



**Universidad Nacional Autónoma de México  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la  
Producción y de la Salud Animal**

**Evaluación de la respuesta inmune en truchas arcoíris  
(*Oncorhynchus mykiss*) inmunizadas con una vacuna  
inactivada contra el virus de la necrosis pancreática  
infecciosa**

**Tesis  
Que para optar por el grado de  
Doctora en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal**

**Presenta:  
Catalina Tufiño Loza**

**Tutor Principal:  
Dra. Elizabeth Loza Rubio - INIFAP**

**Miembros del Comité Tutoral:  
Dra. Carolina Tafalla Piñeiro - CISA, INIA  
Dr. José Juan Martínez Maya - FMVZ, UNAM**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx.**

**Enero 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Dedicatorias

A mis padres, Rosa María y Miguel, les agradezco su apoyo, guía y su confianza en la realización de mis sueños. Soy afortunada por contar siempre con su amor, comprensión y ejemplo. Esta tesis es suya.

A mis hermanas, Tere y Rosita, mis cómplices en todo, por el cariño y sueños que hemos compartido y realizado. A Jaime y Dessi que ahora son parte de mis motivaciones en la vida.

A mis abuelitos, Lucía, Manuel y Chuchito, mis tíos José, Naín, Pancho, mi prima Lucy y mis tías Leonor y Mary, que me acompañan siempre y mandan sus bendiciones desde el cielo.

A Luis por su cariño, su estímulo, su apoyo constante, sus conocimientos y la gran ayuda que me brindo para concluir este trabajo...evidencia de su gran amor ¡¡¡Gracias!!!

A Meche, Edith, Dianita, Roci, Ephraim, Jaz, Francisco, los alumnos de la UVM y muchísimas mas personas que conocí durante el doctorado, que son amigos increíbles y con quienes he compartido muchos momentos que siempre llevaré en mi corazón. Ustedes han enriquecido mi vida con su cariño, alegría y mucha sabiduría. Gracias por recordarme que hay personas valiosas en el mundo y gracias por estar en el mío.

A la Dra. Elizabeth Loza Rubio por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, en un marco de confianza y afecto, fundamentales para la elaboración de este trabajo.

A todas las personas que han dejado huella en mi vida, ustedes han sido fuente de alegría e inspiración y fueron de gran ayuda para terminar este proyecto.

*- Por mi oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprendido, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de este trabajo. Por lo que ha sido y será . . . Gracias -*

## Agradecimientos

- Al Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias - Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias – Laboratorio de Biotecnología en Salud Animal que me proporcionaron un lugar para la realización de esta tesis, bajo la tutoría de la Dra. Elizabeth Loza Rubio.
- A CONACyT que me proporcionó la beca nacional con No. de registro: 348454, para llevar a cabo mis estudios de doctorado.
- Al proyecto “Clonación y expresión de la proteína VP2 del virus de la necrosis pancreática infecciosa en un sistema de baculovirus y su evaluación *in vivo* con fines de protección”, clave de registro: CB-2009-01-34099 de CONACyT.
- A la Dra. Carolina Tafalla Piñeiro y al Dr. José Juan Martínez Maya por la orientación y ayuda que me brindaron para la realización de esta tesis, por su apoyo y amistad que me permitieron aprender mucho más.
- Al Dr. César Ortega Santana por la donación de la línea celular Bf-2, así como la asesoría técnica y científica sobre su manejo por la técnico Alicia Reyes en el laboratorio de virología del CIESA-UAEMEX.
- Al Dr. Constantino López Macías de la Unidad de Investigación Médica en Inmunohistoquímica del Centro Médico Siglo XXI, por la donación y asesoría científica en el uso de las porinas purificadas.
- A la Dra. Celene Salgado Miranda del CIESA-UAEMEX, por la asesoría técnica y científica para el manejo de las truchas y del virus de la necrosis pancreática infecciosa.
- A todos los alumnos de la Universidad del Valle de México que trabajaron conmigo, a quienes les tengo una especial gratitud por brindarme su gran apoyo técnico y científico, sin el cual no hubiera sido posible llevar a cabo este proyecto.
- A los trabajadores y personal de las granjas acuícolas que me apoyaron con sus conocimientos y se encargaron de proveer los organismos necesarios para este proyecto.

## Resumen

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) constituye una de las principales preocupaciones para la acuicultura que requiere el desarrollo de vacunas eficaces y seguras. En este trabajo, se evaluó la respuesta inmune en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) inmunizadas con una vacuna experimental inactivada mediante radiación gamma contra el VNPI con porinas de *Salmonella typhi* como adyuvante. Para ello, se analizaron los niveles de expresión de genes relevantes de la respuesta inmune en truchas arcoíris inmunizadas intraperitonealmente. La transcripción de los genes de la respuesta inmune se cuantificó mediante PCR en tiempo real en riñón, bazo, sacos pilóricos y células peritoneales de las truchas después de la vacunación y durante el desafío con el VNPI. Los datos de expresión genica indicaron que la vacuna experimental sin adyuvante indujo una respuesta inmune predominante humoral. Las porinas, solas o combinadas con la vacuna indujeron una respuesta inmune mediada por células principalmente. En conclusión, la vacuna inactivada con adyuvante demostró que no ser capaz de inducir protección contra una infección experimental del VNPI en truchas arcoíris inmunizadas. Mientras que la vacuna viral inactivada demostró inducir un efecto protector moderado contra la infección experimental del VNPI y las porinas mostraron su capacidad de incrementar la respuesta inmune siempre y cuando se utilice una dosis adecuada. Los resultados presentados en este estudio también muestran a la radiación gamma como un método de inactivación útil para el desarrollo de vacunas y a las porinas como un candidato potencial de adyuvante para la acuicultura.

## **Abstract**

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is a major concern to salmon and trout aquaculture that requires the development of an effective and safe vaccine development. In the current study, the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) elicited with an experimental  $\gamma$ -radiation-inactivated IPNV vaccine with the inclusion of *Salmonella typhi* porins as adjuvant was evaluated. We have quantified the expression levels of different relevant immune genes in rainbow trout injected intraperitoneally with these vaccine prototypes. Immune gene transcription levels were quantified by real-time PCR analysis in kidney, spleen, pyloric caeca and peritoneal cells sampled from trout after vaccination and during a subsequent challenge with IPNV. Gene expression data indicated that the vaccine alone induced a predominantly humoral immune response. Either injected alone or combined with the vaccine, the porins promoted a predominantly cell-mediated immune response. In conclusion, the vaccine inactivated with adjuvant showed that it was not able to induce protection against an experimental infection of VNPI in immunized rainbow trout. Unlike, the inactivated viral vaccine demonstrated its potential by inducing a moderate protective effect against IPNV in rainbow trout and the porins showed their capacity to enhance the immune response as long as an adequate dose is provided. The results presented in this study, offer  $\gamma$ -irradiation as an alternative inactivation method for the development of vaccines and point to porins as suitable adjuvants in aquaculture.

## CONTENIDO

	Página
1. Antecedentes	1
2. Introducción	2
2.1 Características del VNPI	2
2.2 Distribución del VNPI	6
2.3 Epizootiología	6
2.4 Transmisión	6
2.5 Signos clínicos	7
2.6 Respuesta inmune	7
2.6.1 Órganos y tejidos	8
2.6.2 Respuesta inmune innata	8
2.6.3 Respuesta inmune mucosal	9
2.6.4 Respuesta inmune adaptativa	10
2.6.5 Factores que afectan a la respuesta inmune	11
2.6.6 Respuesta inmune inducida por el VNPI	11
2.7. Diagnóstico	12
2.8 Prevención y control	13
2.9 Vacunación	14
3. Justificación	18
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	19
5.1 Objetivos general	19
5.2 Objetivos específicos	19
6. Materiales y métodos	20

6.1	Primera etapa: desarrollo y evaluación <i>in vivo</i> de una vacuna experimental inactivada contra el VNPI en truchas arcoíris inmunizadas	20
6.1.1	Obtención del virus	20
6.1.2	Inactivación del virus	20
6.1.3	Adyuvante	20
6.1.4	Peces	21
6.1.5	Diseño experimental	21
6.1.6	Desafío de VNPI por inmersión	22
6.1.7	Extracción de ARN y síntesis de ADNc	23
6.1.8	Evaluación de la respuesta inmune mediante qPCR	23
6.1.9	Detección de anticuerpos neutralizantes	24
6.1.10	Análisis estadístico	25
6.2	Segunda etapa: evaluación de una PCR anidada para el diagnóstico del VNPI	26
6.2.1	Línea celular	26
6.2.2	Obtención de virus	26
6.2.3	Truchas	26
6.2.4	Infección experimental con el VNPI	27
6.2.5	Extracción de ARN y síntesis de ADNc	27
6.2.6	Iniciadores	28
6.2.7	PCR y PCRa	28
6.2.8	Análisis estadístico	29
7.	Resultados	30
7.1	Primera etapa: desarrollo y evaluación <i>in vivo</i> de una vacuna experimental inactivada contra el VNPI en truchas arcoíris inmunizadas	30
7.1.1	Transcripción de los genes de la respuesta inmune adaptativa después de la vacunación	30
7.1.2	Transcripción de los genes IFN- $\gamma$ y Mx después de la vacunación	33

7.1.3	Transcripción de los genes de la respuesta inmune adaptativa después del desafío	33
7.1.4	Transcripción de IFN- $\gamma$ y Mx después del desafío	38
7.1.5	Detección de anticuerpos contra el VNPI	39
7.1.6	Protección conferida después del desafío	40
8.	Segunda etapa: evaluación de una PCR anidada para el diagnóstico del VNPI	41
9.	Discusión	43
9.1	Primera etapa: desarrollo y evaluación <i>in vivo</i> de una vacuna experimental inactivada contra el VNPI en truchas arcoíris inmunizadas	43
9.2	Segunda etapa: evaluación de una PCR anidada para el diagnóstico del VNPI	46
10.	Conclusiones	50
11.	Lista de Cuadros	51
12.	Lista de Figuras	52
13.	Abreviaturas y siglas	54
14.	Anexos	56
15.	Referencias	64

## 1. ANTECEDENTES

La acuacultura nacional registra un crecimiento sostenido y se ha convertido en una actividad altamente productiva y competitiva en la producción de especies comerciales como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), cuya pesquería produjo, en 2017, 14 mil 197 toneladas de peso vivo, con un valor estimado de 830 mil 738 pesos. La tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años es de 8.39% (CONAPESCA, 2017).

El cultivo de trucha arcoíris en México es una de las actividades pesqueras más importantes del país, al impactar en la economía y desarrollo de las comunidades rurales. La trucha por su volumen de producción se encuentra en el lugar 18 de la producción pesquera en México; sin embargo, por su valor lo encontramos en el lugar 8. De acuerdo con el reporte estadístico de la CONAPESCA las principales entidades productoras de trucha son Estado de México, Puebla, Tamaulipas, Veracruz, Michoacán, Hidalgo, Durango, Chihuahua, Nayarit, Baja California, Campeche, Chiapas, Coahuila, Colima, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Tabasco y Tlaxcala (CONAPESCA, 2017).

Con el constante crecimiento de la industria acuícola se ha generado mayor incidencia y propagación de enfermedades, principalmente aquellas producidas por virus, debido a su rápida dispersión y alto grado de afectación. La necrosis pancreática infecciosa (NPI) afecta principalmente a peces de la familia de los salmónidos (Rodríguez *et al.* 2003; Salgado-Miranda 2006; Dhar *et al.* 2017). Esta enfermedad provoca pérdidas económicas debido a que cuando se presentan brotes debe impedirse la movilización de los animales y realizarse su eutanasia.

En México, esta enfermedad fue identificada por primera vez en el año 2000 en crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) importadas de los Estados Unidos de América (EUA) (Ortega *et al.* 2002). Actualmente, se distribuye principalmente en la región norte y centro de México) y es considerada de notificación inmediata obligatoria a las dependencias oficiales de sanidad animal del país (Ortega *et al.* 2007; SAGARPA, 2016). Sin embargo, la información sobre prevalencia y la diseminación del virus en México aún son escasos.

## 2. INTRODUCCIÓN

La NPI afecta a varias especies de peces de agua dulce, marinos, moluscos y crustáceos (Rodríguez *et al.* 2003; Salgado-Miranda, 2006). El agente etiológico de esta enfermedad es un virus, el cual ha sido el único identificado y que afecta a la truticultura nacional, sin embargo es necesario reforzar estrategias de prevención considerando la fuerte dependencia de la importación de ova (Ortega *et al.* 2015).

### 2.1 Características del VNPI

El virus de la NPI (VNPI) pertenece al género *Aquabirnavirus* de la familia *Birnaviridae* (Dobos y Roberts, 1983; King *et al.* 2012; Dhar *et al.* 2017). Es un virus no envuelto, con una cápside icosaédrica con un diámetro aproximado de 60 nm (Delmas, 2015). Su genoma representa el 8.7% de la masa total del virión y está compuesto por dos segmentos de ácido ribonucleico (ARN) de doble hebra (ds, por sus siglas en inglés: *double strand*) (Figura 1).

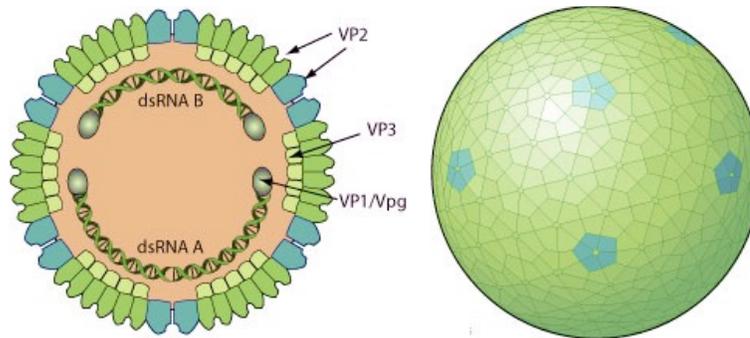


Figura 1. Esquema del virus de la necrosis pancreática infecciosa y las proteínas que lo conforman (<http://viralzone.expasy.org>, 2015).

El VNPI realiza una transcripción semiconservativa asimétrica sintetizando un ARN de cadena simple. El segmento A posee una longitud de 2962 a 2104 nucleótidos (nt) y un peso de  $2.5 \times 10^6$  Daltons (Da). Contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés: *Open Reading Frame*). El ORF mayor es monocistrónico y codifica para la poliproteína precursora NH<sub>2</sub>-pVP2-VP4-VP3- COOH (106 kDa), la cual es co-traduccionalmente escindida por la proteína viral VP4 de 29 kDa para generar tres proteínas: pVP2 (proteína precursora de la VP2), VP4 y VP3 (Dobos, 1995; Rodríguez *et al.* 2003; Villanueva *et al.* 2004) (Figura 2).

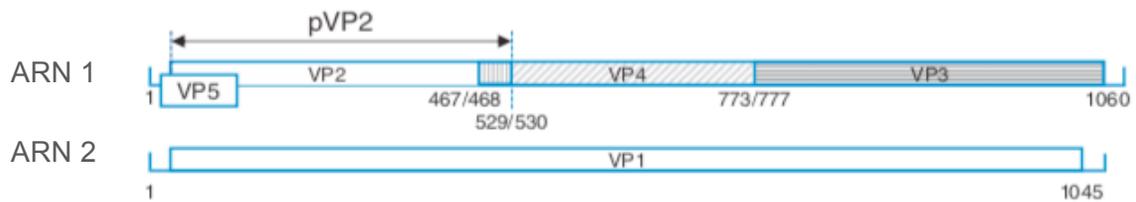


Figura 2. Organización del genoma del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI). Los números al final de cada segmento indican el número de aminoácidos. pVP2 es la proteína precursora de la proteína viral VP2 del VNPI. ARN 1 corresponde al segmento A y ARN 2 corresponde al segmento B de la cadena de ARN de doble hebra (Dhar *et al.* 2017).

La maduración y ensamblaje se lleva a cabo en el citoplasma. La pVP2 de 62 kDa es escindida durante la maduración viral para obtener la proteína VP2 de 54 kDa, que es el principal componente de la cápside viral y estimula la producción de anticuerpos neutralizantes de tipo específico (Rodríguez *et al.* 2003; Villanueva *et al.* 2004). Es considerada la principal determinante de virulencia del VNPI (Santi *et al.* 2004; Shivappa *et al.* 2004). La VP3 de 31 kDa es la proteína interna de la cápside, su participación es fundamental en el ensamblaje viral y se asocia al genoma para formar los complejos de ribonucleoproteína. El ORF menor codifica para la proteína no estructural VP5 que ha sido detectada en cultivos celulares infectados y se sintetiza en bajas concentraciones en la fase inicial de la replicación viral (Villanueva *et al.* 2004).

El segmento B posee un peso de  $2.3 \times 10^6$  Da, un tamaño de 2731 a 2784 nt y un ORF que codifica la proteína VP1 que corresponde a la ARN polimerasa dependiente del ARN viral. Este polipéptido está presente en el virión como un polipéptido libre y como una proteína de ligada al genoma (VPg) (Dobos, 1995; Rodríguez *et al.* 2003; Villanueva *et al.* 2004).

La replicación viral se lleva a cabo en el citoplasma de la célula hospedadora e inicia con la unión de la proteína VP2 a polipéptidos 100 – 200 kDa de la membrana citoplasmática de las células susceptibles (Kuznar *et al.* 1995). Posterior a la adsorción, los virus entran a la célula por endocitosis (Couve *et al.* 1992). Después, el virus tarda aproximadamente 20 minutos en ingresar a la célula para internarse en compartimientos vesiculares endosomales periféricos de pH ácido y posteriormente el genoma viral es liberado al citosol. La multiplicación viral del VNPI se puede llevar a cabo de forma rutinaria *in vitro* en varias líneas celulares establecidas a una temperatura desde 15 °C a 24 °C. Aproximadamente, entre las 16 y 20 horas postinfección (hpi) ocurre un ciclo simple de

multiplicación, manifestando un característico efecto citopático (CPE), asociado a la pérdida de la integridad de células y del tejido, que termina en destrucción celular y con ello la liberación de la nueva progenie de virus (Ortega y Enríquez, 2007).

