel y en otras superficies del cuerpo de los peces más grandes podrían ser más eficaces frente a VHSV que los de peces más pequeños. De hecho, el tejido epidérmico juega un importante papel facilitando o denegando la entrada del virus en el pez (Yamamoto y col., 1990; Dorson y Torhy, 1993).

Además, como se indicó previamente los peces usados en el experimento 2 parecen ser un poco más resistentes al aislado GH40. Los resultados obtenidos con rodaballo en los dos experimentos de infección incluidos en este estudio demuestran que los aislados marinos de VHSV obtenidos de fletán negro pueden inducir mortalidad con síntomas clínicos de VHS en juveniles de rodaballo. Y, aunque no se produce mortalidad por inmersión, el virus es recuperado de los tejidos de algunos peces, indicando que se establece una infección persistente. También, se demuestra la transmisión del virus por cohabitación con individuos infectados mediante i.p. observando un incremento en la virulencia del aislado. Estos resultados demuestran que el fletán negro, como otras especies de peces salvajes, podrían jugar un importante papel en la dispersión del VHSV y alertan

sobre el riesgo que suponen las cepas de VHSV de origen marino para la industria acuícola en general, como han sugerido previamente otros autores (Snow y Smail, 1999, King y col., 2001b, Snow y col., 2004). Aunque se podría argumentar que se trata de un riesgo teórico, ya que el Flemish Cap se encuentra lejos de las piscifactorías de rodaballo, que se localizan principalmente en las costas Europeas, el riesgo se convierte en real si tenemos en cuenta que en sus movimientos migratorios, los especímenes de fletán infectados pueden portar cepas de VHSV desde el Flemish Cap hasta las aguas atlánticas europeas (Vis y col., 1997), sin tener en cuenta las migraciones intercontinentales de otras especies como el salmón (Anónimo, 2001).

Los ensayos de infección experimental realizados con alevines de trucha común revelaron que ni las cepas de origen continental (FR07/71, STF170.01) ni la de origen marino (GH40) fueron capaces de provocar síntomas de enfermedad ni mortalidad en los 60 días que duró el ensayo, por ninguna de las vías utilizadas (i.p., cohabitación con peces inoculados o inmersión). Estos resultados coinciden con trabajos anteriores en los que se indicaba que *Salmo trutta fario* era refractaria al VHSV por infección experimental, tanto por baño como por inyección del virus (de Kinkelin y col., 1974). Asimismo, otros autores han notificado la baja o nula susceptibilidad de distintas especies de salmónidos al VHSV, como es el caso de dos salmones del pacífico, *Oncorhynchus kisutch* y *Oncorhynchus tshawytscha* (Ord y col., 1976; Follett y col., 1997).

Sin embargo, es interesante señalar que el virus se detectó mediante nested-PCR en varios lotes de peces inoculados con las 3 cepas de VHSV, tanto a partir de cerebro como de tejido. En el caso de los peces inoculados con la cepa STF170.01, el virus se detectó a las dos temperaturas ensayadas (8 y 15 °C), mientras la cepa GH40 se detectó principalmente a 8 °C y la cepa FR07/71 exclusivamente a 15 °C. Estos resultados demuestran que el virus puede penetrar y replicar en los tejidos de trucha común. Resultados similares han sido notificados por otros autores (King y col., 2001b) en infecciones experimentales

de salmón atlántico *Salmo salar*, al demostrar que, si bien ejemplares de esta especie no eran susceptibles a diversos aislados de VHSV, sí era posible detectar el virus en los órganos internos, lo que implicaba la replicación viral.

Al igual que en los experimentos con rodaballo, los órganos utilizados en trucha para el aislamiento y detección del virus fueron bazo y riñón; estos órganos contienen las principales células diana tras la infección (Bernard y col., 1983); a ambos se sumó el cerebro debido a que se ha demostrado que el virus permanece en él un largo periodo de tiempo después de una infección experimental (Neukirch, 1984, 1986). En este experimento no fue posible ni el aislamiento en cultivo celular del virus ni la detección por RT-PCR, con independencia de la ruta de infección o el tipo de muestra (bazo + riñón o cerebro). Únicamente la utilización de una técnica extraordinariamente sensible como es el nested-PCR permitió la detección de las distintas cepas de VHSV utilizadas en el ensayo, sin que se observase una mayor eficacia de detección a partir de las muestras de cerebro.

Estos resultados parecen indicar que los 60 días transcurridos desde la infección han permitido a los peces eliminar al virus en la mayoría de los casos, o que en un bajo porcentaje de los peces el virus haya alcanzado un estado de persistencia, manteniéndose en un equilibrio con su hospedador en niveles infectivos tan bajos que sólo es detectable por nested-PCR. En este sentido la existencia de una infección subclínica en trucha común tras una infección experimental ha sido notificada por otros autores (Enzmann y col., 1992)

Los resultados de nested-PCR indican que existe una clara influencia de la procedencia de la cepa sobre los niveles de detección y por lo tanto sobre la replicación del virus en la trucha. Así, el aislado STF170.01, procedente de trucha común, es el que se detecta en mayor medida en todas las condiciones ensayadas, siendo especialmente destacable el alto nivel de detección en el experimento de cohabitación. El efecto de la temperatura sobre el desarrollo de la infección parece estar directamente relacionado con el origen del aislado. Así,

la cepa STF170.01 es la que se detecta mejor a las dos temperaturas ensayadas, mientras que la cepa de referencia FR07/71 sólo se detecta a 15 °C y la cepa GH40 casi exclusivamente a 8° C (1 lote positivo de 13 a 15 °C).