Durante un ciclo simple de infección del VNPI es posible identificar dos tipos de partículas virales diferentes, ambas tienen la típica forma icosaédrica, los dos segmentos de ARN y todos los polipéptidos de las proteínas estructurales. La partícula primaria o provirión corresponde a las formas precursoras inmaduras e incompletamente ensambladas del virus. Esta partícula, carente de capacidad infectiva, es detectada simultáneamente con el ARN de doble hebra, indicando que el ensamble del virus se inicia tan pronto como la replicación del ARN comienza en la célula. Luego de 12 hpi el provirión madura en virión. Este último se compone de una cápside de proteínas maduras y esta partícula está provista de capacidad infectiva (Villanueva *et al.* 2004).

El VNPI se distingue por tener una amplia variabilidad antigénica y genotípica. Actualmente hay tres especies identificadas del género *Aquabirnavirus*: el virus de la necrosis pancreática infecciosa; el virus Tellina y el virus de la ascitis de cola amarilla (Delmas, 2015). Existe una relación genética muy estrecha entre las especies del género *Aquabirnavirus*, pero muestran una considerable diversidad antigénica. La mayoría de las cepas pertenecen al serogrupo A, en este se han descrito nueve serotipos con reactividad cruzada. Las secuencias de aminoácidos de la proteína de la cápside (VP2) se correlacionan con la clasificación serológica y con la distribución geográfica (Hill y Way, 1995). Con base a las similitudes de secuencia de nucleótidos, se pueden definir siete genogrupos (I-VII) (Blake *et al.* 2001a; Blake *et al.* 2001b; Nishizawa *et al.* 2005). El primer aislamiento mexicano fue clasificado como serotipo A1 basado en la secuencia parcial del gen de la VP2 (Ortega *et al.* 2002) y agrupado en el genogrupo I (Nishizawa *et al.* 2005). En el 2005 y 2006 se obtuvieron ocho aislados mexicanos y su análisis molecular indicó que pertenecen al genogrupo I y se encuentran estrechamente relacionados con un aislado mexicano realizado en el 2013 (GenBank accession number JX174178), así como por la cepa 114 y la cepa Buhl (AY026348 y AF343573) de los Estados Unidos de América (Salgado-Miranda *et al.* 2014).

Las diferentes cepas que componen cada serotipo en la clasificación serológica del VNPI también presentan diferencias en la virulencia, lo que a su vez influye en el curso y pronóstico de la enfermedad. Existen cepas altamente virulentas capaces de generar un

90% de mortalidad y cepas avirulentas, las cuales no producen signología clínica. Los serotipos A1 y A2 causan más mortalidad en truchas arcoíris que el serotipo A3 (Jørgensen y Kehlet, 1971) y dentro de un mismo serotipo hay diversos grados de virulencia (Santi *et al.* 2004).

La variabilidad genética y fenotípica que pueden presentar las proteínas estructurales determina la patogenicidad para la especie de hospedero, el tropismo celular y su capacidad de evasión de los principales mecanismos de defensa del sistema inmune del hospedero. Las proteínas VP2 y VP5 codificadas por el segmento A se consideran los principales factores de virulencia del VNPI (Ortega y Enríquez, 2007). Además, los cambios presentes en la VP2 se asocian con atenuación viral (Santi *et al.* 2004).

Las cepas virulentas codifican una VP5 de 12 kDa y en la proteína VP2 se encuentran residuos de aminoácidos de Treonina (Thr), Alanina (Ala), Thr o Ala, y Tirosina (Tyr) o Histidina (His) en las posiciones 217, 221, 247 y 500, respectivamente (Santi *et al.* 2004). Song *et al.* (2005) encontraron que los residuos 217 y 221 de VP2 son los determinantes de virulencia en la cepa Spajarup (Sp) (serotipo A2), y sus combinaciones entre cepas: Thr en 217 y Ala en 221 fueron muy virulentos; las cepas que codifican Prolina (Pro) en 217 y Ala en 221 fueron medianamente virulentas, y las cepas que codifican Thr en residuo 221 e indistinto 217 resultaron avirulentas, y descartando también al residuo 247 con Thr o Ala como factor importante en la virulencia. Por otro lado, cepas escocesas con residuos Pro 217 y Ala 221 en VP2 presentaron virulencia similar a las cepas con Thr en 217 y Ala en 221 (Smail *et al.* 2006), demostrando que en las infecciones *in vivo* los factores asociados al huésped, origen y condiciones ambientales podrían influir en la virulencia (Santi *et al.* 2004). Espinoza *et al.* (2000), encontraron que la VP2 tiene una escasa O-glicosilación en al menos tres sitios del tercio central de su región hipervariable y esta se lleva a cabo libremente en el citoplasma y no en el retículo endoplásmico o el complejo de Golgi.

Adicionalmente, al comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína VP2 de diferentes serotipos se observó que los aminoácidos presentes a los extremos son iguales y conservados a diferencia de aquellos presentes en la región central, los cuales son variables y difieren entre cada serotipo (Coulibaly *et al.* 2010).

## 2.2. Distribución del VNPI

La presencia de la NPI ha sido reportada en varios países, por lo que es reconocida como la enfermedad de mayor impacto en el cultivo de salmónidos y se considera de distribución mundial (Dhar *et al.* 2017).

En México se reportó que tiene una diseminación del 62.5% en las principales entidades nacionales productoras de trucha (Salgado-Miranda *et al.* 2009). El laboratorio de Sanidad Acuícola de la FMVZ-UAEM en un estudio retrospectivo del año 2000 al 2012, analizó 2126 muestras y sugieren que el VNPI es el único virus que actualmente se encuentra circulante en las unidades de producción mexicanas de trucha arcoíris, puesto que no ha sido identificado ningún otro, sin embargo, es necesario reforzar estrategias de prevención considerando la fuerte dependencia de la importación de ova (Ortega *et al.* 2015).

## 2.3 Epizootiología

El VNPI ha sido identificado en diversas familias de peces como *Anguillidae*, *Atherinidae*, *Carangidae*, *Channidae*, *Cichlidae*, *Clupeidae*, *Cobitidae*, *Cyprinidae*, entre otras, sin embargo, tiene un considerable impacto económico en los peces de la familia *Salmonidae* los cuales son especialmente susceptibles. Las especies más susceptibles al VNPI son la trucha de fontana (*Salvelinus fontinalis*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). De peces no salmónidos también ha sido posible el aislamiento de VNPI, algunos importantes en la acuicultura marina, son: rodaballos (*Scophthalmus maximus*), lenguados (*Solea senegalensis*) y fletán o halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Salgado-Miranda, 2006).

## 2.4 Transmisión

Los peces infectados pueden transmitir el virus de manera horizontal y vertical (Munro y Midtlyng, 2011). Estos peces eliminan el virus a través de la orina y heces (Billi y Wolf, 1969; Roberts y Pearson, 2005). En los peces reproductores, se ha demostrado que el virus se transmite de manera vertical mediante la adsorción viral a la superficie de los espermatozoides (Mulcahy y Pascho, 1984) o puede estar presente en el líquido folicular, pero no en el interior de las ovas aún no fertilizadas (Wolf *et al.* 1963).

También, algunas especies de moluscos se consideran reservorios del VNPI, como el mejillón azul (*Mytilus galloprovincialis*), ostión japonés (*Crassostrea gigas*) y bígamos (*Littorina littorea*), entre otros. El virus también ha sido aislado a partir de sedimento (Cutrin *et al.* 2000). Las aves silvestres piscívoras son consideradas vectores del virus y puede ser aislado a partir de heces (McAllister y Owens, 1992).

## **2.5 Signos clínicos**

En alevines y crías de primera alimentación causa una elevada mortalidad, y es persistente en peces mayores de cinco o seis meses. Los principales signos ante-mortem son: anorexia, nado de forma irregular (en sacacorchos con lapsos de ataxia), obscurecimiento de la piel (hiperpigmentación), ojos protuberantes (exoftalmia) de manera moderada y distensión abdominal. Los peces afectados también pueden mostrarse delgados, branquias pálidas, hemorragias en la zona ventral además de las aletas y con heces “colgantes” de color blanquecino (Wolf, 1988).

Los principales hallazgos post-mortem en las crías son ausencia de alimento en tracto digestivo y palidez en bazo, corazón, hígado y riñón. Con frecuencia se puede observar líquido ascítico en cavidad abdominal y moco lechoso en estómago e intestino anterior. A nivel histopatológico, las lesiones halladas incluyen focos de necrosis coagulativa en páncreas, riñón e intestino. Los núcleos de las células acinares se observan picnóticos y de tamaños variables. En muchos casos no se aprecia infiltración de células inflamatorias. También se observa enteritis aguda, caracterizada por necrosis y pérdida del epitelio. En el lumen intestinal, se encuentra exudado catarral blanquecino, frecuentemente asociado con esta enfermedad. El tejido renal puede presentar cambios degenerativos (McKnight y Roberts, 1976).

## **2.6 Respuesta inmune**

En salmónidos la respuesta inmune es muy variable y responden a las infecciones virales a través de una respuesta de tipo inespecífica y específica.

### **2.6.1 Órganos y tejidos**

Una de las principales diferencias es que los peces no tienen médula ósea y es el riñón anterior o pronefros, el órgano que adquiere esa función hematopoyética principal, además del timo (para producción de linfocitos T). En ellos, los linfocitos T y B maduran y adquieren los receptores específicos de antígeno. Los peces tampoco tienen nódulos linfáticos por lo que el bazo es el órgano secundario principal, junto con el riñón que también es capaz de participar en la respuesta inmunitaria y, por lo tanto, también se considera secundario. En los mamíferos el MALT incluye linfocitos T y B organizados en estructuras foliculares. Sin embargo, en los peces a pesar de que se ha descrito la presencia de linfocitos B y T en prácticamente todas las mucosas (piel, branquias, intestino, fosas nasales), la falta de estructuras organizadas hace que algunos autores duden del hecho de que este tejido inmunitario asociado pueda ser considerado un verdadero tejido linfoide asociado a mucosas (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) equivalente al de mamíferos (Castro y Tafalla, 2017).

### **2.6.2 Respuesta inmune innata**

La respuesta inmune innata o inespecífica es el mecanismo de defensa más importante en organismos acuáticos, además de que es rápida y es la primera respuesta ante cualquier antígeno (Watts *et al.* 2001; Fletcher y Secombes, 2010). Incluye barreras físicas como el moco, la piel, las branquias y las mucosas, es aquí donde encontramos una variedad de leucocitos (monocitos/macrófagos, granulocitos y células citotóxicas no específicas) y sustancias como lisozima, factores del complemento, interferón, proteína C reactiva, transferrina, antiproteasas, lectinas, eicosanoides, etc (Fernández *et al.* 2002; Rubio-Godoy 2010). En este mecanismo de defensa inespecífico, los macrófagos son el componente celular principal. Los macrófagos son presentadores primarios de antígenos en la respuesta inmune adquirida y son los principales fagocitos de los peces. Secretan citocinas proinflamatorias, aparecen en la inflamación, en diferentes enfermedades y juegan un papel central en la patogénesis de algunas entidades particulares como la estreptococosis y la aeromoniasis entre otras, en las cuales son usados por los patógenos como vehículo para llegar a múltiples órganos y evitar ser destruidos (Penagos *et al.* 2009; Castro y Tafalla, 2017). Los leucocitos granulares, denominados al igual que en mamíferos: neutrófilos (heterófilos), eosinófilos (acidófilos) y basófilos. Los neutrófilos

tienen funciones fagocíticas, quimiotácticas y bactericidas, actividad de mieloperoxidasa, explosión respiratoria y poseen la capacidad de degranulación de gránulos primarios. Las funciones fagocíticas y bactericidas de los neutrófilos son reducidas en algunas especies y su participación en procesos agudos es muy inferior a la de mamíferos. Las células NCC tienen propiedades muy similares a las células de mamíferos natural killer (NK) se han observado en los peces, y estas llamadas células citotóxicas naturales (NCC). Se asemejan morfológicamente a los linfocitos o monocitos agranular, y expresan la perforina y granulicina. Están presentes en los órganos linfoides, intestino, cavidad peritoneal y sangre. Causa lesiones apoptóticas y necróticas en ciertos tipos de células diana incluyendo células de cultivo de tejidos, sobre todo cuando están infectadas con virus o ciertos protozoarios (Watts *et al.* 2001; Penagos *et al.* 2009; Castro y Tafalla, 2017)

Los centros melanomacrófagos, son una característica particular de los peces. Se localizan principalmente en el bazo, pero también se pueden encontrar en riñón, hígado, gónadas y aún en timo, lo cuales son semejantes a los centros germinales en riñón y bazo. Están constituidos por macrófagos, células reticulares, linfocitos y células plasmáticas. En estos también se producen y almacenan pigmentos como la lipofuchina, melanina y hemosiderina, entre otros. Ante un estímulo viral o bacteriano aumentan en número, sus macrófagos atrapan grandes cantidades de antígeno y aumenta la producción de pigmentos (Ferguson 2006; Penagos *et al.* 2009).

Las células Rodlet son secretoras epiteliales, presentes en grandes cantidades en piel, branquias, intestino, ductos biliares y túbulos renales, y en menor cantidad o ausentes en sangre, tejido conectivo y cerebro. Migran al epitelio y aumentan de número en procesos infecciosos o irritantes. Los peces teleosteos son los únicos vertebrados que poseen estas células (Ferguson 2006; Schmachtenberg 2007).

### **2.6.3 Respuesta inmune mucosal**

En peces no existen ganglios linfáticos, placas de Peyer, ni tejidos linfoides asociados a mucosas ampliamente caracterizados como en mamíferos y aves, hay evidencias claras de un sistema inmune innato de mucosas desde los primeros etapas de vida de los peces. El sistema inmune de mucosas en los peces incluye otra serie de propiedades defensivas como la activación y aumento en número y tamaño de las células de moco branquial e intestinal en respuesta casi siempre a infecciones bacterianas o irritantes presentes en el

agua, la producción y eliminación de anticuerpos en la bilis, la migración de células productoras de anticuerpos a las mucosas branquial e intestinal, la existencia de poblaciones bacterianas nativas asociadas al epitelio intestinal y pilórico que interfieren con la adhesión y posiblemente con el ingreso de bacterias patógenas, la capacidad de endocitosis de los enterocitos de partículas intactas, macromoléculas y de bacterias y sus antígenos, tanto de la flora nativa como de patógenos en todos los segmentos intestinales de larvas y adultos (Fernandez *et al.* 2002; Penagos *et al.* 2009; Rubio-Godoy 2010).

#### **2.6.4 Respuesta inmune adaptativa**

La respuesta inmune adaptativa o específica, se desarrolla en forma tardía y puede verse influenciada por diversos factores medio-ambientales, como la temperatura, edad, etapa de desarrollo del pez y alimentación (Watts *et al.* 2001). Es la segunda línea de defensa, el cual es específico e involucra el reconocimiento y unión de antígenos solubles circulantes a células B diferenciadas en células de memoria y células plasmáticas que responden para producir y secretar anticuerpos (inmunoglobulinas) antígeno-específicos (Fletcher y Secombes, 2010).

La inmunidad adquirida puede ser dividida en celular y humoral, y depende en gran medida de linfocitos T y B respectivamente. Aunque los peces no tienen médula ósea o nodos linfoides, el timo, el riñón y el bazo asumen este papel. En sangre, se encuentran tres clases o tipos de inmunoglobulinas, IgM, IgD e IgT (también llamada IgZ). Las células B que producen estos Ig's parecen ser mutuamente excluyentes, por lo menos para IgM e IgT, y por lo tanto, existen diferentes subconjuntos de células B en los peces. En los mamíferos IgM es un pentámero, mientras que en los teleósteos es un tetrámero, aunque en algunas especies puede ser monomérica e IgT es monomérica en sangre. La IgM se encuentra en mayor proporción y tiene actividad neutralizante. La inmunoglobulinas también se encuentran en las secreciones mucosas en piel, intestino, branquias y bilis. Los peces no poseen el equivalente de IgA como en los mamíferos, q la cual es resistente al ataque proteolítico por enzimas intestinales, reportes recientes muestran que en estos sitios se encuentran particularmente células productoras IgT (Fillatreau *et al.* 2013; Castro *et al.* 2014; Castro y Tafalla, 2017).

### **2.6.5 Factores que afectan a la respuesta inmune**

La temperatura es un factor determinante en la respuesta inmune en los peces. Se han denominado temperaturas no permisivas a las cuales el sistema inmune prácticamente no responde: se reportan 4 °C para los salmónidos y especies de agua fría, 14 °C para las carpas y en promedio 12-14 °C para las especies de aguas templadas o cálidas, con algunas excepciones como en el *catfish* en cuyo caso la temperatura no permisiva es 22 °C. El estado nutricional también afecta el sistema inmunológico de los peces; las deficiencias de vitamina C y E alteran el funcionamiento de los macrófagos y el complement. Los desbalances de ácidos grasos pueden alterar la fagocitosis fundamentalmente por modificación de las características de la membrana celular de leucocitos y disminuir la flora normal del intestino y a su vez la resistencia a la adhesión y translocación bacteriana (Penagos et al., 2009; Fletcher y Secombes, 2010).

### **2.6.6 Respuesta inmune inducida por el VNPI**

Generalmente la respuesta inmune innata es insuficiente para eliminar la infección por el VNPI, por lo que se desarrolla la enfermedad clínica con severidad variable o bien, puede establecerse el estado de portador (Jarp *et al.* 1996).