Es interesante destacar la detección de la cepa GH40 en un lote de cerebro procedente de truchas expuestas al virus mediante cohabitación con truchas infectadas por inyección intraperitoneal, ya que indica que es posible la transmisión horizontal de un aislado de origen marino en trucha común. Esta transmisión se ha demostrado en rodaballo (Snow y Smail, 1999), corroborada por los resultados mostrados en este capítulo, pero no en bacalao, *Gadus morhua* (Snow y col., 2000). Tampoco se ha probado la transmisión en ejemplares de trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, cuando éstas son infectadas con un aislado de bacalao (Snow y col., 2000).

Finalmente, si bien hasta el momento se había demostrado que los VHSV procedentes del medio marino podían sobrevivir entre 7 y 21 días en agua de mar a 4 °C (Parry y Dixon, 1997), no había ningún dato sobre su supervivencia en agua dulce. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran de forma concluyente que la cepa de origen marino GH40 puede sobrevivir en agua dulce facilitando la transmisión horizontal del virus en ejemplares de trucha común.

CONCLUSIONES

1. La técnica de RT-PCR puesta a punto en este trabajo permite la detección específica, sensible y fiable del virus de la septicemia hemorrágica viral; esta técnica, combinada con Southern blot / Hibridación de ácidos nucleicos o nested-PCR incrementa la sensibilidad de la detección y se presenta como una alternativa al diagnóstico tradicional reduciéndose considerablemente el tiempo para la conclusión del diagnóstico.
2. Se ha probado que la técnica de RT-PCR aplicada a muestras de sangre presenta una alta sensibilidad para la detección del VHSV, además de mostrar la ventaja de evitar el sacrificio del animal. Se convierte así en una herramienta de diagnóstico muy preciada para la selección de reproductores.
3. La caracterización molecular llevada a cabo indica que los aislados continentales, junto con un aislado de lenguado, pertenecen al genotipo Ia. El resto aislados marinos se integraron dentro del genotipo III, incrementando la variabilidad existente en este grupo.
4. La técnica 2-SRA, de análisis de RFLP's en 2 pasos puesta a punto en este trabajo, se presenta como una alternativa rápida y relativamente sencilla al análisis de secuencias para la caracterización de nuevos aislados de VHSV. Mediante esta técnica se corroboraron los resultados obtenidos por secuenciación para el tipado de nuestros aislados.
5. Los experimentos de infección incluidos en este trabajo demuestran que los aislados marinos obtenidos de fletán negro inducen mortalidad con síntomas clínicos de VHSV en juveniles de rodaballo. Se demuestra también la transmisión horizontal por cohabitación con peces infectados mediante i.p., lo que nos alerta sobre el riesgo que suponen las cepas de VHSV de origen marino presentes en especies salvajes para la industria acuícola.

6. Los ensayos de infección experimental con alevines de trucha común revelaron que ni las cepas de origen continental ni la de origen marino fueron capaces de provocar mortalidad ni siquiera síntomas propios de VHS. Sin embargo, el virus se pudo detectar tanto en tejidos como en cerebro y cabe destacar la detección de la cepa marina en truchas expuestas al virus mediante cohabitación con ejemplares inoculados, ya que esto indica que es posible la transmisión horizontal. También se demostró la supervivencia de la cepa marina en agua dulce lo que facilita además la transmisión horizontal del virus.

BIBLIOGRAFÍA

Ahne W (1981). Serological techniques currently used in fish virology. *Dev. Biol. Stand.* 49: 327.

Ahne, W y I Thomsen (1985). Occurrence of viral hemorrhagic septicemia virus in wild whitefish *Coregonus* sp. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B* 32:73-75.

Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd y Leong JA (1996). Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 5 (2): 114-122.

Anónimo (2001). Status of wild Atlantic salmon: A river by river assessment. World Wildlife Foundation – US Marine Convention Program. Washinton DC. 165 pp.

Arakawa CK, RE Deering, KH Higman, KH Oshima, PJ O'Hara, y JR Winton. (1990). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.* 8:165-170.

Ariel E, y Olensen NJ (2002). Finfish in aquaculture and their diseases – a a retrospective view on the European Comunity. *Bull.Eur. Ass. Fish Pathol.* 22, 72-85.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore, DD, Seidman, JG, Smith, JA y Struhl K (1995). En *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and sons, INC.

Basurco B, Vende P, Monnier AF, Winton JR, de Kinkelin P y Benmansour A (1995) Genetic diversity and phylogenetic classification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Vet. Res.* 26, 460-463.

Batts WN, Traxler GS y Winton JR (1991). Factors affecting the efficiency of plating for selected fish rhabdoviruses. *Proceedings of the Second International*

symposium on Viruses of Lower Vertebrates. Oregon State University, Corvallis, pp 17-24.

Batts WN, Arakawa CK, Bernard J y Winton JR (1993). Isolates of viral hemorrhagic septicemia virus from North America and Europe can be detected and distinguished by DNA probes. *Dis. Aquat. Org.* 17, 67–71.

Bearzotti M, Monnier AF, Vende P, Grosclaude J, de Kinkelin P y Benmansour A (1995). The glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV): antigenicity and role in virulence. *Veterinary Research* 26, 413–422.

Bearzotti M, Delmas B, Lamoureux A, Loustau AM, Chilmonczyk S y Bremont M. (1999). Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *Journal of Virology* 73, 9: 7703-7709.

Benmansour A, Basurco B, Monnier AF, Vende P, Winton JR y de Kinkelin P (1997). Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *J. Gen. Virol.* 78, 2837–2846.

Bernard J, de Kinkelin P, Bearzotti M. y Le Berre M (1983). Viral haemorrhagic septicaemia of rainbow trout: relation between the G polypeptide and antibody production in protection of the fish after infection with the F25 attenuated variant. *Infect Immun* 39:7–14.