Durante una infección viral, la inducción del interferón (IFN) tipo I es la primera línea de defensa del sistema inmune, el cual tiene actividad antiviral e inmunomoduladora (Sun *et al.* 2009; Adedeji *et al.* 2012). La respuesta antiviral requiere de la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR's: por sus siglas en inglés, *Pattern Recognition Receptors*). Los receptores tipo Toll (TLR's: por sus siglas en inglés, *Toll-like receptors*) localizados en la membrana celular y endosomal reconocen ARN de cadena sencilla (ss, por sus siglas en inglés, *single strand*) y de doble cadena (Rauta *et al.* 2014), mientras las helicasas RIG-I (por sus siglas en inglés, *Retinoic acid-inducible gene 1*) y MDA5 (por sus siglas en inglés: *Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) reconocen ssARN and dsARN en el citosol (Kato *et al.* 2006). Además, dsARN también son reconocidos por PKR (por sus siglas en inglés: *Protein kinasa RNA-activated*), el cual es un PRR encontrado en vertebrados inferiores como los peces (Meurs *et al.* 1990).

Varios estudios han demostrado que durante el desafío con cepas altamente virulentas de VNPI se promueve una fuerte activación del sistema inmune (Ingerslev *et al.* 2009;

McBeath *et al.* 2007), así como la expresión de IFN tipo I y del gen Mx (Myxovirus resistance) inducible por el IFN (Skejesol *et al.* 2011). El IFN- $\gamma$  o tipo II es principalmente producido por los linfocitos NK, T CD4 y CD8 para favorecer una respuesta tipo Th1, dirigida hacia patógenos intracelulares (Castro y Tafalla, 2017). Esta citocina es funcionalmente similar a su homólogo de mamíferos (Zou *et al.* 2005). También ha demostrado aumentar significativamente el estallido respiratorio en macrófagos de trucha arcoíris, promover la presentación de antígenos, regular el tráfico de leucocitos e inducir proteínas antivirales como Mx (Zou *et al.* 2005, Wang *et al.* 2013, Castro y Tafalla, 2017).

Las células bajo influencia de IFN sintetizan proteínas de actividad GTPasa, conocidas como Mx, de las que se han descrito inhiben la multiplicación viral (Larsen *et al.* 2004). La infección con VNPI induce la expresión temprana de IFN- $\alpha$  and Mx. Munang'andu *et al.* (2013) encontraron que la cinética de expresión de estos genes está altamente correlacionado con el incremento del número de copias virales sugiriéndolos como biomarcadores del progreso de una infección.

El aislamiento y determinación del número de copias del VNPI se realiza preferentemente de riñón anterior y órganos linfoides como el bazo, lo que demuestra que es un virus leucotrópico (Renneseth *et al.* 2006; Skjesol *et al.* 2011). El virus tiene predilección a multiplicarse en células B, causando inmunodepresión por disminución de la expresión de inmunoglobulinas y lisis de células B (Novoa *et al.* 1996; Renneseth *et al.* 2006). Renneseth *et al.* (2006) observaron que el nivel de neutrófilos sanguíneos disminuye luego de un desafío experimental con el VNPI, razón por la cual los peces afectados se encuentren susceptibles a padecer infecciones secundarias.

## **2.7 Diagnóstico**

Se basa en el Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos, publicado por la Organización Mundial de Sanidad Animal con pruebas de aislamiento del virus en cultivo celular seguido de identificación inmunológica, mediante pruebas de inmunofluorescencia, seroneutralización y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA: por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) del virus (Agius *et al.* 1982; Dixon y Hill, 1983; Hill y Way, 1995; OIE, 2006).

El diagnóstico en casos clínicos se basa en la histología (McKnight y Roberts, 1976) y/o la demostración inmunológica del VNPI en tejidos infectados (Evensen y Rimstad, 1990),

confirmado por aislamiento e identificación inmunológica en cultivo de tejidos. Las líneas celulares empleadas para su aislamiento incluyen la RTG-2 (*Rainbow trout gonad*), CHSE-214 (*Chinook salmon embryo*) y BF-2 (*Blue gill fry*) (Wolf y Quimby, 1962; Kelly *et al.* 1978). A pesar de que el aislamiento es un método confiable, resulta costoso y su realización conlleva al menos tres semanas para confirmar un resultado como negativo (Amos, 1985; Ahne y Thomsen, 1986), ese tiempo es crítico en la diseminación del virus, debido a la rápida dispersión en corrientes lóxicas, lo que puede causar pérdidas económicas considerables (Salgado-Miranda, 2006; Milne *et al.* 2006).

La dependencia en la importación de las pruebas comerciales de ELISA, anticuerpos monoclonales, la autofluorescencia de los tejidos de los peces, un título viral alto, la dificultad para obtener muestras frescas de tejidos de peces y la reacción cruzada de los anticuerpos son las limitantes más comunes para el uso universal y rutinario de las técnicas anteriormente mencionadas (Sanz y Coll, 1992; LaPatra, 1997). Actualmente se han desarrollado varios métodos de detección por medio de la técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés: *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) y algunas de sus variantes (Way-Shyan *et al.* 1997; Pryde *et al.* 1993; Lopez-Lastra *et al.* 1994; Blake *et al.* 1995; Alonso *et al.* 1999; Rodríguez *et al.* 2001; Bowers *et al.* 2008; Barrera-Mejía *et al.* 2009; Tapia *et al.* 2015), las cuales disminuyen el tiempo para un diagnóstico oportuno, en comparación al aislamiento del virus en cultivo celular (Neria-Arriaga, 2016).

## **2.8 Prevención y control**

La prevención y control de la diseminación del virus se basa en estrategias de manejo sanitarias. La introducción de ovas y peces, así como el suministro de agua libre de VNPI, la cual constituye la principal estrategia en la prevención de la enfermedad (Morley, 1993). Sin embargo, el uso y suministro de agua libre de VNPI no es posible bajo las condiciones en como se lleva a cabo la truticultura en México. Es importante evitar la introducción o importación de ovas fertilizadas o peces provenientes de lotes de reproductores portadores de VNPI. Para el control de la NPI en granjas de reproductores, tanto los peces infectados como su progenie (ovas, alevines y crías) deben ser sacrificados (Salgado-Miranda, 2006).

Actualmente no existen tratamientos ni vacunas totalmente efectivas para esta enfermedad, por lo que las medidas de prevención y control son de gran importancia. Una vacuna ideal para VNPI debería inducir una protección duradera a una edad temprana, evitar la formación de portadores, ser eficaz contra un gran número de serotipos, y ser efectiva a través de cualquiera vía de administración (oral o inmersión) para ser utilizada en peces jóvenes. Como describe Martínez-Alonso y colaboradores para el desarrollo de una vacuna es importante entender los mecanismos de la respuesta inmune en los peces, tales como la respuesta innata y la adaptativa además de la que se induce por el VNPI (Martínez-Alonso *et al.* 2012; Munang'andu *et al.* 2013).

## **2.9 Vacunación**

Para reducir la ocurrencia de brotes, en las últimas dos décadas la investigación se ha focalizado en la búsqueda y desarrollo de diversas estrategias vacunales capaces de desarrollar una respuesta inmune de larga duración que permita reducir la mortalidad e infecciones persistentes al desafío con VNPI (Munang'andu *et al.* 2013; Munang'andu y Evensen, 2015).

Numerosas vacunas, de tipo inactivado y recombinante han sido desarrolladas y comercializadas para controlar esta enfermedad (Salgado-Miranda *et al.* 2013; Dadar *et al.* 2017). Las vacunas solo están disponibles para algunos países y ofrecen protección contra las cepas que circulan en ellos, que en su mayoría es la cepa Sp, serotipo A2 de VNPI y en México no existen vacunas contra los serotipos circulantes (Hill y Way, 1995).

La vacunación es la principal medida preventiva para controlar las enfermedades víricas. Su principal objetivo es estimular el sistema inmunitario, generando una respuesta de memoria que puede ser activada ante un segundo encuentro con un antígeno y posteriores encuentros. Una vacuna debe ser segura, económica y práctica, en términos de administración y estabilidad (Castro y Tafalla, 2017).

El conocimiento de la respuesta inmune de los peces es necesario para el diseño de vacunas que puedan proveer una inmunidad protectora. Al igual que en los mamíferos, los peces teleósteos han desarrollado un sistema inmune integrativo en el que la respuesta inmune innata y adaptativa interactúan y se regula entre ellos. Como se mencionó anteriormente, la respuesta inmune innata reconoce antígenos a través de los PRRs e

inicia el reclutamiento de células fagocíticas para procesar los antígenos capturados y presentarlos a las células T. Adicionalmente, las células de la respuesta inmune innata son responsables de la secreción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas de defensa que contribuyen para llevar a cabo una respuesta inmune adaptativa efectiva y generar memoria inmunológica. Por lo tanto, a través de una respuesta inmune innata adecuada, se inducirá una respuesta inmune adaptativa efectiva (Adedeji *et al.* 2012; Dixon y Becker, 2012).

La respuesta inmune adaptativa desencadena una respuesta celular y humoral. La inmunidad mediada por células T está orquestada por CD4+ (cooperadoras) y CD8+ (citotóxicas) y la inmunidad humoral refiere principalmente la producción de tres isotipos de inmunoglobulinas (Ig's) en los linfocitos B de salmónidos: IgM, IgD e IgT (Hikima *et al.* 2011; Munang'andu *et al.* 2014a).

Las vacunas inactivadas son las más comúnmente utilizadas en la acuicultura, incluso para el VNPI. Estas vacunas se producen a través de la replicación de los patógenos para obtener un título viral específico y posteriormente se le somete a agentes inactivantes (Munang'andu *et al.* 2013; Munang'andu *et al.* 2014b; Munang'andu *et al.* 2015). Los agentes químicos utilizados para inactivar antígenos han demostrado producir cambios en el genoma y la estructura de las proteínas, que en algunos casos afectan las propiedades estructurales de los virus. El formaldehído es el principal agente químico utilizado para las vacunas de VNPI comercialmente disponibles. Otros como el glutaraldehído, 2,2'-ditiodipiridina, b-propiolactona y la etilenimina binaria han sido probados experimentalmente para la inactivación del VNPI, sin embargo, se han mostrado algunos problemas, por ejemplo, partículas de virus inactivadas de forma incompleta, la destrucción de proteínas virales que podría provocar una falta de reconocimiento del antígeno por parte del sistema inmunitario del hospedador (Delrue *et al.* 2012; Salgado-Miranda *et al.* 2013).

Otro método de inactivación empleado es la irradiación gamma ( $\gamma$ ) como método físico, el cual genera fragmentación del material genético, tiene una alta penetración a través de materiales biológicos, genera un daño mínimo en la superficie de las proteínas antigénicas y no es necesario eliminar ningún residuo después del proceso de inactivación (Lowy *et al.* 2001; Furuya *et al.* 2010; Furuya, 2012). Por lo tanto, este método es utilizado para desactivar patógenos altamente infecciosos como el virus Ebola,

Marburg y Lassa (Elliot *et al.* 1982). Además, la irradiación gamma preserva los dominios funcionales de las proteínas virales, lo que facilita su captación y el acoplamiento de los péptidos virales a las moléculas el complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y por lo tanto, la expresión o presentación de estos complejos en la superficie de las células. Este método ha sido probado por Gamma Vaccines Pty (Manuka, ACT, Australia) (Seong 2015) y algunas vacunas experimentales irradiadas con rayos gamma han demostrado que es posible utilizar esta tecnología, por ejemplo, el virus de la influenza A ( $\gamma$ -Flu) (Alshafiri *et al.* 2009), los trofones de *Ichthyophthirius multifiliis* (Heidarieh *et al.* 2014) y el virus Semliki Forest ( $\gamma$ -SFV) (Babb *et al.* 2014).

Respecto a la producción de anticuerpos, las vacunas inactivadas han demostrado activar la expresión de genes CD4+ y células T-helper 2 (Th2) que se correlacionan con la producción de altos niveles de anticuerpos, consolidando la noción de que los antígenos exógenos estimulan respuestas humorales dirigidas por citocinas Th2 (Munang'andu *et al.* 2015).

Debido a que la mayoría de las vacunas comerciales se basan en antígenos inactivados, generalmente se formulan con adyuvantes oleosos para mejorar su eficacia. Los adyuvantes oleosos son reconocidos como facilitadores de "señal 1" en la clasificación de adyuvantes de acuerdo a su mecanismo de acción (Schijns, 2001; Tafalla *et al.* 2013; Tafalla *et al.* 2014). Un efecto de "depósito" del antígeno es la base de estos adyuvantes para producir una protección de larga duración (Tafalla *et al.* 2013).

La mayoría de las vacunas con adyuvantes oleosos se aplican por vía intraperitoneal. Esto atrae células presentadoras de antígeno al sitio de vacunación para la presentación del antígeno por el MHC-II, produciendo una respuesta de tipo humoral (Thim *et al.* 2014, Tafalla *et al.* 2014). Sin embargo, efectos adversos ocurren frecuentemente en el sitio de vacunación, el cual es responsable de la disminución del crecimiento de los peces vacunados y la pérdida de calidad de los productos debido a la formación de adherencias entre los órganos (Somerset *et al.* 2005, Tafalla *et al.* 2013). Por lo tanto, es importante proponer el uso de adyuvantes más potentes que permitan el uso un menor volumen y en consecuencia, reducir los efectos adversos (Thim *et al.* 2014, Tafalla *et al.* 2013).

Los adyuvantes inmunomoduladores, también conocidos como facilitadores de la "señal 2", confieren la co-estimulación que promueve la diferenciación y activación de las células

T y B, con el fin de liderar y generar una respuesta inmune adaptativa. Su composición puede asemejarse a patrones moleculares microbianos para ser reconocido como ligandos de receptores tipo toll (TLR), como los CpG, la flagelina, citocinas, entre otros (Tafalla *et al.* 2013).

Las porinas son proteínas transmembranales que constituyen la membrana externa de bacterias gram-negativas, mitocondrias y cloroplastos. *Salmonella typhi* (*S. typhi*) expresa principalmente dos porinas OmpC y OmpF constitutivamente; también, expresa las porinas OmpS1 y OmpS2 cuyos niveles de transcripción son más bajos. Varios estudios han demostrado su potencial uso como adyuvantes con la descripción de diversas características: son antígenos solubles, altamente inmunogénicos y capaces de inducir una respuesta inmune de memoria. Estudios realizados en ratones demostraron que una dosis de 10 µg de porinas purificadas fue capaz de inducir una protección del 90% frente a una dosis letal de *S. typhi* (Isibasi *et al.* 1988; Isibasi *et al.* 1994). También han demostrado ser seguras para su aplicación en humanos (Salazar-González *et al.* 2004). Estas proteínas producen una inducción adicional para estimular una respuesta inmune celular para antígenos no replicativos, como se demostró en la co-inmunización de porinas de *S. typhi* con una vacuna experimental inactivada contra el virus de la influenza H1N1 2009 (Pérez-Toledo *et al.* 2017).

Las porinas han demostrado estimular la producción de anticuerpos como de linfocitos T e inducir una respuesta inmune duradera (Secundino *et al.* 2006). Estas proteínas son reconocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's: por sus siglas en inglés, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) por el sistema inmune innato como ligandos de receptores TLR-2 y TLR-4 e inducir la producción de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-10. Asimismo, inducen migración y reclutamiento de diferentes poblaciones celulares al sitio de inoculación, como células dendríticas y plasmáticas, así como la activación de células dendríticas, macrófagos y la expresión de moléculas co-estimuladoras, como CD40 y CD80 (Moreno-Eutimio *et al.* 2013). Todas estas características indican que las porinas podrían ser un buen candidato como adyuvante experimental para peces. Además, no requieren una cadena frío para su almacenamiento y transporte.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Esta propuesta de investigación es la primera en su tipo en México. El constante crecimiento de la industria trutícola nacional, la dispersión del virus de la necrosis pancreática infecciosa y la ausencia de una vacuna eficaz para la prevención de esta enfermedad, son determinantes para desarrollar vacunas a partir de aislados mexicanos, ya que dicho agente llega a provocar mortalidades de hasta el 100% de la población en un lote susceptible, motivo por el cual los organismos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) deben estar protegidos.

Por otro lado, cabe destacar que existe un riesgo potencial de la introducción y diseminación de otras cepas de VNPI a nuestro país, lo que puede deberse a la importación de huevo oculado de los EUA principalmente, además de algunos países de Europa, África y Sudamérica que también son proveedores. Por esta razón, en estudio independiente se propone evaluar el uso de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCRa) para la identificación eficiente y rápida del VNPI a partir de muestras de tejidos infectados. Esto permitirá disminuir el tiempo de diagnóstico e implementar diversas estrategias para el control del VNPI y prevenir su exposición en las unidades de producción trutícolas.

#### **4. HIPÓTESIS**

- 4.1.1 La vacuna inactivada contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa adicionada con porinas de *S. typhi* como adyuvante, será capaz de inducir una respuesta inmune para proteger a las crías de truchas arcoíris inmunizadas frente a un desafío con un virus homólogo.
- 4.1.2 La PCRa mostrará una sensibilidad mayor a la RT-PCR para el diagnóstico del VNPI a partir de muestras de tejidos de truchas infectadas.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

- 5.1.1 Evaluar la efectividad de una vacuna inactivada por radiación gamma contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa mediante su administración por vía intraperitoneal a crías de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).
- 5.1.2 Evaluar el uso de una PCR anidada para la detección del VNPI en tejidos de truchas infectadas experimentalmente y de truchas clínicamente sanas cultivadas en unidades de producción acuícola.

##### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 5.2.1 Replicar la cepa MEX3-CSM-05 para el desarrollo de una vacuna inactivada por radiación gamma contra el VNPI.
- 5.2.2 Evaluar la respuesta inmune celular y humoral de truchas inmunizadas, mediante una cinética transcripcional de varios genes a diferentes días post-vacunación y post-desafío, así como la detección de anticuerpos mediante una ELISA estandarizada.
- 5.2.3 Evaluar la protección conferida al desafío con un análisis de sobrevivencia.
- 5.2.4 Calcular la sensibilidad y especificidad de la prueba de RT-PCR y PCRa en truchas infectadas experimentalmente.
- 5.2.5 Evaluar la RT-PCR y PCRa en truchas clínicamente sanas cultivadas en unidades de producción acuícola para el diagnóstico de VNPI.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Primera etapa: Desarrollo y evaluación *in vivo* de una vacuna experimental inactivada contra el VNPI en truchas arcoíris inmunizadas.**

#### **6.1.1 Obtención del Virus**

La línea celular BF-2 proveniente de fibroblastos de perca sol *Lepomis macrochirus* (ATCC-CCL 91), se utilizó para la propagación de la cepa MEX3-CSM-05 del VNPI, proveniente del Estado de México (Salgado-Miranda *et al.*, 2014). Las células crecieron a 20 °C con medio Leibovitz (L-15) (In vitro, México) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Biowest, Mexico) 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0.25 µg/ml de anfotericina B (In vitro, México). Estos cultivos fueron incubados a 15 °C durante 72 horas. Posteriormente, las botellas de cultivo se congelaron a -20 °C y descongelaron en dos ocasiones. El sobrenadante se recolectó y centrifugó a 1200 g durante 15 min a 4 °C (OIE, 2006). El título viral se determinó por el método de Reed and Muench y se calculó la dosis infectiva en cultivo celular (DICC) para preparar la dosis vacunal ( $1 \times 10^{7.2}$  DICC/ml) así como la dosis para el desafío ( $5 \times 10^6$  DICC/ml).

#### **6.1.2 Inactivación del virus**

El sobrenadante de virus con un título de  $1 \times 10^{8.2}$  DICC/ml, fue separado en lotes e inactivado por exposición a radiación gamma ( $\gamma$ ) de la fuente radioactiva Cobalto-60 ( $^{60}\text{Co}$ ), en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ, México) y posteriormente almacenado a 4 °C. El sobrenadante de VNPI inactivado se inoculó en células BF-2 para confirmar la inactivación completa.

#### **6.1.3 Adyuvante**

Las porinas fueron purificadas de la cepa *S. typhi* ATCC 9993, descrito previamente y donadas por el Laboratorio de inmunoquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI (Salazar-Gonzalez *et al.* 2004; Cervantes-Barragán *et al.* 2009). Se utilizó una dosis de 10 µg de las proteínas purificadas, de acuerdo con las dosis probadas en ratones y humanos (Secundino *et al.*, 2006; Moreno-Eutimio *et al.*, 2013). Esta concentración de

proteínas fue diluida con la vacuna inactivada ( $1 \times 10^{7.2}$  DICC/ml) y aplicada a cada trucha. Asimismo, esta dilución se hizo con medio mínimo esencial (MEM; In Vitro, México), para la evaluación del adyuvante solo.

#### **6.1.4 Peces**

Se adquirieron truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) libres de VNPI del Centro Acuícola El Zarco de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA), con una talla aproximada de 6 cm. A pesar de que los organismos se encontraban clínicamente sanos, se determinó su estatus sanitario previo al inicio del experimento mediante el análisis de una muestra con 10 organismos vivos (WINEPI,  $N=130$   $P_{min}=19.8\%$ ) para evaluar la presencia de bacterias, parásitos y virus en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Universidad Autónoma del Estado de México, cuyo resultado fue negativo.

El resto de lote de truchas se trasladaron en bolsas de calibre 13 al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad – INIFAP (SADER, México) y fueron mantenidas en adaptación por una semana, en estanques de polipropileno con 60 litros de agua en circulación, a una temperatura ambiente de entre 14-16 °C y alimentadas con una dieta comercial con el 3% de su biomasa total.

Todos los procedimientos se realizaron bajo los estándares éticos del Comité de Bioética para el cuidado y uso razonable de animales de experimentación en proyectos de investigación (No. de autorización. CBCURAE-006, 15 de diciembre del 2015) en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, donde se realizaron todos los estudios experimentales, así como del Subcomité Institucional de Atención Experimental Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (No. de autorización. SICUAE: DC-2016/2-5).

#### **6.1.5 Diseño experimental**

Se formaron cuatro grupos con 70 truchas arcoíris (*O. mykiss*) cada uno (completamente aleatorizado) (Cuadro 1) para evaluar diferentes formulaciones. Previo a la inmunización, los organismos fueron anestesiados por inmersión con triclaína metanosulfonato (MS-222)

(Sigma-Aldrich, México) a una concentración de 50 µg/ml.

Cuadro 1. Formulaciones evaluadas en este estudio.

Grupo	Formulación	Abreviatura
1	Inmunizado con 0.06 ml de virus inactivado a una dosis de $1 \times 10^7$ DICC <sub>50</sub> ml <sup>-1</sup>	iVNPI
2	Inmunizado con 0.06 ml de virus inactivado, adicionado con 10 µg de porinas de <i>S. typhi</i>	iVNPI/porinas
3	Inoculado con 10 µg porinas de <i>S. typhi</i>	Porinas
4	Control, inoculado con 0.06 ml de MEM (In Vitro, México)	Control de virus

Cada formulación se aplicó por vía intraperitoneal, y posteriormente se realizó la eutanasia de cinco truchas de cada grupo bajo el siguiente esquema: a los días 2, 7, 15 y 22 post-vacunación (dpv) (De las Heras *et al.*, 2009; Ballesteros *et al.*, 2012; Martínez-Alonso *et al.*, 2012; Ballesteros *et al.* 2014; Munang'andu *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017). Se realizó una revacunación a los 15 días posteriores a la primera vacunación y el desafío a los 45 dpv. En cada día de muestreo se recolectaron los siguientes órganos: riñón, bazo, lavado del peritoneo con 1 ml de solución salina fosfatada (PBS por sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline*) y sacos pilóricos. Los órganos fueron almacenados en tubos de 1.5 ml a -70 °C para la extracción de ARN. La tasa de sobrevivencia post-desafío se evaluó a través del análisis de Kaplan-Meyer utilizando el software estadístico SPSS Versión 16.

#### 6.1.6 Desafío de VNPI por inmersión

Se desafiaron 45 truchas de cada grupo con la cepa mexicana MEX3-CSM-05 a una dosis de  $5 \times 10^6$  DICC<sub>50</sub>/ml por inmersión durante 4 horas en un estanque separado. Previo al desafío, se realizó la eutanasia de cinco truchas por grupo y posteriormente a los 2 y 7 días post-desafío (dpd) para recolectar los órganos previamente descritos, excepto el lavado de peritoneo. Se recolectaron algunos peces que presentaban Algunos de los peces eutanasiados fueron aquellos que presentaban signología avanzada sugerente de la enfermedad.

### 6.1.7 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Del macerado de cada órgano se tomaron 250  $\mu$ l para la extracción de ARN total con Trizol Reagent (Invitrogen, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue resuspendido en agua libre de DNAsas y RNAsas. La concentración y pureza del ARN obtenido se midió con un espectrofotómetro Nanodrop (EUA) a 260/280 nm. Posteriormente el 1  $\mu$ g de RNA fue tratado con DNAsa I (ThermoScientific) para eliminar el DNA genómico, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, de cada muestra se llevo a cabo la síntesis de cDNA con el kit MML-V Reverse Transcriptase, oligo (dT)<sub>12-18</sub> (0.5 mg/ml), siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, EUA). Las muestras de cDNA se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### 6.1.8 Evaluación de la respuesta inmune mediante qPCR

Se determinó la cuantificación relativa de diferentes genes del sistema inmune para la evaluación de cada formulación. Los genes analizados fueron Mx asociado a la respuesta inmune innata y los genes CD4, CD8 e IFN- $\gamma$  asociados a la respuesta inmune adaptativa de tipo celular y el gen de la cadena pesada de IgM asociado ala respuesta inmune humoral. Para ello, se utilizó el kit SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio Rad, EUA) y el termociclador de tiempo real RG-6000 (Rotor-Gene). La mezcla de reacción fue preparada con 5  $\mu$ l de 2x SYBR Green Supermix, 0.6  $\mu$ l de iniciadores (0.3 mM cada uno) y 2  $\mu$ l de cDNA, la secuencia de cada uno de los iniciadores que se utilizaron para la PCR se muestran en el Cuadro 2. La amplificación de DNA se realizó bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación (95 °C por 10 s, 60 °C por 10 s y 72 °C por 10 s) y se agregó un ciclo de disociación (95 °C por 10 s, 65 °C por 60 s y 97 °C por 1 s). Cada muestra fue corregida con la expresión del control endógeno EF1- $\alpha$  (factor de elongación 1 $\alpha$ ) y expresado como  $2^{-\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct$  se calculó mediante la diferencia del valor del ciclo umbral o Ct (por sus siglas en inglés *Cycle threshold*) de EF1- $\alpha$  del valor de Ct del gen de interés (Ingerslev *et al.*, 2006, Martínez-Alonso *et al.*, 2012).

Cuadro 2. Secuencias de iniciadores utilizados en este estudio.

Gen	Número de Acceso	Secuencia del iniciador (5'-3')
EF1- $\alpha$	AF498320	S: GATCCAGAAGGAGGTCACCA A: TTACGTTTCGACCTTCCATCC
CD4	AY973028	S: CCTGCTCATCCACAGCCTAT A: CTTCTCCTGGCTGTCTGACC
CD8	AF178053	S: AGTCGTGCAAAGTGGGAAAG A: GGTTGCAATGGCATAACAGTG
IgM	S63348	S: TGCGTGTTTGAGAACAAAGC A: GACGGCTCGATGATCGTAAT
IFN- $\gamma$	AJ616215	S: GAAGGCTCTGTCCGAGTTCA A: TGTGTGATTTGAGCCTCTGG
Mx	U30253, U47945, U47946	S: AGCTCAAACGCCTGATGAAG A: ACCCCACTGAAACACACCTG

S: Sentido  
A: Antisentido

### 6.1.9 Detección de anticuerpos neutralizantes

Se recolectaron muestras de sangre de la vena caudal de cinco truchas previo a la vacunación y al día 45 pv para la obtención de suero previo al desafío. La presencia de anticuerpos específicos contra el VNPI fue analizada mediante una prueba de ELISA estandarizada en el laboratorio de Biotecnología en Salud Animal, INIFAP, CENID-MA para la detección de IgM (anticuerpos) contra el VNPI (Verde-Rojo 2018). Para ello, se recubrieron placas de noventa y seis pocillos (NunClon®) con 10  $\mu$ g de antígeno purificado (del sobrenadante de replicación del VNPI) en amortiguador de carbonatos y bicarbonato de sodio con un pH de 9.6. La placa se incubó durante la noche a 4 °C y se lavó 4 veces con PBS con Tween 20 a un pH de 7.3. Posteriormente, los sitios de unión no específicos se bloquearon mediante la incubación en una solución de leche descremada al 3% en PBS-Tween 20 durante 1 hora a 37 °C. Después, la placa se lavó nuevamente 4 veces y se agregaron 100  $\mu$ l de las diluciones del suero problema (1:75) por duplicado y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Las diluciones del suero se eliminaron, se lavó la placa y se agregaron 100  $\mu$ l de anti-IgM de trucha arcoíris (Aquatic Diagnostics Ltd., Reino Unido) como anticuerpo primario a cada pocillo a una dilución 1:33 y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Luego de que se eliminó el anticuerpo primario y se lavó la placa, se agregó el anticuerpo secundario IgG anti-ratón marcado con peroxidasa a una dilución de 1:3000, incubado durante 60 minutos a 37 °C. A cada pocillo, se agregaron 50  $\mu$ l de la solución reveladora que se preparó con una solución

amortiguadora de citratos, 5 µg de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich, México) y 5 µl de peróxido de hidrógeno al 30%(Sigma-Aldrich, México); la placa se incubó durante 15 min a 37 °C protegida de la luz. La reacción se detuvo con la adición de 50 µl de solución de ácido sulfúrico 2N (JT Baker, México) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó en un espectrofotómetro Modelo 550 Microplate Reader (Bio-Rad, EE. UU.) a 450 nm.

#### **6.1.10 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el software estadístico SPSS versión 16 (SPSS Inc., EE. UU.), se realizaron las pruebas *t* de Student y el análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias de expresión relativa entre las formulaciones de vacunas y el grupo de control. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos.

## **6.2 Segunda etapa: Evaluación de una PCR anidada para el diagnóstico oportuno del VNPI**

### **6.2.1 Línea celular**

Se empleó la línea celular BF-2 de *Lepomis macrochirus* (ATCC® CCL 91) para la replicación de la cepa virulenta MEX2-CSM-05(25). La línea celular BF-2 se propagó a 20 °C, en medio Leibovitz (L-15) (In vitro, México) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB) (Biowest, Mexico) 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0.25 µg/ml de anfotericina B (In vitro, México).

### **6.2.2 Obtención del Virus**

La cepa virulenta MEX2-CSM-05 del VNPI notificada por Salgado-Miranda *et al.* (2014) se replicó en monoestratos confluentes de la línea celular BF-2 a 15 °C en medio Leibovitz (L-15) (In vitro, México) suplementado con suero fetal bovino al 2% (SFB) (Biowest, México). Una vez que se observó el efecto citopático (ECP), las botellas de cultivo se congelaron a -20 °C y descongelaron en dos ocasiones, posteriormente se recolectó el medio con las células en suspensión y se centrifugó a 1200 g por 15 min a 4 °C para la obtención del sobrenadante, a partir del cual se determinó el título viral (dosis infectiva en cultivo celular, DICC) mediante el método de Reed y Muench.

### **6.2.3 Truchas**

Para el estudio experimental, se adquirieron 100 crías de truchas arcoíris (*O. mykiss*) del Centro Acuícola El Zarco, de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA), con una talla promedio de 3 cm. Para evaluar la prueba, se adquirieron 26 truchas arcoíris adultas clínicamente sanas provenientes de unidades de producción comerciales en el Estado de México. Los organismos se mantuvieron en estanques de polipropileno con 60 litros de agua en re-circulación, con un fotoperiodo de 12 h de luz/ 12 h de oscuridad, una temperatura ambiental de entre 14-17 °C y alimentadas con producto comercial, suministrando el 3% de su biomasa total al día.

#### **6.2.4 Infección experimental con VNPI**

A partir de las 100 truchas arcoíris se inocularon 70 por vía intraperitoneal con  $1 \times 10^{5.8}$  DICC50/0.02 ml de la cepa virulenta MEX3-CSM-05. Los 30 organismos restantes no fueron inoculados y se mantuvieron en otro estanque como control negativo. Posterior a la inoculación, se realizó un examen clínico diariamente para identificar y seguir el curso de la enfermedad. Cuando los peces mostraron signos clínicos muy avanzados se les practicó la eutanasia por sobreexposición a la anestesia con triclaína metanosulfonato (MS-222) (Sigma-Aldrich, 886-86-2, EUA) a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  (de las Heras *et al.* 2009). Después de la eutanasia de los peces sacrificados se recolectaron los siguientes órganos: riñón, bazo, sacos pilóricos, hígado, intestino y branquias, los cuales fueron conservados a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Adicionalmente, y en las mismas fechas se realizó la eutanasia de dos truchas del estanque del control negativo cada día, para recolectar los órganos ya mencionados.

Los peces provenientes de las unidades de producción comerciales del Estado de México, a su llegada al laboratorio se realizó la eutanasia para la recolección de los órganos. Todos los procedimientos que involucraron el manejo de los animales se realizaron de acuerdo a los lineamientos establecidos por el Comité de Bioética para el cuidado y uso razonable de los animales de experimentación en proyectos de investigación (autorización no. CBCURAE-006) en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, donde se realizaron todos los procedimientos.

#### **6.2.5 Extracción de ARN y síntesis de ADNc**

Los órganos se maceraron y homogeneizaron con PBS estéril a un pH 7.2, de estos se tomaron 250  $\mu\text{l}$  para la extracción de ARN total con Trizol (Invitrogen, 15596018, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se resuspendió en agua libre de DNasas y RNasas. La síntesis de ADNc se realizó con el kit M-MLV Reverse Transcriptase, oligo (dT)12-18 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Invitrogen, EUA). El ARN se incubó con 1  $\mu\text{l}$  de oligo (dT)12-18 (0.5  $\mu\text{g ml}/\mu\text{l}$ ) and 1  $\mu\text{l}$  10 mM de dinucleósidos trifosfato (dNTP) durante 5 min a  $65\text{ }^\circ\text{C}$ . Después de la incubación, se agregaron 4  $\mu\text{l}$  de 5X first strand buffer, 1  $\mu\text{l}$  de 0.1 M dithiothreitol (DTT) and 1  $\mu\text{l}$  de MML-V Reverse Transcriptase, se mezcló y se incubó durante 1 h a  $50\text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente la reacción se inactivó a  $70\text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 min

y se almacenó a -20 °C, hasta su uso.

### 6.2.6 Iniciadores

Los iniciadores para la detección de un fragmento del gen VP2 del VNPI y del gen constitutivo en este estudio aparecen en el Cuadro 3 (Salgado, 2014; Ingerslev *et al.* 2006). Estos se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Cuernavaca, Morelos, México).

Cuadro 3. Secuencia de iniciadores para detectar el gen VP2 del VNPI y del gen constitutivo EF- $\alpha$ .

	Secuencia del iniciador (5'–3')	Posición	No. acceso GenBank	Tamaño (pb)	Ta (°C)
<b>RT-PCR</b>	S: CCGAATCAGGAAGTGGMMTTCTTG	137–160		689	60
	A: GTGACCACKGGGACGTCATTGTC	796–818			
<b>PCRa</b>	S: TCACCGTCCTGAATCTACCAAC	482-503		229	65
	A: GTTGTGGAGTTSACGATGTCSGC	688–710			
<b>EF-<math>\alpha</math></b>	S: GATCCAGAAGGAGGTCACCA	561-583	AF498320	150	55
	A: TTACGTTTCGACCTTCCATCC	694-713			

Ta: Temperatura de alineamiento.  
pb: pares de bases.

S: Sentido  
A: Antisentido

### 6.2.7 PCR y PCR anidada (PCRa)

Para la amplificación de todos los productos de PCR se utilizó el kit Dream Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, EUA) y las reacciones se prepararon con una concentración final de 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP's Mix, 0.2 mM de cada iniciador (sentido y antisentido) descritos anteriormente, 5  $\mu$ l de ADNc de cada muestra y 1.25 U de ADN polimerasa. La amplificación de la PCR se llevo a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95 °C durante 1 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineación a 60 °C durante 30 s, una extensión a 72 °C por 30 s; y se agregó una extensión final a 72 °C durante 7 min. Posteriormente, el templado que se utilizó para la PCRa fue el producto de la PCR anterior y su amplificación se realizó bajo las mismas condiciones antes mencionadas, excepto que la temperatura de alineación fue de 65 °C. Los productos de PCR y PCRa fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE (40 mM Tris, 20 mM Ácido acético, 2 mM EDTA), teñido con GelRed (Biotium, EUA) y visualizado en el fotodocumentador Quantity One 1-D Analysis System (Bio-Rad, EUA).

### 6.2.8 Análisis estadístico

La frecuencia de órganos positivos a la RT-PCR y PCRa de truchas infectadas experimentalmente se analizó mediante la construcción de tablas de contingencia y una prueba de Chi-cuadrada (Salgado, 2014). Adicionalmente, se evaluó la sensibilidad (Se) y especificidad (Es) tanto de la RT-PCR como la PCRa (Cuadro 4). La proporción de muestras positivas a la RT-PCR en cada órgano se compararon con la prueba estadística de múltiples proporciones tipo Tukey con transformación angular en donde se consideró una significancia estadística de  $p < 0.05$  (Zar, 2010).

Cuadro 4. Tabla de 2 x 2 en la que se explica la generación de las celdas con las que se realizan los cálculos de sensibilidad y especificidad.

		Estado de salud de los peces		
		Infectados	Sanos	
Prueba molecular	Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)	$Se = VP / (VP+FN)$
	Negativo	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)	$Es = VN / (FP+VN)$

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Primera etapa: Desarrollo y evaluación *in vivo* de una vacuna experimental inactivada contra el VNPI en truchas arcoíris inmunizadas.

#### 7.1.1 Transcripción de los genes de la respuesta inmune adaptativa después de la vacunación

Los niveles de transcripción de los marcadores CD4 y CD8 se analizaron para determinar el tipo de respuesta inmune producida por cada una de las formulaciones evaluadas: iVNPI, iVNPI/porinas y porinas solas, en comparación con los niveles observados por el grupo control (Figura 3). Los niveles de transcripción de CD4 en el bazo se observó sobreexpresión significativa en el grupo de la vacuna iVNPI/porinas de los 7 a los 15 dpv, y en el grupo de las porinas solas a los 15 dpv, sin embargo, no se detectaron diferencias entre estos dos grupos ( $p=0.136$ ). En el peritoneo, se observó una sobreexpresión significativa de CD4 en el grupo de porinas a los 7 y 15 dpv y los tres grupos: iVNPI, iVNPI/porinas y porinas solas a los 22 dpv, donde el grupo iVNPI fue significativamente menor en comparación con iVNPI/porinas ( $p=0.037$ ) y las porinas solas ( $p=0.028$ ), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos ( $p=0.66$ ). Las diferencias de transcripción detectadas en el riñón y los sacos pilóricos no fueron significativas (Datos no mostrados, Anexos). Asimismo, los niveles de transcripción de CD8 se mostraron muy bajos o casi nulos en los tres grupos y no mostraron ser significativos estadísticamente (Datos no mostrados, Anexos).

La expresión génica de la cadena pesada de IgM como marcador de la activación de células B se analizó en los mismos órganos descritos anteriormente (Figura 4). En el bazo, los grupos de iVNPI/porinas y porinas mostraron aumento estadísticamente significativo en sus niveles de transcripción a los 7 dpv, aunque no se detectaron diferencias significativas entre ellos ( $p=0.9$ ).

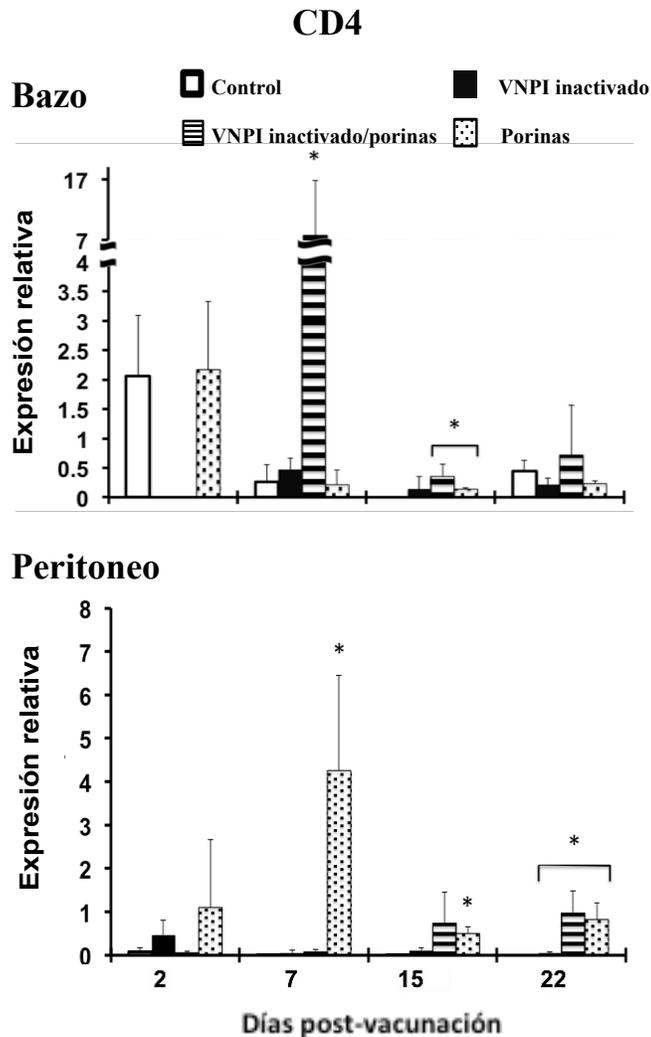


Figura 3. Expresión relativa del gen CD4 en el bazo y el peritoneo de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales. Las truchas fueron muestreadas a los 2, 7, 15 y 22 días post-vacunación (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).

En el riñón, el grupo iVNPI/porinas indujo expresión estadísticamente significativa del gen IgM de los 7 a los 15 dpv y las porinas solas de los 15 a los 22 dpv, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p = 0.079$ ) (Figura 4). Del mismo modo, en el peritoneo, los tres grupos indujeron una sobreexpresión significativa a los 7 dpv, donde los grupos iVNPI y iVNPI/porinas no mostraron diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.492$ ). Sin embargo, ambos grupos mostraron diferencia estadística significativa en comparación con las porinas solas ( $p = 0.038$ ). Además, el grupo iVNPI/porinas mantuvo una sobreexpresión significativa hasta los 15 dpv.

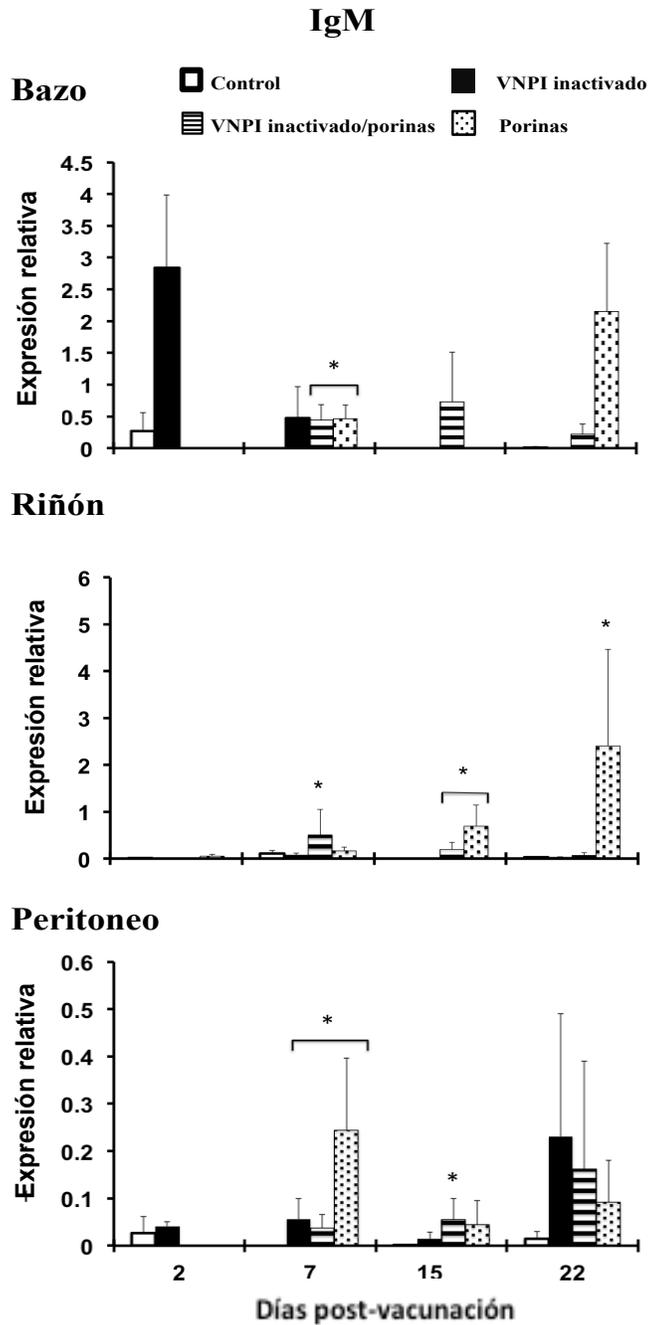


Figura 4. Expresión relativa del gen IgM en el bazo, el riñón y el peritoneo de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales. Las truchas fueron muestreadas a los 2, 7, 15 y 22 días post-vacunación (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).

### **7.1.2 Transcripción de los genes IFN- $\gamma$ y Mx después de la vacunación**

En el bazo, el grupo iVNPI indujo una transcripción estadística significativamente alta de IFN- $\gamma$  a los 7 dpv y en el grupo iVNPI/porinas a los 15 dpv (Figura 5). En el peritoneo, el grupo de porinas estimuló un aumento significativo de los 7 a los 22 dpv, iVNPI/porinas de los 15 a los 22 dpv y en el grupo iVNPI a los 22 dpv. Los tratamientos iVNPI/porinas y porinas no mostraron diferencias significativas a los 15 ( $p=0.426$ ) y a los 22 dpv ( $p=0.807$ ), pero ambos grupos fueron significativamente más altos que el grupo iVNPI a los 22 dpv ( $p=0.04$ ,  $p=0.006$ ). Los niveles de transcripción detectados en el riñón y en los sacos pilóricos no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Datos no mostrados, Anexos).

En el riñón, el gen Mx se sobreexpresó significativamente a los 15 dpv en los grupos iVNPI/porinas y porinas, sin encontrar diferencias entre ellos ( $p=0.08$ ) (Figura 6). Por otro lado, el iVNPI fue estadísticamente más bajo que las porinas a 22 dpv ( $p=0.022$ ), pero estos grupos no mostraron diferencias significativas en comparación con tratamiento iVNPI/porinas ( $p=0.091$ ,  $p=0.075$ ). En el peritoneo, las porinas aumentaron significativamente los niveles de transcripción a los 7 dpv.

### **7.1.3 Transcripción de los genes de la respuesta inmune adaptativa después del desafío**

Después del desafío, los niveles de transcripción de CD4 en el bazo se incrementaron significativamente en el grupo de porinas hasta los 18 dpd (Figura 7). Las diferencias de la expresión en el riñón (Datos no mostrados, Anexos) y los sacos pilóricos no se encontraron significativas. Los niveles transcripcionales de CD8 en el bazo fueron inducidos significativamente por el grupo iVNPI/porinas a los 7 dpd y por el grupo iVNPI a los 18 dpd, mientras que la respuesta inmune detectada en los sacos pilóricos fue significativa en el grupo iVNPI/porinas a los 45 dpv (día 0 previo al desafío), para el grupo iVNPI a los 2 dpd, y para las porinas a los 18 dpd. El grupo de las porinas indujo un aumento significativo en la expresión de IgM en el bazo a los 18 dpd (Figura 8). De igual forma, en el riñón, el grupo iVNPI/porinas fue significativamente inducido hasta los 18 dpd. En los sacos pilóricos, el iVNPI mostró un aumento gradual de la transcripción del gen IgM, así como el grupo iVNPI/porinas desde el día 0 pd hasta los 7 y 18 dpd.

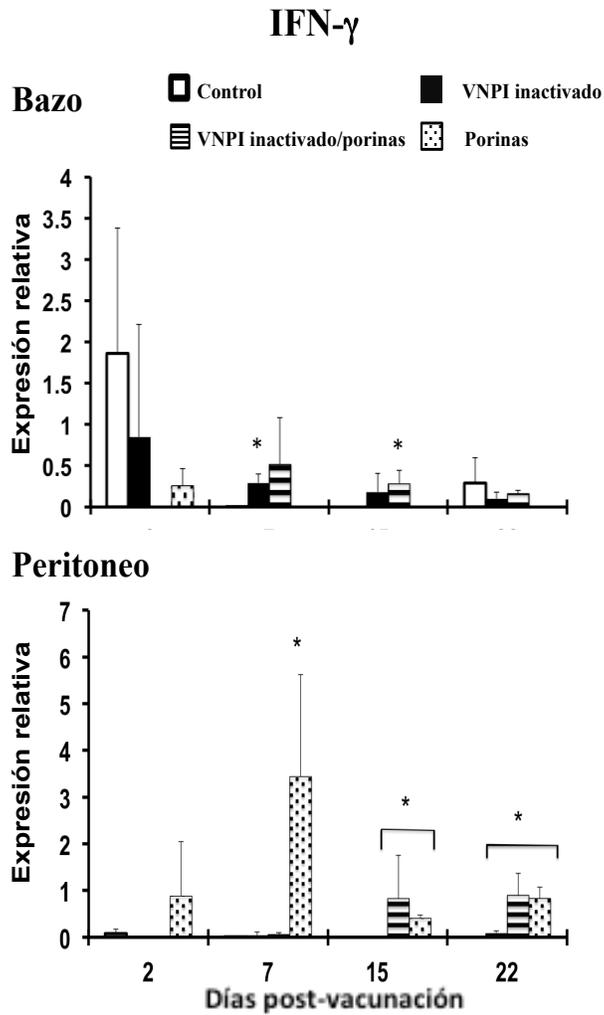


Figura 5. Expresión relativa del gen IFN- $\gamma$  en el bazo y el peritoneo de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales. Las truchas fueron muestreadas a los 2, 7, 15 y 22 días post-vacunación (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).

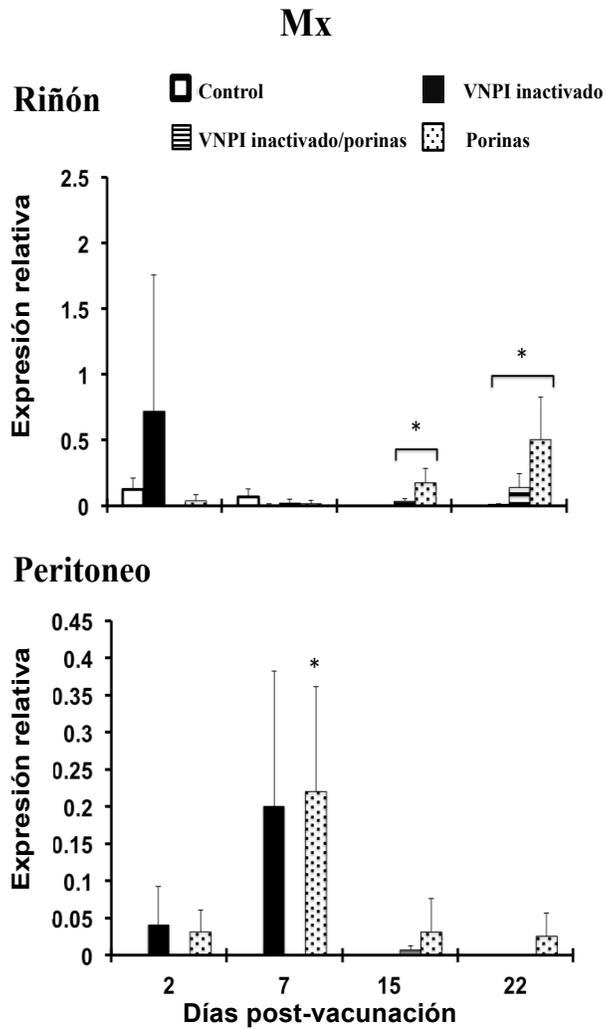


Figura 6. Expresión relativa del gen Mx en el riñón y el peritoneo de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales. Las truchas fueron muestreadas a los 2, 7, 15 y 22 días post-vacunación (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).