Bernard J, Keroualt B y de Kinkelin P (1984). High-performance thin-layer chromatography of lipids from different fish cell lines and from viral haemorrhagic septicaemia virus. *Annales de Virologie (Institute Pasteur)* 135 E, 177-182.

Biacchesi S, MI Thoulouze y col. (2000). Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes. *Journal of Virology* 74 (23): 11247-11253.

Boudinot P, M Blanco, P de Kinkelin y A Benmansour (1998). Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicaemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology*, 249:297-306.

Bowden TJ (2003). A study of the susceptibility of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis.* 26, 207–212.

Bracci L, G Antoni, M G Cusi, L Lozzi, N Niccolai, S Petreni, M Rustici, A Santucci, P Soldani, y PE Valensin (1988). Antipeptide monoclonal antibodies inhibit the binding of rabies virus glycoprotein and alpha-bungarotoxin to the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Immunol.* 25:881-888.

Broughan JH y WH Wunner 1995. Characterization of protein involvement in rabies virus binding to BHK-21 cells. *Arch. Virol.* 140:75-93.

Bruchhof B, Marquardt O y Enzmann PJ (1995). Differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses by reverse transcriptase-dependent polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 55, 111-119.

Brudeseth BE y Evesen Ø (2002). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in wild marine fish species in the coastal regions of Norway. *Dis. Aquat. Org.* 52, 21-28.

Brudeseth BE, Raynard RS, King JA y Evensen Ø (2005). Sequential pathology after experimental infection with marine viral hemorrhagic septicemia virus

isolates of low and high virulence in turbot (*Scophthalmus maximus* L) *Veterinary Pathology* 42(1):9-18.

Brunson R, True K y Yancey J (1989). VHS virus isolated at Makah National Fish Hatchery. *American Fisheries Society Newsletter* 17, 3.

Castric J, Jeffroy J, Bearzotti M y de Kinkelin P (1992). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild elvers *Anguilla anguilla*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 12, 21–23.

Castric J y P de Kinkelin (1984). Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*), to viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture* 41:203212.

Chico V, Gomez N, Estepa A y Perez L. (2006). Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 132: 154-159.

Coll J (1995). Low-pH increases the binding of haemorrhagic septicemia rhabdovirus to membrane phospholipids. *J. Fish Dis.* 18:519–527.

Coll J (2001). El trasposón SB de salmónidos como vector para transferencia de genes en vertebrados. *Investigaciones Agrarias*, 16: 237-244.

Conti C, Mastromarino P, Ciuffarella MG y N Orsi (1988). Characterization of rat brain cellular membrane components acting as receptors for vesicular stomatitis virus. Brief report. *Archives of Virology*, 99: 261-269.

Corbeil S, SE LaPatra, ED Anderson, J Jones, B Vincent, YL Hsu y G Kurath (1999). Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines. *Dis. Aquat. Organ.* 39 (1): 29-36

Cowley JA, Dimmock CM, Spann KM y PJ Walker (2000). Detection of Australian gill-associated virus (GAV) and lymphoid organ virus LOV of *Penaeus monodon* by RT-nested PCR. *Dis. Aquat. Org.* 39, 159-167.

Cutrín JM, Barja JL, Nicholson BL, Bandín I, Blake S, y CP Dopazo (2004). Restriction fragment length polymorphisms and sequence analysis: an approach for genotyping infectious pancreatic necrosis virus reference strains and other aquabirnavirus isolated from northwestern Spain. *Appl Environ Microbiol* 70(2):1059-1067.

Cutrín JM, C López-Vázquez, JG Oliveira, S Castro, CP Dopazo y I Bandín (2005). Isolation in cell culture and detection by PCR-based technology of IPNV-like virus from leucocytes of carrier turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) *J. Fish Dis.* 28: 710-722.

Dalla Valle L, Zanella L, Patarnello P, Paolucci L, Belvedere P y L Colombo (2000). Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *J. Fish Dis.* 23(5), 321-327.

De Kinkelin P, Le Berre M, y Meurillon A, (1974): Septicémie hémorragique virale: Démonstration de l'état réfractaire du saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) et de la truite fario (*Salmo trutta*). *Bull. Franc. Piscicult.* 253, 166-176.

De Kinkelin P y M Le Berre. (1977). Isolement d'un Rhabdovirus pathogène de la Truite Fario (*Salmo trutta*, L.). *C. R. Acad. Sci. Paris* 284:101-104.

Deering R E, CK Arakawa, KH Oshima, PJ O'Hara, ML Landolt, y JR Winton (1991). Development of a biotinylated DNA probe for detection and identification of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.* 11:57-65.

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

Dixon PF, Feist S, Kehoe E Pary, L Stone, DM y K Way (1997). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from atlantic herring *Clupea harengus* from the English Channel. *Dis. Aquat. Org.* 30, 81-89.

Dixon PF, Avery S, Chambers E, Feist S, Madhar H, Parry L, Stone DM, Stromen HK, Thurlow JK, Tsin-yee Lui C y K Way (2003). Four years of monitoring for viral haemorrhagic septicaemia virus in marine waters around the United Kingdom. *Dis. Aquat. Org.* 54, 175-186.

Dopazo CP y Barja JL (2001) A comparison between polymerase chain reaction and serological techniques for detection of fish viruses. (Proceedings of the OIE International Conference, 8-10 Feb. 2000), Risk analysis in aquatic animal health (C.J. Rodgers, édit.) 271-275.

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

Dopazo CP, Hetrick FM y SX Samal (1994). Use of cDNA probes for diagnosis of infectious pancreatic necrosis virus infections. *J. Fish Dis.* 17: 1-16.

Dopazo CP, Bandín I, López-Vázquez C, Lamas J, Noya M y JL Barja (2002). Isolation of viral hemorrhagic septicaemia virus from Greenland halibut *Reinhardtius hippoglossoides* caught at Flemish Cap. *Dis. Aquat. Org.* 50,171-179.

Dorson M y C Torhy (1993) Viral haemorrhagic septicaemia virus replication in external tissue excised from rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and hybrids of different susceptibilities. *J. Fish Dis.* 16, 403- 408.

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

Einer-Jensen K, Björklund H, Orshkova S, Shchelkunov I, Vesely T y Lorenzen N (2002). Detection and typing of fish viruses. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 22(2), 158-165.

Einer-Jensen K, Ahrens P, Forsberg R y N Lorenzen (2004) Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus; *J. Gen. Virol.* 85:1167-1179.

Einer-Jensen K, Ahrens P y N Lorenzen (2005a) Parallel phylogenetic analyses using the N, G or Nv gene from a fixed group of VHSV isolates reveal the same overall genetic typing. *Dis. Aquat. Org.* 67, 39-45.

Einer-Jensen K, Winton J y N Lorenzen (2005b). Genotyping of the fish rhabdovirus, viral haemorrhagic septicaemia virus by restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Microbiology* 106, 167–178.

Einer-Jensen K, Winton J y N Lorenzen (2006) Genetic stability of the VHSV consensus sequence of G-gene in diagnostic samples from an acute outbreak. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 26 (2): 62-67.

Elsayed E, Faisal M, Thomas M, Whelan G, Batts W y J Winton (2006) Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J. Fish dis.* 29: 611-619.

Enzman PJ (1981). Rapid identification of VHSV from trout by immunofluorescence. In: W. Hennessen (Ed.), *Fish Biologics. Serodiagnostics and Vaccines. Developments in Biological Standardization*, Vol. 49, S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sidney pp 57-62.

Enzmann PJ y B Bruchhof (1989). Comparative studies on Viral haemorrhagic septicaemia viruses and infectious haematopoietic necrosis virus. An attempt to demonstrate an immunological relationship. In: K. Lillelund and H. Rosenthal (Eds.), *Fish Health Protection Strategies*. Bundesministerium für Forschung und Technologie, pp. 107-120.

Enzmann PJ, Konrad M y J Rapp (1992) Epizootiological studies on viral haemorrhagic septicaemia in brown trout *Salmo trutta fario*. *Dis. Aquat. Org.* 12, 143–146.

Enzmann PJ, Bergmann S y D Fichtner (2000). New VHS Strains? Molecular analysis of G- and NV- genes for risk assessment and role of PCR in risk management. *Int. Conf. on Risk Analysis in Aquatic Animal Health*. OIE. Paris. P.71.

Enzmann PJ, Bergmann S, Fichtner D y TA Miller (2001). The role of molecular analysis of G and NV-genes and diagnostic reverse transcription-polymerase chain reaction in risk management of potential new strains of viral haemorrhagic septicaemia. (Proceedings of the OIE International Conference, 8-10 Feb. 2000), *Risk analysis in aquatic animal health* (C.J. Rodgers, édit.) 265-270.

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

Estepa AM y JM Coll (1996). Pepscan mapping and fusion-related properties of the major phosphatidylserine-binding domain of the glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus, a salmonid rhabdovirus. *Virology*, 216: 60-70.

Estepa AM, Rocha AI, Mas V, Perez L, Encinar JA, Nuñez E, Fernandez A, Gonzalez Ros JM, Gavilanes F y JM Coll (2001). A protein G fragment from the salmonid viral hemorrhagic septicemia rhabdovirus induces cell-to-cell fusion and membrane phosphatidylserine translocation at low pH. *J. Biol. Chem.* 276: 46268-46275.

European Commission. Decision 2001/183/EC. Commission Decision of 22 February 2001 laying down the sampling plans and diagnostic methods for the detection and confirmation of certain fish diseases and repealing Decision 92/532/EEC

FAO (1999) La asistencia técnica de la FAO en el área del comercio internacional y la información. *FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Roma.

Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, Ball L A (Eds.), (2005). Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier academic press*. London.

Fernández-Alonso M, Alvarez F, Estepa y J.M. Coll (1999). G disulphide bond native conformation is required to elicit trout neutralizing antibodies against VHSV. *J. Fish Dis.* 22: 219-222.

Fernández-Alonso M, A Rocha y J.M. Coll (2001). DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine*, 19:3067-3075.

Finke S, Mueller-Waldeck R, y Karl-Klaus Conzelmann (2003) Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication *J. Gen. Virol.* 84: 1613 - 1621.

Follett JE, Meyers TR, Burton TO y JL Geesin (1997) Comparative susceptibilities of salmonid species in Alaska to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and North American viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Journal of Aquatic Animal Health* 9, 34–40.

Gagné N, MacKinnon AM, Boston L y Olivier G. (2005) Isolation of viral hemorrhagic septicaemia (VHS) from several fish species in eastern Canada. 12th International Conference of the EAAP on Diseases of Fish and Shellfish, Abstract Book, P-10.

Gahlawat SK, Munro ES y Ellis AT (2004) A non destructive test for detection of IPNV-carrier in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish. Dis.* 27: 233-239.

Gastka M, J. Horvath y TL Lentz. (1996). Rabies virus binding to the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit demonstrated by virus overlay protein binding assay. *J. Gen. Virol.* 77:2437-2440.

Ghittino P (1973). Viral haemorrhagic septicaemia (VHS). In: Dill, W.A. (ed.) Symposium on the Major Communicable Fish Diseases in Europe and Their Control. EIFAC (European Inland Fisheries Advisory Committee). Technical Paper 17, Supplement 2. FAO, Rome, pp. 4-41.