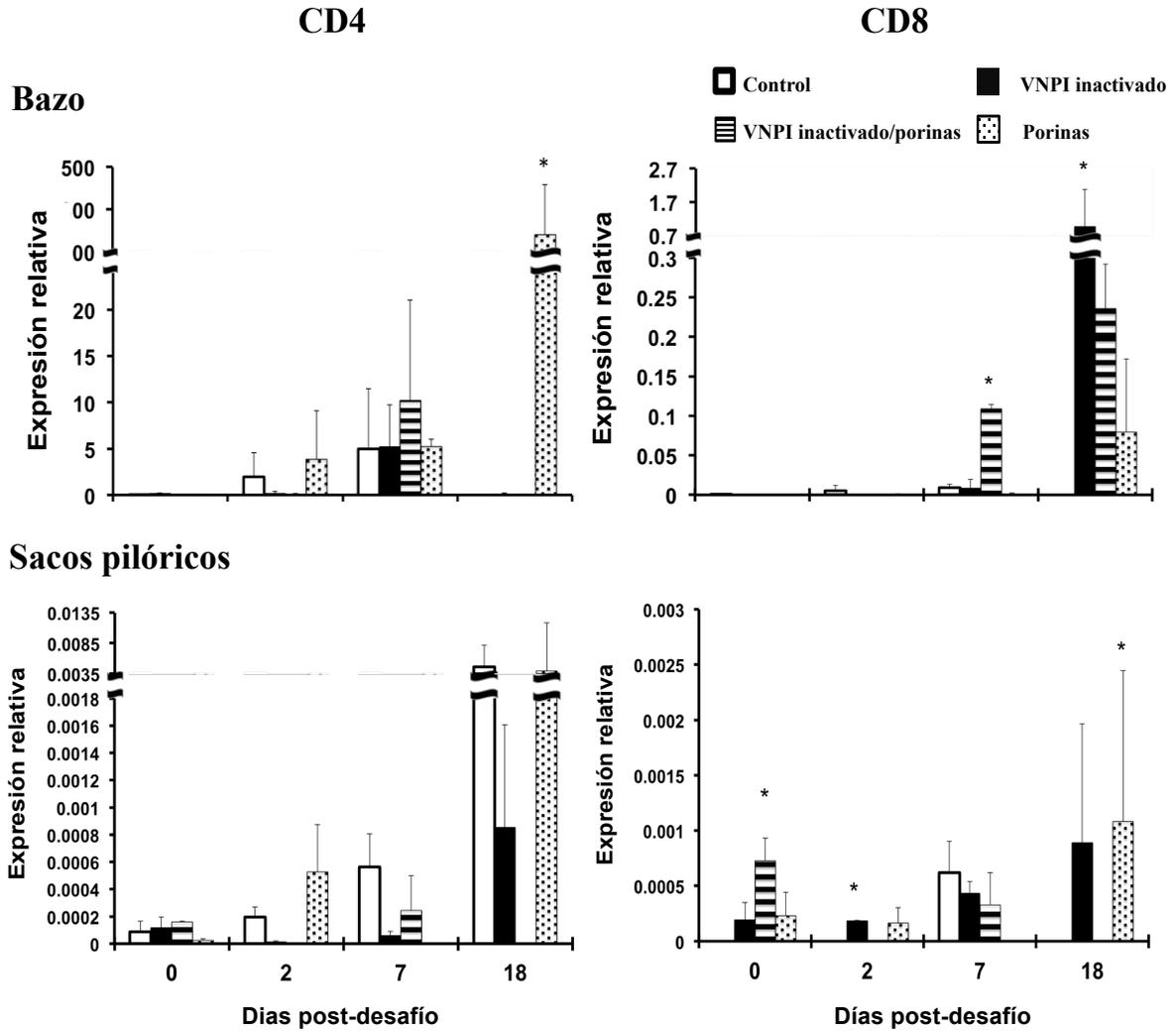


Figura 7. Expresión relativa de los genes CD4 y CD8 en el bazo y los sacos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales y posteriormente desafiadas. Las truchas fueron muestreadas a los 0, 2, 7 y 18 días post-desafío (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).

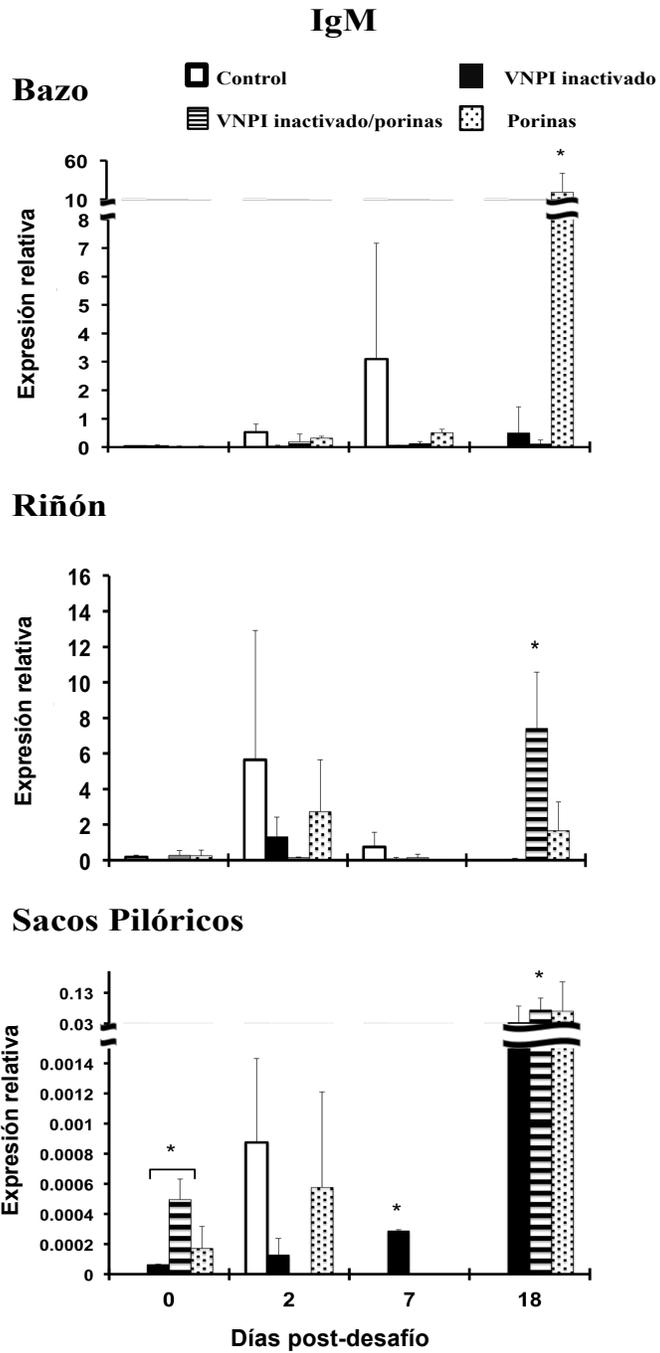


Figura 8. Expresión relativa del gen IgM en el bazo, el riñón y los sacos pilóricos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales y posteriormente desafiadas. Las truchas fueron muestreadas a los 0, 2, 7 y 18 días post-desafío (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).

### 7.1.4 Transcripción de IFN- $\gamma$ y Mx después del desafío

Después del desafío, los niveles de transcripción de los genes de IFN- $\gamma$  y Mx en el bazo demostraron ser significativamente mayores que en el grupo de porinas a los 18 dpd (Figura 9 y 10). La transcripción del gen IFN- $\gamma$  en los sacos pilóricos fue inducida significativamente por el grupo iVNPI/porinas a los 18 dpd mientras que la transcripción de los genes Mx fue significativamente estimulada por el iVNPI a los 7 y 18 dpd. Los niveles de transcripción en el riñón no mostraron diferencias significativas respecto al grupo control (Datos no mostrados, Anexos).

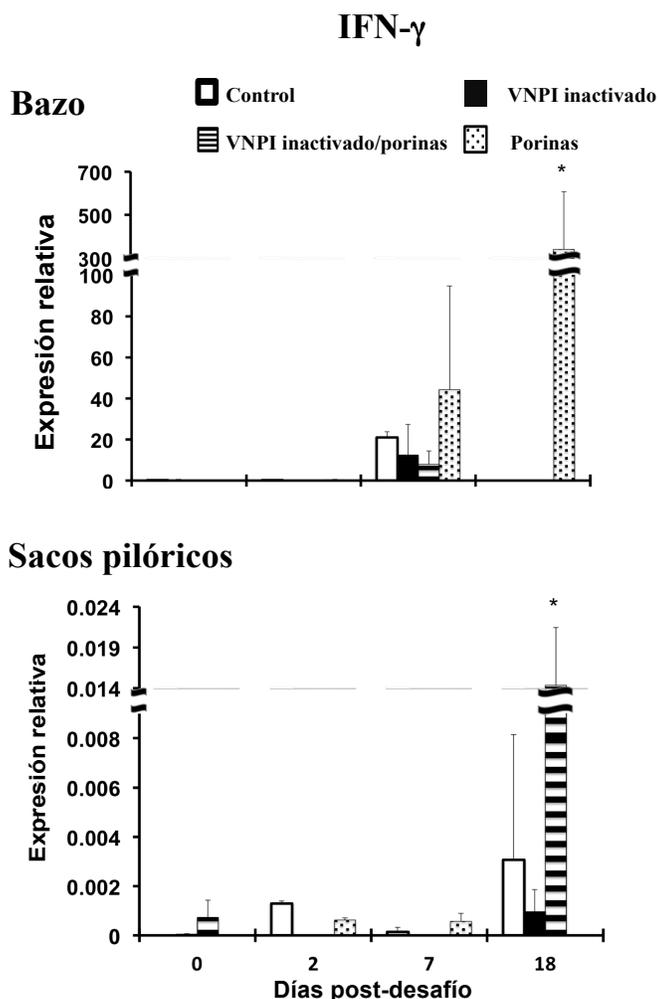
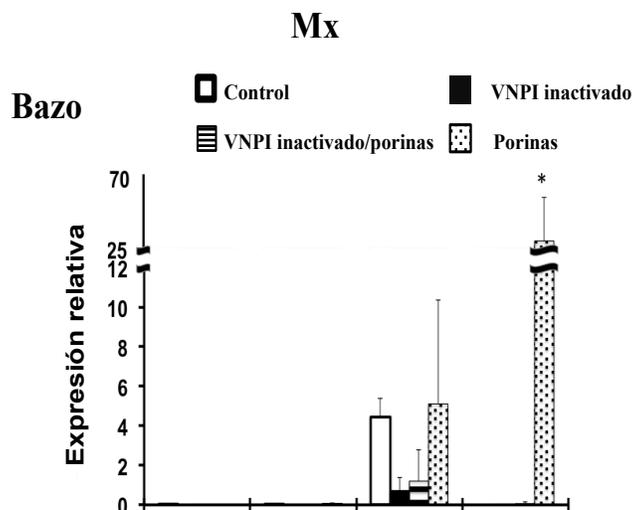


Figura 9. Expresión relativa del gen IFN- $\gamma$  en el bazo y los sacos pilóricos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales y posteriormente desafiadas. Las truchas fueron muestreadas a los 0, 2, 7 y 18 días post-desafío (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).



### Sacos pilóricos

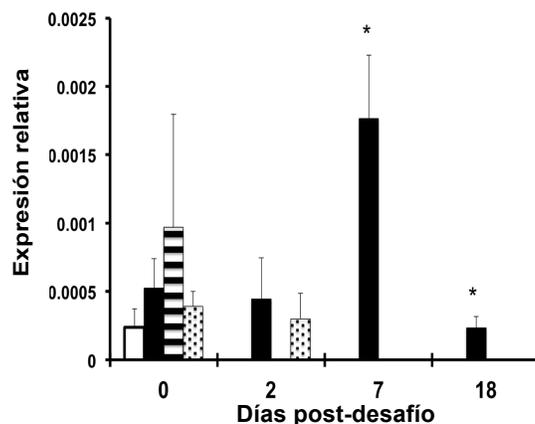


Figura 10. Expresión relativa del gen Mx en el bazo y los sacos pilóricos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales y posteriormente desafiadas. Las truchas fueron muestreadas a los 0, 2, 7 y 18 días post-desafío (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).

#### 7.1.5 Detección de anticuerpos neutralizantes

A los 45 dpv, se observó la densidad óptica más alta de anticuerpos específicos,  $0.121 \pm 0.039$  DO (Densidad óptica) para el grupo iVNPI/porinas y la densidad óptica para el iVNPI fue de  $0.082 \pm 0.008$  DO; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ellos ( $p=0.306$ ). Los grupos control y porinas fueron seronegativos (Figura 11).

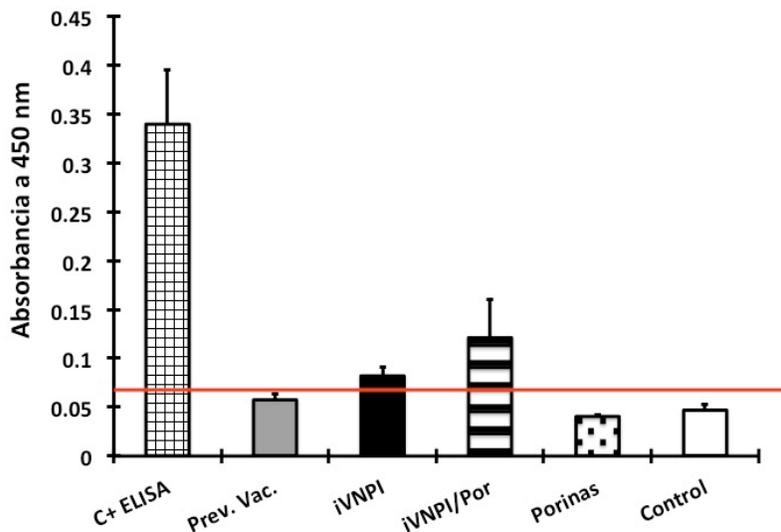


Figura 11. Absorbancias obtenidas de la detección de anticuerpos de truchas arcoíris en los cuatro grupos experimentales, a los 45 días post-vacunación. Se incluye la absorbancia del control positivo obtenido en el ELISA y la absorbancia del suero previo a la vacunación. El punto de corte (línea roja) se obtuvo en 0.064.

### 7.1.6 Protección conferida después del desafío

La tasa de supervivencia más alta fue obtenida en el grupo iVNPI (57.1%), seguido del grupo vacunado con las porinas solas (37.5%) y el grupo iVNPI/porinas, el cual tuvo la tasa de supervivencia más baja (12.5%). Los peces del grupo control no sobrevivieron a la infección (Figura 12).

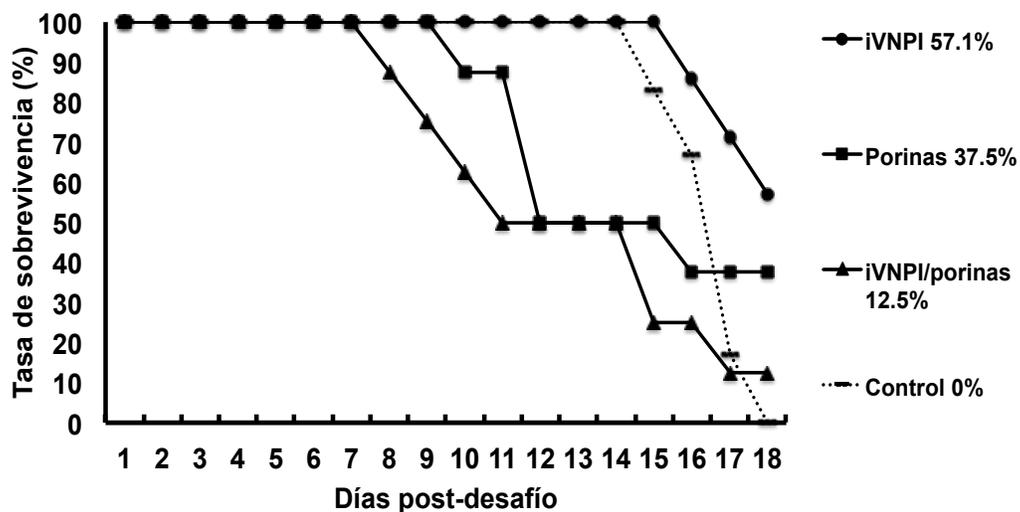


Figura 12. Proporción de supervivencia después del desafío de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales.

## 8. Segunda etapa: Evaluación de una PCR anidada para el diagnóstico oportuno del VNPI

Las truchas infectadas experimentalmente comenzaron a mostrar signos clínicos sugerentes a la NPI a partir del día 7 y hasta el día 11 post-inoculación (pi) (Cuadro 5). La mortalidad se observó a partir del día 7 pi, alcanzando el 100% de la mortalidad al día 11 pi. Los principales hallazgos de la necropsia en truchas inoculadas fueron: ausencia de alimento en el estómago, el hígado se mostró pálido y con presencia de moco en el intestino, mientras que, las truchas provenientes de las unidades de producción se observaron clínicamente sanas y sin lesiones a la necropsia.

Cuadro 5. Cinética de la presentación de los signos clínicos en las truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con la cepa MEX2-CSM-05.

Día post-desafío	Descripción de los signos clínicos
1-6	No se observaron signos
7	Anorexia, hiperpigmentación, disminución del apetito, distensión abdominal, exoftalmos moderado, nado errático en espiral en algunas truchas.
8	Incremento de la presentación del nado errático en espiral en más truchas, además de hiperpigmentación, anorexia, distensión abdominal.
9	Aumento en el nado errático en espiral en más truchas, además de hiperpigmentación, anorexia, distensión abdominal. Algunos organismos solo permanecían en el fondo.
10	Nado errático en espiral, hiperpigmentación, anorexia, distensión abdominal.
11	Nado errático en espiral, hiperpigmentación, anorexia, distensión abdominal.