Giray C, Opitz HM, MacLean S y D Bouchard (2005) Comparison of lethal versus non-lethal sample sources for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Dis. Aquat. Org.* 66: 181-185.

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

Griffiths y Melville (2000) Non-Lethal detection of ISAV in Atlantic salmon by RT-PCR using serum and mucus samples. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 20 (3): 157-162.

Guillou JP, Merle G, Henault S y AM Hattenberger (1999). Detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by reverse transcriptions followed by polymerase chain reaction. Diagnostic validation. *Vet. Res.* 26, 512-520.

Hedrick RP, Batts NW, Yun S, Traxler GS, Kaufman J y JR Winton (2003). Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.* 55, 211-220.

Hepell J, N Lorenzen, NK Armstrong, T Wu, E Lorenzen, K Einer-Jensen, J Schorr y HL Davis (1998). Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model. *Fish & Shellfish Immunol.* 8(4):271- 286.

Hershberger PK, Kocan RM, Elder NE, Meyers TR y JR Winton (1999) Epizootiology of viral hemorrhagic septicemia virus in Pacific herring from the spawn-on-kelp fishery in Prince William Sound, Alaska, USA. *Dis. Aquat. Org.* 37, 23–31.

Hiney M (2000). Validation of non cultured based pathogen detection problems and practical experience. In “*Risk analysis in aquatic animal health*” Proc. OIE Int. Conference. Paris, Feb 8-10 pp 259-264.

Hopper K (1989). The isolation of VHSV from salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington. *Am.Fish Soc.Fish Health Newsletter* 17, 1.

Hsu Y L, Engelking H M y Leong J C (1986) Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish. *Appl Environ Microbiol.* December; 52(6): 1353–1361.

Huising MO, T Guichelaar, C Hoek, BML Verburg-van Kemenade, G Flik, HFJ Savelkoul, y JHWM Rombout (2003). Increased efficacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment. *Vaccine*, 21:4178-4193.

Isshiki T, Nagano T y T Miyazaki (2003) Susceptibility of various marine fish species to viral hemorrhagic septicemia virus isolated from Japanese flounder. *Fish Pathology* 38, 113–115.

Ito T, Mori KI, Arimoto M y K Nakajima (2004) Virulence of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolates from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in rainbow trout and several species of marine fish. *Fish Pathology* 39, 103–104.

Jensen MH (1965) Research on the virus of Egtved disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 126, 422–426.

Jensen NJ, Bloch B y JL Larsen (1979) The ulcer-syndrome in cod (*Gadus morhua*) III. A preliminary virological report. *Nordisk Veterinærmedicin* 31, 436–442.

Jiménez N, Coll J, Estepa A, y Tafalla. (2005) Futuro de las vacunas ADN frente a virus en acuicultura. *AquaTIC*, 23: 20-35.

Jorgensen PEV y A Meyling (1972). Egtved virus: demonstration of virus antigen by the fluorescent antibody technique in tissues of rainbow trout affected by viral haemorrhagic septicaemia and in cell cultures infected with Egtved virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 36:115122.

Jorgensen PEV (1982). Egtved virus: temperature-dependent immune response of trout to infection with low-virulence virus. *J. Fish dis.* 5, 47-55.

Kaufman J y RT Holt (2001) Isolation of North American Viral hemorrhagic septicemia Virus (VHSV) from Columbia river smelt (*Thaleichthys pacificus*) FHS Newsletter 29:1-3.

King JA, Snow M, Smail DA y RS Raynard (2001a). Distribution of viral haemorrhagic septicaemia virus in wild fish species of the North Sea, north east Atlantic Ocean and Iris Sea. *Dis. Aquat. Org.* 47, 81-86.

King JA, Snow M, Skall HF y RS Raynard (2001b) Experimental susceptibility of Atlantic salmon *Salmo salar* and turbot *Scophthalmus maximus* to European freshwater and marine isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Dis. Aquat. Org.* 47, 25–31.

Knuesel R, Segner H y T Wahli (2003) A survey of viral diseases in farmed and feral salmonids in Switzerland. *J. Fish Dis.* 26(3):167-82.

Kocan RM, Hersheberg PK y NE Elder (2001a). Survival of North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in filtered seawater and seawater containing ovarian fluid, crude oil and serum-enriched culture medium. *Dis. Aquat. Org.* 44: 75-78.

Kocan RM, Hersheberg PK, Elder NE y JR Winton (2001b). Epidemiology of viral hemorrhagic septicemia among juvenile Pacific herring and Pacific sand lances in Puget Sound, Washington. *J. Aquat. Anim. Health* 13, 77-85.

Kuchler RJ (1977). Biochemical methods in cell culture and virology. Dowden, Hutchinson y Ross, Inc. Pensilvania, USA. 331 pp.

Kurath G, Higman KH, y HV Bjorklund (1995) The NV genes of fish rhabdovirus: development of RNase protection assays for rapid assessment of genetic variation. *Vet. Res.* 26, 477-485.

Kurath G, Higman KH, y HV Bjorklund (1997) Distribution and variation of NV genes in fish rhabdoviruses *J. Gen. Virol.*, 78: 113 - 117.

Lannann CN, Winton JR, JR Fryer (1984) Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In vitro* 20:671-676.

Le Berre M, P de Kinkelin y A Metzger (1977). Identification serologique des rhabdovirus des salmonides. *Bull Off. Int. Epizoot.* 87:391-393.

Ledo A, Dopazo CP, Lupiani B, Barja JL y AE Toranzo (1987). Incidencia del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) en Galicia. *Cuadernos Marisqueros Publicaciones técnicas.* 12: 645-650.

Lenoir G y P de Kinkelin (1975). Fish rhabdoviruses: comparative study of protein structure. *J Virol.* 16 (2): 259–262.

Lentz TL, TG Burrage, AL Smith, J Crick, y GH Tignor (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies receptor? *Science* 215:182-184.

Lentz TL, JJ Benson, D Klimowicz, PT Wilson y E Hawrot. (1986). Binding of rabies virus to purified Torpedo acetylcholine receptor. *Mol. Brain Res.* 1:211-219.

Leong JA, Anderson ED, Bootland LM, Chiou PW, Johnson M, Kim C, Mourich D y G Trobridge (1997). Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. *Dev. Biol. Stand.* 90: 267-277.

Lorenzen N, Olesen NJ, Jørgensen PEV (1993) Antibody response to VHS virus proteins in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 3:461-473.

Lorenzen E, Carstensen B y NJ Olesen (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses:VHSV, IHNV and IPNV. *Dis. Aquat. Org.* 37, 81-88.

Lorenzen N, E Lorenzen, K Einer-Jensen y SE LaPatra (2002). Immunity induced shortly after DNA vaccination of rainbow trout against rhabdoviruses protects against heterologous virus but not against bacterial pathogens. *Devel. Comp. Immunol.* 26(2):173-179.

Manoj S, Babiuk LA y Van Drunen Littel-van den Hurk S (2004) Approaches to enhance the efficacy of DNA vaccines. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 41 (1): 1-39.

Mas V, Pérez L, Encinar J, Pastor M T, Rocha A, Perez-Paya E., Ferrer-Montiel A, Gonzalez Ros J M, Estepa A y J M Coll (2002). Salmonid viral haemorrhagic septicaemia virus: fusion-related enhancement of virus infectivity by peptides derived from viral glycoprotein G or a combinatorial library. *J. Gen. Virol.* 83: 2671-2681.

Mas V, Rocha A, Perez L, Coll JM y A Estepa (2004) Reversible inhibition of spreading of in vitro infection and imbalance of viral protein accumulation at low pH in viral hemorrhagic septicemia rhabdovirus, a salmonid rhabdovirus. *J Virol.*; 78(4):1936-44.

Mastromarino P, Conti C, Goldoni P, Hauttecoeur B y N Orsi (1987). Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH. *J. Gen. Virol.*, 68: 2359-2369.

McBeath AJA, Burr KL y CO Cunningham (2000). Development and use of DNA probe for confirmation cDNA from infectious salmon anaemia virus (ISAV) in PCR products. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol* 20 (4): 130-134.

Meier W, y PEV Jorgensen (1980). Isolation of VHS virus from pike fry (*Esox lucius*) with hemorrhagic symptoms. Pages 817 in W. Ahne, ed. *Fish diseases*. Third COPRAQSession. SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Meier W, Schmitt M, y T Wahli (1994). Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) of non salmonids. *Annu rev Fish Dis* 4: 359-373.

Meyers TR y JR Winton (1995) Viral hemorrhagic septicemia virus in North America. *Annual Review of Fish Diseases* 5, 3–24.

Meyers TR, Sullivan J, Emmenegger E, Follett J, Batts WN y JR Winton (1992). Identification of viral hemorrhagic septicaemia virus isolated from Pacific cod *Gadus macrocephalus* in Prince William Sound, Alaska, USA. *Dis. Aquat. Org.* 12, 165-175.

Meyers TR, Short S, Lipson K, Batts WN, Winton JR, Wilcock J y E Brown (1994). Association of viral hemorrhagic septicaemia virus with epizootic hemorrhages of the skin in Pacific herring *Clupea harengus pallasii* from Prince William Sound and Kodiak Island, Alaska, USA. *Dis. Aquat. Org.* 19, 27-37.

Meyers TR, Short S y K Lipson (1999). Isolation of the North American strain of viral hemorrhagic septicaemia (VHS) associated with epizootic mortality in 2 new host species of Alaskan marine fish. *Dis. Aquat. Org.* 38, 81-86.

Mikalsen AB, Teig A, Helleman AL, Mjaaland S y E Rimstad (2001). Detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) by RT-PCR after cohabitant exposure in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 47, 175-181.

Miller TA, Rapp J, Wastlhuber U, Hoffmann RW y PJ Enzmann (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.

Mortensen HF, Heuer OE, Lorenzen N, Otte L y NJ Olesen (1999). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Vatteat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Res.* 63, 95-106.

Mourton C, Bearzotti M, Piechaczyk M, Paolucci F, Pau B, Bastide JM y P de Kinkelin (1990) Antigen-capture ELISA for viral haemorrhagic septicaemia virus serotype I. *J Virol Methods*: 29(3):325-33.

Mulcahy y Batts (1987) Infectious hematopoietic necrosis virus detection by separation and incubation of cells from salmonid cavity fluid. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44: 1071-1075.

Munro ES, SK Gahlawat y AE Ellis (2004). A sensitive non-destructive method for detecting IPNV carrier Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by culture of virus from plastic adherent blood leucocytes. *J. Fish. Dis.* 27: 129-134.

Murphy FA, CM Fauquet, DHL Bishop, SA Ghabrial, AW Jarvis, GP Martelli, MA Mayo, MD Summers (eds.) (1995). Virus Taxonomy. Sixth Report Of The International Committee On Taxonomy Of Viruses. *Archives Of Virology, Vienna*: Springer, P. 586.

Neukirch M (1984). An experimental study of the entry and multiplication of a viral haemorrhagic septicemia virus in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after water-borne infection. *J. Fish Dis.* 7:231-234.

Neukirch M (1986). Demonstration of persistent viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus in rainbow trout after experimental waterborne infection. *Zentralbl Veterinarmed B.* Aug; 33(6):471-6.

Nichol ST, Rowe JE y JR Winton (1995) Molecular epizootiology and evolution of the glicoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Virus Research* 38, 159-173.