Los resultados obtenidos de la RT-PCR en los diferentes órganos de las truchas inoculadas experimentalmente permitieron lograr la detección del VNPI en diferentes proporciones. Los órganos que mostraron mayor frecuencia de detección del virus fueron las branquias (87.1%), el hígado (61.4%), los sacos pilóricos (61.4%) y el riñón (58.6%) ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, los que registraron la menor frecuencia de detección de VNPI fueron: el intestino (35.7%) y bazo (32.9%) ( $p < 0.05$ ). Con el resto de las muestras que resultaron negativas al RT-PCR, al realizar la PCRa a partir del producto negativo de la RT-PCR se detectó un producto de 229 pb en todas las muestras (Cuadro 6).

Cuadro 6. Detección por RT-PCR y PCRa del gen VP2 del VNPI en los órganos de truchas arcoíris inoculadas con la cepa MEX2-CSM-05.

Órgano	RT-PCR		PCRa	
	Muestras positivas	%	Muestras positivas	%
Riñón	41/70	58.6	29/29	100
Hígado	43/70	61.4	27/27	100
Sacos pilóricos	43/70	61.4	27/27	100
Intestino	25/70	35.7	45/45	100
Branquias	61/70	87.1	9/9	100
Bazo	23/70	32.9	47/47	100

Con base en los resultados anteriores, la RT-PCR mostró menor sensibilidad que la PCRa en cada órgano analizado (Cuadro 7); sin embargo, la especificidad fue del 100%; mientras que la PCRa, mostró una sensibilidad y especificidad del 100%.

Cuadro 7. Sensibilidad de la RT-PCR.

Órgano	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad
Riñón	58.6% (47.0%, 70.1%)	100%
Hígado	61.4% (50.0%, 72.8%)	100%
Sacos pilóricos	61.4% (50.0%, 72.8%)	100%
Intestino	35.7% (24.5%, 46.9%)	100%
Branquias	87.1% (79.3%, 95.0%)	100%
Bazo	32.9% (21.9%, 43.9%)	100%

IC: Intervalos de confianza.

Los órganos de las truchas provenientes de las unidades de producción comerciales del Estado de México amplificaron únicamente al utilizar la PCRa, la frecuencia de detección fue del 100%, indicando que estaban infectados.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 Primera etapa: Desarrollo y evaluación *in vivo* de una vacuna experimental inactivada contra el VNPI en truchas arcoíris inmunizadas.

En el presente estudio, se desarrolló una vacuna inactivada con una cepa virulenta del VNPI mediante la utilización de radiación gamma que mostró una protección moderada en truchas arcoíris inmunizadas y desafiadas. Un análisis filogenético realizado con aislamientos mexicanos del VNPI, clasificados en el Genogrupo 1, mostró que se encuentran estrechamente relacionados con las cepas Buhl y 114, presentes en los aislamientos de EUA y Canadá (Salgado-Miranda *et al.* 2014). De esos aislamientos mexicanos, se seleccionó una cepa virulenta (aislado de truchas con signos de enfermedad clínica típica) para producir la vacuna experimental inactivada (Salgado-Miranda *et al.* 2014). Se ha encontrado que estos tipos de cepas permiten desarrollar vacunas más inmunogénicas, siendo mejores candidatas que las cepas avirulentas, las cuales han sido probadas en salmón y trucha arcoíris (Munang'andu *et al.* 2014a). Hasta ahora, esta es la primera vez que se describe la respuesta inmune inducida en la trucha arcoíris por el VNPI inactivado por irradiación gamma con porinas de *S. typhi* como inmunomodulador.

En la evaluación de la respuesta inmune se observó una expresión y movilización aumentada de las células CD4 en los órganos recolectados después de la aplicación de cada formulación vacunal, pero principalmente en los peces inmunizados con las porinas solas o mezcladas con el virus inactivado. Esto podría correlacionarse con la sobreexpresión del gen IgM, para las mismas formulaciones vacunales, principalmente a los 2 y 7 dpv. Esto podría indicar que los antígenos pueden seguir una ruta exógena y presentarse a través de la vía del MHC II asociada a las células Th2 (Munang'andu & Evensen 2015), así como el desarrollo de una respuesta específica a través de la producción de anticuerpos. Además, la expresión de CD8 fue baja y no significativa. Munang'andu y colaboradores (2013b) también observaron esta tendencia, en que los genes CD8 se expresan de manera insignificante durante la inducción de la respuesta inmune.

En nuestro estudio, después del desafío y debido a la infección natural con una dosis letal de VNPI, se observó una sobreexpresión de CD4 y CD8, así como de IgM en los sacos

pilóricos. Estos resultados se correlacionan con la presencia abundante de células T en los tejidos de la mucosa de los teleósteos al aplicar la inmersión como un método para la vacunación de peces o de infección (Ballesteros *et al.* 2013, Rombout *et al.* 2014). Además, también resulta en una sobreexpresión de las células CD4 en lugar de las células CD8 durante la infección por VNPI. Sin embargo, la expresión de CD8 fue significativa para el tratamiento iVNPI/porinas e iVNPI a los 7 y 18 dpd, respectivamente. Esta regulación positiva ha sido reportada y se asocia con la reducción de la mortalidad y la protección de las vacunas virales inactivadas de Munang'andu *et al.* 2013b.

En este estudio, la expresión de IgM se manifestó en un aumento gradual desde los 2 dpd en el tratamiento de la vacuna iVNPI, que se correlaciona con la detección de niveles de anticuerpos específicos y, en consecuencia, una mayor tasa de sobrevivencia. Esto sugiere que la vacuna inactivada induce una respuesta inmune humoral predominantemente.

El peritoneo se distinguió por mostrar mejor la cinética transcripcional de la mayoría de los genes evaluados a través del periodo post-vacunación. Algunos estudios han demostrado que la cavidad peritoneal representa un nicho linfoide, principalmente dominado por la producción de poblaciones celulares B e IgM. Por lo tanto, la inoculación de varios antígenos en éste sitio puede inducir la movilización de leucocitos, participando activamente en la presentación de antígenos al sistema inmune (Kollner *et al.* 2001, Korytár *et al.* 2013). Recientemente, Castro *et al.* demostraron que las células IgM B predominan en la cavidad peritoneal en truchas tras la inoculación de bacterias, virus o PAMP bacteriano. Estas células se están diferenciando hacia las células plasmáticas para secretar grandes cantidades de IgM (Castro *et al.* 2017). Esta misma respuesta fue similar a la que se observó en este estudio con el aumento gradual de la expresión de IgM que se observó en el peritoneo en los tres grupos inmunizados.

En nuestro estudio, los tratamientos con iVNPI/porinas y porinas mostraron niveles muy bajos de expresión del gen Mx después de la vacunación. Por el contrario, ante el desafío con el virus, se mostraron altos niveles de expresión del gen Mx en el tratamiento con porinas en bazo y sacos pilóricos. La inducción de este gen se puede encontrar en varios tejidos de peces después de una infección viral y su transcripción se correlaciona fuertemente con la liberación de IFN de tipo I (Collet, 2014).

Del mismo modo, se ha reportado que la administración de partículas similares a virus

(VLPs: por sus siglas en inglés *Virus Like Particles*) del VNPI administradas por inyección intraperitoneal en trucha arcoíris, fue eficiente en la inducción del gen Mx, lo que demuestra que la replicación viral no es un requisito previo para la inducción de la respuesta de IFN contra los virus (Martínez-Alonso *et al.* 2012), al igual que las porinas parecen haber hecho en nuestro estudio. El hecho de que las porinas inducen altos niveles de Mx podría explicar la protección del 37.5% que se generó contra el VNPI en el grupo tratado solo con porinas. Se ha demostrado que esta la proteína Mx inhibe directamente la síntesis de proteínas del VNPI (Larsen 2004) y disminuye los títulos de infección viral (Ballesteros *et al.* 2012). Además, los niveles altos de expresión de Mx se correlacionan con la replicación viral durante una infección aguda por VNPI, mientras que tasas bajas de infección durante el período de incubación se caracterizan por mostrar niveles bajos de expresión (Munang'andu *et al.* 2013a).

En nuestro estudio, la expresión de IFN- $\gamma$  se observó principalmente en el peritoneo a los 7 dpv y posteriormente fue disminuyendo hasta los 22 dpv. Después del desafío, se expresó a partir de los 7 dpd en los cuatro grupos, particularmente en el grupo de las porinas. Esto podría indicar la activación de una respuesta inmune por los macrófagos, los cuales pueden promover la expresión del IFN- $\gamma$  (Zou *et al.* 2005; Grayfer *et al.* 2010).

Por otro lado, las porinas son adyuvantes que aumentan la respuesta de anticuerpos específicos a antígenos no replicativos, como se demostró en la co-inmunización de porinas de *S. typhi* con la vacuna experimental inactivada contra el virus de la influenza H1N1 2009, en la cual se mostró incremento de los títulos de IgG contra el virus de influenza y su avidéz (Pérez -Toledo *et al.* 2017). En los peces, se sabe que las moléculas de origen bacteriano pueden estimular la activación innata de los macrófagos (Forlenza *et al.* 2011). Sin embargo, actualmente no hay información sobre el efecto de las porinas en la respuesta inmune de los peces, pero se sabe que las cepas patógenas de *Salmonella* pueden generar infecciones y daños en una gran variedad de hospedadores (Garai *et al.* 2012). Algunos estudios han demostrado la susceptibilidad a *Salmonella typhimurium* de los alevines del pez cebra (*Danio rerio*), que induce síntomas similares a la cloacitis (Varas *et al.* 2017).

En nuestro estudio, los grupos inmunizados con iVNPI/porinas y porinas solas mostraron las tasa de sobrevivencia mas bajas y generaron mortalidades tempranas. Moreno-Eutimio y colaboradores (2013) demostraron que las porinas son capaces de inducir la

producción de las siguientes citocinas: IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-10 tanto en células dendríticas como en macrófagos. Además, son reconocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por el sistema inmune innato a través de los TLR-2 y TLR-4 (Moreno-Eutimio *et al.* 2013). Sin embargo, se ha reportado que TLR-4, responsable de detectar LPS y porinas en células de mamíferos, está ausente en los salmónidos (Rebl *et al.* 2010), y aunque está presente en otras especies, como en el pez cebra (*Danio rerio*), no reconoce LPS (Sepulcre *et al.* 2009). Por otro lado, TLR-3 es capaz de detectar patrones moleculares bacterianos y virales en peces, a diferencia de las células de mamíferos (Thim *et al.* 2014). Esto puede sugerir que la vía de señalización de las porinas en la trucha arcoíris puede llevarse a cabo por alguna ruta diferente a la de los mamíferos, cuyo efecto en la inducción de la respuesta inmune aún se desconoce.

Otra posibilidad para explicar la aparente respuesta exacerbada en los tratamientos con porinas, puede ser el desarrollo de una reacción de hipersensibilidad. Jirillo *et al.* (2007) demostraron que el tejido intestinal de los peces es capaz de montar una respuesta de hipersensibilidad de tipo IV cuando es desafiado por antígenos microbianos. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios adicionales para determinar la dosis de porinas que garantice el mejor efecto como adyuvante.

## **9.2 Segunda etapa: Evaluación de una PCR anidada para el diagnóstico oportuno del VNPI**

Para este estudio, se diseñaron dos pares de iniciadores específicos para detectar las cepas mexicanas del VNPI que circulan en México (Salgado *et al.* 2014), ya que debido a la variabilidad antigénica de este virus se ha demostrado que iniciadores que reconocen cepas de otras partes del mundo no reconocen las cepas actualmente circulantes en el país (Rodríguez *et al.* 2001; Alonso *et al.* 2004).

En los últimos años, las técnicas moleculares como la PCR se han utilizado ampliamente para la detección de virus de peces (Ortega *et al.* 2002; Akhalagi *et al.* 2007). El uso de la RT-PCR se ha aplicado en la detección del VNPI debido a su precisión, rapidez y alta sensibilidad (Lopez-Lastra *et al.* 1994; Blake *et al.* 1995; Rodríguez *et al.* 2001; Alonso *et al.* 2004). Esta técnica se puede aplicar específicamente para la detección del genoma viral sin haber realizado un aislamiento viral previo, esto se llevó a cabo en Irán, en donde mediante la RT-PCR se confirmó la presencia del VNPI por primera vez en las granjas

piscícolas de trucha arcoíris de la provincia de Fars, cuyo aislado se asemeja a la cepa Ab (Akhalagi *et al.* 2007).

La aplicación de RT-PCR se ha descrito para la detectar al genoma del VNPI de cultivos celulares, tanto de peces inoculados experimentalmente como de peces, crustáceos y moluscos infectados de manera natural (Akhalagi *et al.* 2007). La infección por el VNPI es letal en salmónidos jóvenes, aunque este virus se puede aislar en diferentes órganos de los peces infectados en todos los rangos de edad (Milne *et al.* 2006). En el presente estudio, la PCRa mostró ser eficiente en la detección de un fragmento del genoma del VNPI tanto en las crías de trucha arcoíris como en las truchas provenientes de granjas comerciales, estas últimas son de mayor peso y edad.

Aunque el aislamiento de los birnavirus acuáticos de las especies aparentemente sanas puede ser común, se ha demostrado que la infección por VNPI puede no ser detectada aún cuando las muestras han sido examinadas por cultivo celular (Suzuki *et al.* 1997; Taksdal *et al.* 1998). Varios trabajos mostraron que la RT-PCR era más sensible que el aislamiento del cultivo celular para la detección del VNPI (Taksdal *et al.* 2001). La RT-PCR en tiempo real es ligeramente más sensible que el aislamiento viral en cultivo celular, este último es recomendado por la OIE para detectar el VNPI de peces portadores, los cuales han demostrado tener bajas concentraciones de virus en riñones, lo que puede limitar su detección por aislamiento viral (Taksdal *et al.* 1998; Ørpetveit *et al.* 2010).

De acuerdo con Milne *et al.* (2006), los títulos relativamente altos del virus están presentes en los peces con signología avanzada por VNPI, por lo tanto, podría hacer más fácil la detección del genoma viral por RT-PCR en punto final como una técnica molecular cualitativa. Sin embargo, como se mostró en nuestro estudio, un fragmento del genoma del VNPI fue detectado en un cierto porcentaje de los peces infectados experimentalmente en el ensayo de RT-PCR, dependiendo del órgano evaluado. Sin embargo, al realizarse el ensayo de la PCRa en las muestras negativas mostraron ser positivas, con un incremento de sensibilidad al 100%. Esto mismo se observó en las muestras de truchas juveniles provenientes de las unidades de producción comerciales, que se mostraban aparentemente sanas y resultaron ser positivas en la PCRa. Esto podría deberse a que la concentración de partículas virales en los portadores asintomáticos a menudo es baja, lo cual dificulta la detección del virus por medio de la RT-PCR (Milne *et al.* 2006).

Los resultados obtenidos en este estudio en peces adultos determinaron que podrían ser portadores sanos. Esto sucede cuando los peces sobreviven a la infección por VNPI y al continuar con su ciclo productivo contribuyen con la transmisión vertical del virus a través de las ovas y/o semen. Los portadores pueden no mostrar signos clínicos aparentes o cambios patológicos (Rimstad *et al.* 1990; Gahlawat *et al.* 2004) y dependiendo del progreso de la enfermedad a través del tiempo y/o de la respuesta inmunológica de cada espécimen, pueden no observarse cambios macroscópicos y microscópicos en los diferentes órganos de los peces. Sin embargo, los salmónidos persistentemente infectados con el VNPI son una potencial fuente de dispersión de la enfermedad y potencialmente detectables por PCR.

La alta sensibilidad de esta variante de PCR ya se ha demostrado en varias investigaciones. Se ha detectado una sensibilidad de hasta 10 pg en aislamientos de salmónidos a partir de muestras de ARN purificadas (Alonso *et al.* 2004). Lopez-Lastra *et al.* (1994) desarrollaron una PCRa para detectar hasta 1 pg del VNPI en portadores asintomáticos a partir de muestras de campo. Suzuki *et al.* (1997) desarrollaron una PCRa, utilizando un par de iniciadores basados en la detección de la región de unión de la secuencia del gen VP2/NS de los birnavirus acuáticos con una sensibilidad de un 1 fg (femtogramo) de genoma viral en la muestra.

La PCRa proporciona un aumento en la especificidad y reduce la detección de falsos positivos cuando el segundo par de iniciadores genera amplificación solo si el primer par de iniciadores desencadenó el fragmento de ADN esperado (Rodríguez *et al.* 2001; Alonso *et al.* 2004; Soliman *et al.* 2009). Otra ventaja de la PCRa propuesta en este estudio es la detección del virus de los tejidos infectados sin llevar a cabo el aislamiento en cultivo celular, ya que, aunque se considera la prueba de referencia para su diagnóstico, es una técnica que restringe su uso a laboratorios con personal capacitado para el manejo de las líneas celulares, el equipo necesario para su mantenimiento e incubación y la correcta identificación del efecto citopático que se produce en líneas celulares susceptibles (OIE, 2006).

Se debe mencionar que se han propuesto otras variantes de PCR y pruebas, pero su adopción depende del equipo disponible en los laboratorios. Por ejemplo, Rodríguez *et al.* (2001) realizaron una comparación de seis métodos de diagnóstico para el VNPI, en la que encontró que la RT-PCR fue uno de los métodos más apropiados y sensibles para

una detección rutinaria del VNPI. Barrera-Mejía *et al.* (2009) encontraron una sensibilidad baja (43%) con el uso de una RT-PCR, por lo que se propusieron utilizar un protocolo corto de incubación en cultivo celular como técnica complementaria, adicional a una PCR múltiplex utilizando tres pares de iniciadores en una sola reacción para incrementar la probabilidad de identificar todos los serotipos del serogrupo A del VNPI, así como prevenir un resultado falso negativo.