Nicholson BL (1982). Infectious hematopoietic necrosis (IHN). Antigenes of Fish Pathogens: Development and Production for Vaccines and Serodiagnostics. Symposium International de Talloires. D. P. Anderson, M. Dorson y P. Dobourget Eds., Collection Foundation Marcel Merieux. France: 63-79.

Nims L, J L Fryer, y col. (1970). "Studies of replication of four selected viruses in two cell lines from salmonid fish." *Proc. Exp. Biol. Med.* 135: 6-12.

Nishizawa T, Iida H, Takano R, Isshiki T, Nakajima K y K Muroga (2002) Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Dis. Aquat. Org.* 48, 143-148.

Nishizawa T, Savas H, Isidan H, Üstündag C, Iwamoto H y M Yoshimizu (2006) Genotyping and pathogenicity of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus from free-living (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black Sea. *Applied and environmental Microbiology.* 72: 2373-2378.

Ocvirk J, Snoj N, Fijan N y Ž Matašin (1981) Virusna hemoragična septikemija kod pastrva u Sloveniji. *Vet Glasn;* 35: 1013-17.

OIE (Office International des Epizooties) (2006). Manual of diagnostic tests for aquatic animals , 5th ed. OIE, Paris.

Olesen NJ, Lorenzen N y PEV Jørgensen (1993) Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.* 16, 163–170.

Olveira JG (2006) Diseño y evaluación de técnicas moleculares para diagnóstico de birnavirus acuáticos. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.

Opitz HM, Bouchard D, Anderson E, Blake S, Nicholson B y W Keleher (2000) A comparison of methods for the detection of experimentally induced subclinical infectious salmon anaemia in Atlantic salmon. *Bull Eur. Assoc. Fish Pathol.* 20: 12-22.

Ord WM, Le Berre M y P de Kinkelin (1976) Viral haemorrhagic septicaemia: comparative susceptibility of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and híbrids (*S. gairdneri* × *Oncorhynchus kisutch*) to experimental infection. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33, 1205- 1208.

Oshima KH, Higman KH, Arakawa CK, de Kinkelin P, Jørgensen PEV, Meyers TR y JR Winton (1993) Genetic comparison of viral hemorrhagic septicemia virus isolates from North America and Europe. *Dis. Aquat. Org.* 17, 73–80.

Parry L y Dixon PF (1997) Stability of nine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates in sea water. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol* 17:31-36

Rasmussen CJ (1965) A biological study of the Egtved disease (INUL). *Annals of the New York Academy of Sciences* 126, 427–460.

Reed L y H Muench. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 27, 493-497.

Řehulka (2003) Haematological analyses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* affected by viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *Dis. Aquat. Org.* 56: 185-193.

Rodríguez S, Alonso M y SI Pérez-Prieto (2001). Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) from leukocytes of carrier rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol.* 36(3), 139-146.

Ross K, McCarthy U, Huntly PJ, Wood BP, Stuart D, Rough EI, Smail DA y DW Bruno (1994). An outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) in Scotland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 14, 213-214.

Schlegel R, Tralka TS, Willingham MC y IH Pastan (1983). Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding sites? *Cell* 32: 639-646.

Schäperclaus W (1938) Die schädigungen der deutschen fischerei durch fischparasiten und fischkrankheiten. *Allg Fischztg* 41: 256-259.

Schlotfeldt H J, Ahne W, Vestergard-Jorgensen PE y W Glende (1991). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*)-A natural outbreak. *Bulletin European Association Fish Pathology* 11, 105-107.

Schutze H, Enzmann PJ, Mundt E y TC Mettenleiter (1996) Identification of the non-virion (NV) protein of fish rhabdoviruses viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus. *J. Gen. Virol.*, Vol 77, 1259-1263.

Schutze H, Mundt E y TC Mettenleiter (1999). Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes* 19, 59-65.

Skall HF, Slierendrecht WJ, King JA y NJ Olesen (2004) Experimental infection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with viral haemorrhagic septicaemia virus isolates from European marine and farmed fishes. *Dis. Aquat. Org.* 58, 99–110.

Skall HF, Olesen NJ y S Møllergaard (2005) Prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus in Danish marine fishes and its occurrence in new host species. *Dis. Aquat. Org.*, 66: 145-152.

Smail DA (1999). Viral haemorrhagic septicaemia. In *Viral, Bacterial and Fungal Infections*, pp. 123–147. Edited by P. T. W. Woo & D. W. Bruno. Wallingford, UK: CAB International.

Smail DA (2000). Isolation and identification of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from cod *Gadus morhua* with the ulcer syndrome and from haddock *Melanogrammus aeglefinus* having skin haemorrhages in the North Sea. *Dis. Aquat. Org.* 41(3), 231-235.

Snow M y DA Smail (1999) Experimental susceptibility of turbot *Scophthalmus maximus* to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from cultivated turbot. *Dis. Aquat. Org.* 38, 163–168.

Snow M, Cunningham CO, Melvin WT y G Kurath (1999a) Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Virus Research* 63, 35–44.

Snow M, Bowden TJ y IR Bricknell (1999b) Susceptibility of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) to viral haemorrhagic septicaemia virus. 9th International Conference of the EAFP on Diseases of Fish and Shellfish, Abstract Book, P-176.

Snow M y Cunningham CO (2000) Virulence and nucleotide sequence analysis of marine viral haemorrhagic septicaemia virus following in vivo passage in rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 42, 17–26.

Snow M, Cunningham CO y IR Bricknell (2000) Susceptibility of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from wild-caught Atlantic cod. *Dis. Aquat. Org.* 41, 225–229.

Snow M, Raynard RS, Murray AG, Bruno DW y 5 others (2003). An evaluation of current diagnostic tests for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) following experimental water-borne infection of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 26: 135-145.

Snow M, Bain N, Black J, Taupin V, Cunningham CO, King JA, Skall HF y RS Raynard (2004) Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.* 61, 11–21.

Snow M, King JA, Garden A, Shanks AM y RS Raynard (2005a) Comparative susceptibility of turbot *Scophthalmus maximus* to different genotypes of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Dis. Aquat. Org.* 67, 31-38.

Snow M, King JA, Garden A y RS Raynard (2005b) Experimental susceptibility of Atlantic cod, *Gadus morhua* (L.), and Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), to different genotypes of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Fish Dis.* 28 (12), 737-742.

Stone DM, Way K y PF Dixon (1997) Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from different geographical areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus morhua* L.). *J. Gen. Virol.* 78, 1319–1326.

Strømme HK y Stone DM (1998) Detection of viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) Virus in fish tissues by semi-nested polymerase chain reaction (PCR). En *Methodology in Fish Diseases Research*. Barnes, AC; Davidson, GA; Hiney MP & McIntosh, D (Eds) *Fish Res. Services*. Aberdeen.

Superti F, L. Seganti H, Tsiang y N Orsi. (1984). Role of phospholipids in rhabdovirus attachment to CER cells. Brief report. *Arch. Virol.* 81:321-328.

Takafumi I, Koh-ichiro M, Misao A y K. Nakajima (2004). Virulence of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV isolates from Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* in rainbow trout and several species of marine fish. *Fish Pathology*, 39 (2), 103-104.

Takano R, Nishizawa T, Arimoto M y K Muroga (2000). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 20, 186-192.

Taksdal T, Dannevig BH y E Rimstad 2001. Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 21(5), 214-219.

Thiéry R, de Boisséson C, Jeffroy J, Castric J, de Kinkelin P y A Benmansour (2002) Phylogenetic analysis of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates from France (1971–1999). *Dis. Aquat. Org.* 52, 29–37.

Tomasec J y N Fijan (1971). Virusne bolestiriba (viral diseases of fish) Fianl Reprt on Research under a part of project 6A/1966 Zagreb, 29pp.

Toranzo AE (1980) Supervivencia de Enterovirus y virus de peces salmónidos en el medio acuático. Inactivación de Polio 1 por bacterias marinas productoras de antibiótico. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Tordo N, Benmansour A, Calisher C, Dietzgen RG, Fang RX y col. (2005). Family Rhabdoviridae. In Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, ed. CM Fauquet, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberger, LA Ball. *Elsevier academic press*. London.

Traxler G, Kieser D y TPT Evelyn (1995) Isolation of North American strain of VHS virus from farmed Atlantic salmon. In: Aquaculture Update No. 72 (ed. by L. Margolis), Aquaculture Division, Pacific Biological Station, Nanaimo, BC.

Traxler GS, Kieser D y J Richard (1999). Mass mortality of pilchard and herring associated with viral hemorrhagic septicemia virus in British Columbia, Canada. *American Fisheries Society Fish Health Section Newsletter* 27, 3–4.

Tuffereau C, Benejean J, Blondel D, Kieffer B y A Flamand (1998). Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.* 17: 7250–7259.

Villanueva N, Hardy R, Asenjo A, Yu Q y G Wertz (2000). The bulk of the phosphorylation of human respiratory syncytial virus phosphoprotein is not essential but modulates viral RNA transcription and replication. *J Gen Virol* 81, 129–133.

Vis ML, SM Carr, WR Bowering y WS Davidson (1997). Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) in the North Atlantic are genetically homogeneous. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54:1813-1821.

Walker PJ, Benmansour A, Dietzgen R, Fang RX, Jackson AO, Kurath G, Leong JC, Nadin-Davies S, Tesh RB y N Tordo (2000). Family Rhabdoviridae. In: Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo

M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. y Wickner R.B., eds. Academic Press, San Diego, USA.

Wang WS, Wi YL y JS Lee (1997). Single-tube, non-interrupted reverse transcription PCR for detection of infectious pancreatic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.* 28, 229-233.

Warrell MJ (2004). Rabies and other lissavirus infections. In *Principles and practice of clinical virology*. Fifth Edition. Ed: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD and Schoub BD pp: 631-660

Watanabe L, Pakingking R, Iida H, Nishizawa T, Iida Y, Arimoto M y K Muroga (2002). Isolation of Aquabirnavirus and Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) from wild marine fishes. *Fish Pathol.* 37(4), 189-191.

Winton JR (1991). Recent advances in detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus in aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.* 1:83-93.

Winton JR y K Einer-Jensen (2002). Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia. In: C.O. Cunningham (Ed), *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp 49-79.

Wizigmann G, C Baath y R Hoffmann. (1980). Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus from fry of rainbow trout, pike, and grayling. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B* 27:7981.

Wolf K (1988). *Fish viruses and fish viral diseases*. Cornell University Press, Ithaca, N.Y. 476 pp.

Wolf K y Quimby MC (1962). Establishment eurhythermic cell line of fish cell in vitro. *Science* 135: 1065-1066.

Wolf K y Quimby MC (1966). Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. *Science* 151: 1004-1005.

Wongteerasupaya C, Tongchuea W, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B y TW Flegel (1997). Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.* 31, 181-186.

Wunner WH, Reagan KJ y H Koprowski (1984). Characterization of saturable binding sites for rabies virus. *J Virol.*; 50: 691–697.

Yamamoto T, Batts WN, Arakawa CK y JR Winton (1990). Multiplication of infectious haematopoietic necrosis virus in rainbow trout following immersion infection: whole body assay and immunochemistry. *Journal of Aquatic Animal Health* 2, 271-280.

Yang F y X Xu (1993). A new method of RNA preparation for detection of hepatitis A virus in environmental samples by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 43(1):77–84.