Aunque se han propuesto otras técnicas moleculares para un diagnóstico rápido y con alta sensibilidad como la RT-PCR en tiempo real y RT-LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*, por sus siglas en inglés), estas requieren equipos especializados y capacitación tanto para el diseño de iniciadores como para la interpretación de los resultados (Bowers *et al.* 2008; Soliman 2009).

En México, el diagnóstico del VNPI se realiza principalmente mediante el aislamiento viral en cultivo celular y la detección de su genoma por RT-PCR en punto final, ya que esta técnica se lleva a cabo en la mayoría de los laboratorios de forma convencional.

La detección del VNPI en los diferentes órganos analizados en este estudio confirma la amplia diseminación del virus. Usualmente los órganos recomendados para la detección del VNPI en cultivos celulares son: riñón, hígado, bazo y fluido ovárico del pie de cría o el alevín entero (OIE, 2006). Sin embargo, el principal órgano blanco para la replicación es el riñón, donde el virus persiste (Ørpetveit *et al.* 2010). A diferencia del riñón, otros órganos blancos para la detección del virus son el páncreas, el intestino, el hígado y las branquias. El páncreas se encuentra anatómicamente difuso entre los sacos pilóricos y en el se genera una severa necrosis. En el intestino se ha reportado una enteritis aguda caracterizada por la necrosis celular y glándulas que se encuentran en el tracto digestivo, responsable de la eliminación del virus en las heces y el moco que se produce (Dhar *et al.* 2017). En el hígado, el VNPI induce marcadores de apoptosis, los cuales también se han encontrado en tejido intestinal y pancreático que corresponden a la acumulación viral y cambios patológicos en el tejido (Imajoh *et al.* 2005; Santi *et al.* 2005). Finalmente, las branquias que son el órgano encargado del intercambio de oxígeno y filtración del agua, pueden observarse pálidas debido al daño degenerativo y necrótico del epitelio. En este estudio, los órganos donde se encontró la mayor frecuencia de detección del virus fueron los sacos pilóricos, intestino y branquias, los cuales como se mencionó, han sido identificados como órganos blanco para la detección temprana de la enfermedad, puesto

que son sitios de replicación temprana del virus (Shankar *et al.* 1994).

## **10. CONCLUSIONES**

En conclusión, la vacuna inactivada contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa adicionada con porinas de *S. typhi* como adyuvante, no fue capaz de inducir una respuesta inmune para proteger a las crías de truchas arcoíris inmunizadas frente a un desafío con el VNPI. La inclusión de porinas provocó cierta inmunomodulación, pero no incrementó el efecto protector, por lo que su potencial como adyuvante en peces aún debe investigarse más. Por otro lado, la vacuna viral inactivada sola demostró un efecto protector moderado en la trucha arcoíris contra el VNPI y fue capaz de inducir una respuesta inmune adaptativa, según lo establecido a través de estudios de transcripción y de desafío. La efectividad de la vacuna podría incrementarse con un adyuvante apropiado.

También se demostró que la PCRa, es útil en el diagnóstico del VNPI ya que mostró una sensibilidad mayor a la RT-PCR para la detección del VNPI a partir de muestras de tejidos de truchas infectadas, tanto en peces clínicamente enfermos, como en aquellos que no mostraban signos clínicos. Por lo que un brote de la NPI en una unidad de producción puede ser confirmado por este método.

## 11. LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Formulaciones vacunales evaluadas en este estudio	22
Cuadro 2. Secuencias de iniciadores utilizados en este estudio	24
Cuadro 3. Secuencia de iniciadores para detectar el gen VP2 del VNPI y del gen constitutivo EF- $\alpha$	28
Cuadro 4. Tabla de 2 x 2 en la que se explica la generación de las celdas con las que se realizan los cálculos de sensibilidad y especificidad)	29
Cuadro 5. Cinética de la presentación de los signos clínicos en las truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con la cepa MEX2-CSM-05	41
Cuadro 6. Detección por RT-PCR y PCRa del gen VP2 del VNPI en los órganos de truchas arcoíris inoculadas con la cepa MEX2-CSM-05	42
Cuadro 7. Sensibilidad de la RT-PCR	42

## 12. LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema del virus de la necrosis pancreática infecciosa y las proteínas que lo conforman (<http://viralzone.expasy.org>, 2015) 2
- Figura 2. Organización del genoma del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) 3
- Figura 3. Expresión relativa del gen CD4 en el bazo y el peritoneo de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales 31
- Figura 4. Expresión relativa del gen IgM en el bazo, el riñón y el peritoneo de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales 32
- Figura 5. Expresión relativa del gen IFN- $\gamma$  en el bazo y el peritoneo de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales 34
- Figura 6. Expresión relativa del gen Mx en el riñón y el peritoneo de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales 35
- Figura 7. Expresión relativa de los genes CD4 y CD8 en el bazo y los sacos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales y posteriormente desafiadas 36
- Figura 8. Expresión relativa del gen IgM en el bazo, el riñón y los sacos pilóricos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales y posteriormente desafiadas 37
- Figura 9. Expresión relativa del gen IFN- $\gamma$  en el bazo y los sacos pilóricos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales y posteriormente desafiadas 38
- Figura 10. Expresión relativa del gen Mx en el bazo y los sacos pilóricos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales y posteriormente desafiadas 39

Figura 11. Absorbancias obtenidas de la detección de anticuerpos de truchas arcoíris en los cuatro grupos experimentales, a los 45 días post-vacunación 40

Figura 12. Proporción de sobrevivencia después del desafío de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales 40

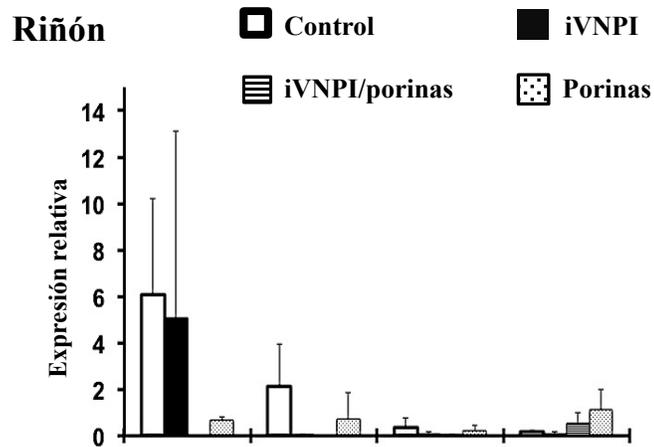
### 13. ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.	ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas por sus siglas en inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.	Es	Especificidad
Ala	Alanina	EUA	Estados Unidos de América.
ANOVA	Análisis de varianza	FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
ARN	Ácido ribonucleico.	FN	Falsos Negativos
ATCC	American Type Culture Collection	FP	Falsos Positivos
BF-2	Blue gill fry	h	horas
CBCURAE	Comité de Bioética para el cuidado y uso razonable de los animales de experimentación en proyectos de investigación	His	Histidina
CD4	cluster of differentiation 4	hpi	horas postinfección
CD8	cluster of differentiation 4	IgD	Inmunoglobulina D
CHSE-214	Chinook salmon embryo	IgM	Inmunoglobulina M
CONAPESCA	Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca	IgT	Inmunoglobulina T
CPE	Efecto citopático	IL	Interleucina
Ct	Cycle threshold, ciclo umbral	INF	Interferón.
DE	Desviación estándar	INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Forestales y Pecuarias.
Da	Daltons	MDA5	helicasa (Melanoma Differentiation-Associated protein 5)
DICC	Dosis infecciosa en cultivo celular	MEM	Medio mínimo esencial.
dNTP	dinucleósidos trifosfato	MHC	complejo principal de histocompatibilidad
dpd	días post-desafío	Mx	Myxovirus resistance
dpv	días post-vacunación	NK	Natural Killer
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	NPI	Necrosis pancreática infecciosa
EF1- $\alpha$	Factor de elongación alfa		

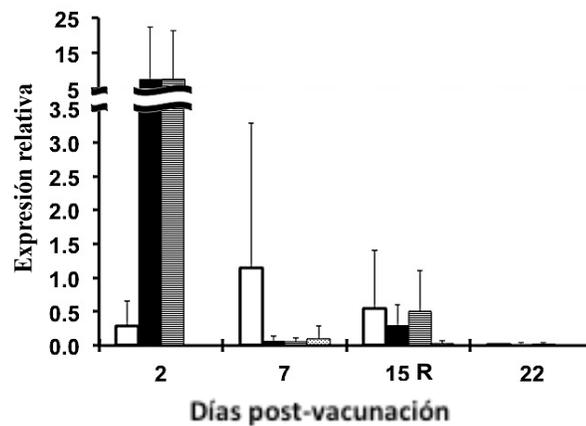
DO Densidad óptica	TAE Solución Tris-acetato EDTA
OIE Organización Mundial de Sanidad Animal.	Tyr Tirosina
OPD dihidrocloruro de o-fenilendiamina	Th T-helper
ORF Open Reading Frame, Marco de lectura abierto	TLR's Toll-like receptors, receptores tipo Toll
PAMP's Pathogen Associated Molecular Patterns, Patrones moleculares asociados a patógenos	TNF- $\alpha$ Factor de Necrosis Tumoral alfa
Pb pares de bases	Thr Treonina
PBS Phosphate buffered saline, solución salina fosfatada	UNAM Universidad Nacional Autónoma de México.
PCR Polymerase chain reaction, Reacción encadena de la polimerasa	UAEM Universidad Autónoma del Estado de México
PCRa Reacción encadena de la polimerasa anidada	VN Verdaderos Negativos
pi post-inoculación	VNPI Virus de la necrosis pancreática infecciosa.
PKR Protein kinasa RNA-activated	VP Verdaderos Positivos
Pro Prolina	VP1 Viral protein 1.
PRR's Pattern Recognition Receptors, receptores de reconocimiento de patrones	VP2 Viral protein 2.
pVP2 Precursor de la VP2.	VP3 Viral protein 3.
RIG-I helicasa (Retinoic acid-inducible gene I)	VP4 Viral protein 4
RTG-2 Rainbow trout gonad	
RT Transcripción reversa.	
SADER Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural	
Se Sensibilidad	
SFB Suero fetal bovino.	
Sp Spajarup	

## 14. ANEXOS

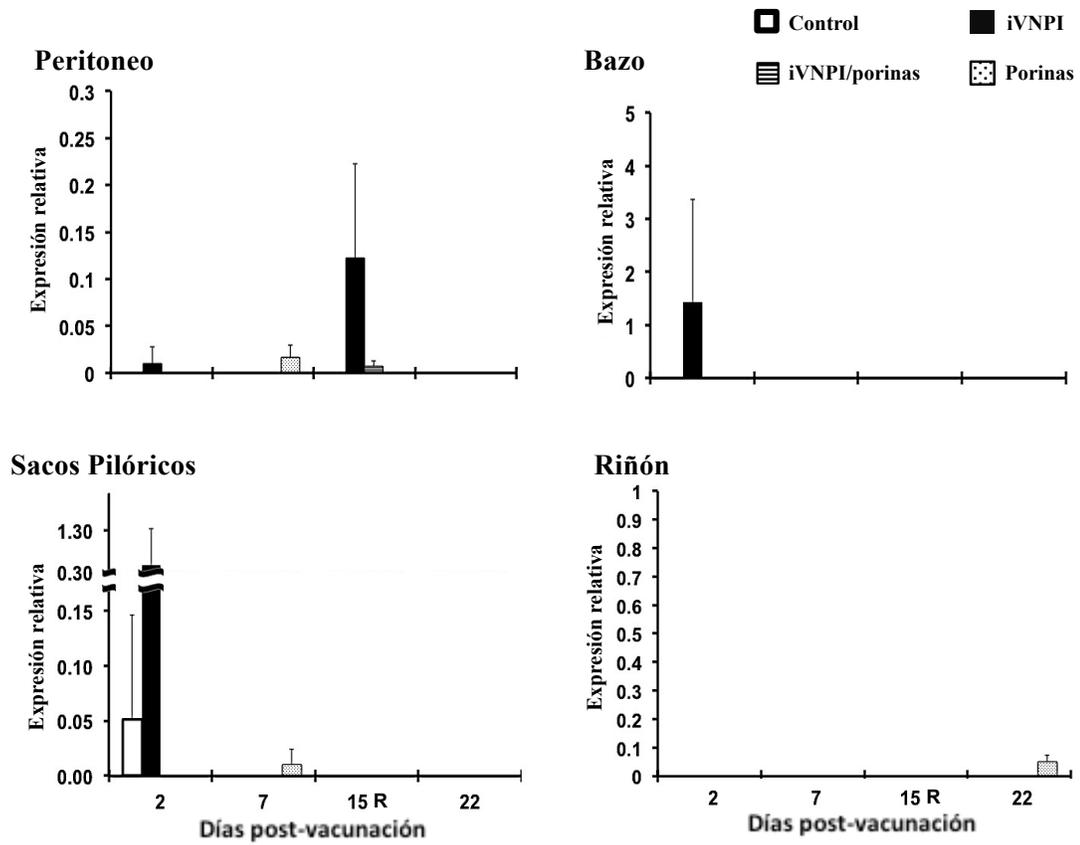
### Datos no mostrados en Resultados



### Sacos Pilóricos

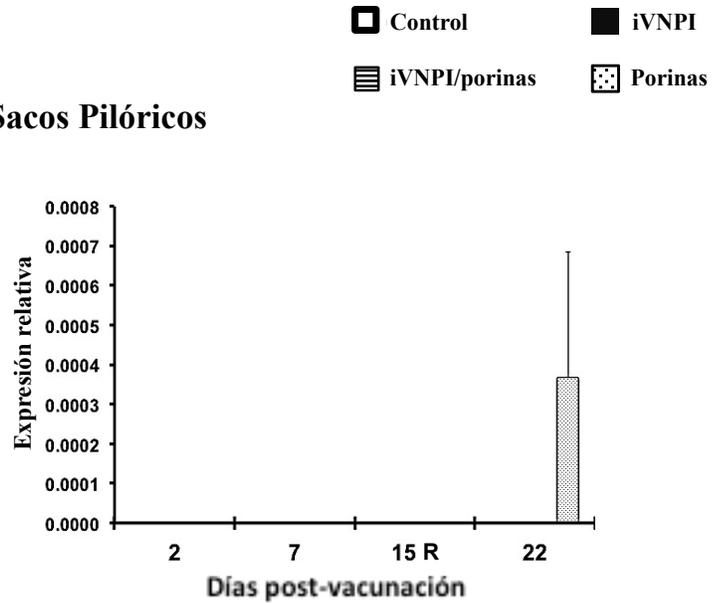


Expresión relativa del gen CD4 en el riñón y sacos pilóricos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales. Las truchas fueron muestreadas a los 2, 7, 15 y 22 días post-vacunación (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).

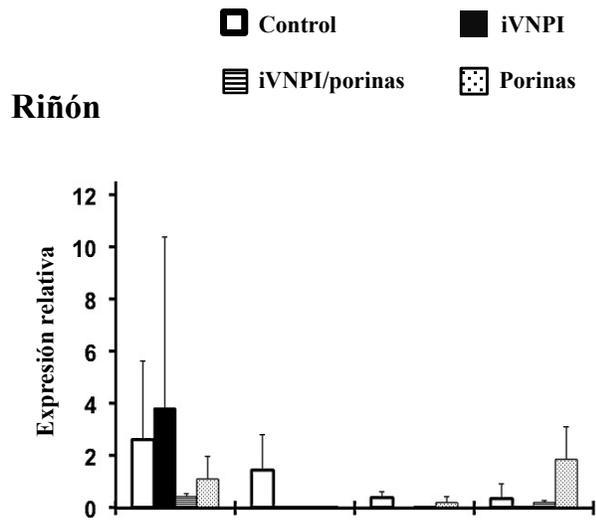


Expresión relativa del gen CD8 en el peritoneo, bazo, sacos pilóricos y riñón de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales. Las truchas fueron muestreadas a los 2, 7, 15 y 22 días post-vacunación (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).

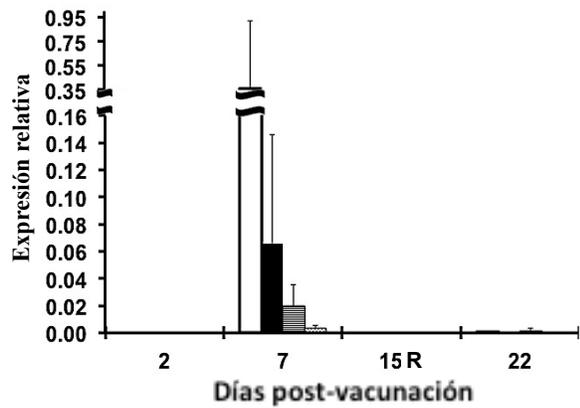
## Sacos Pilóricos



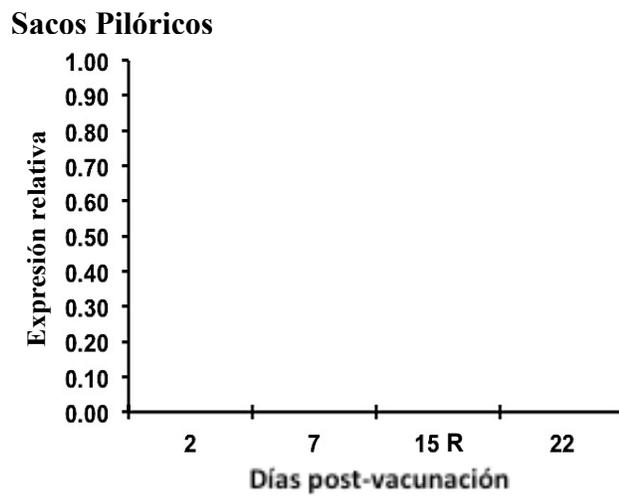
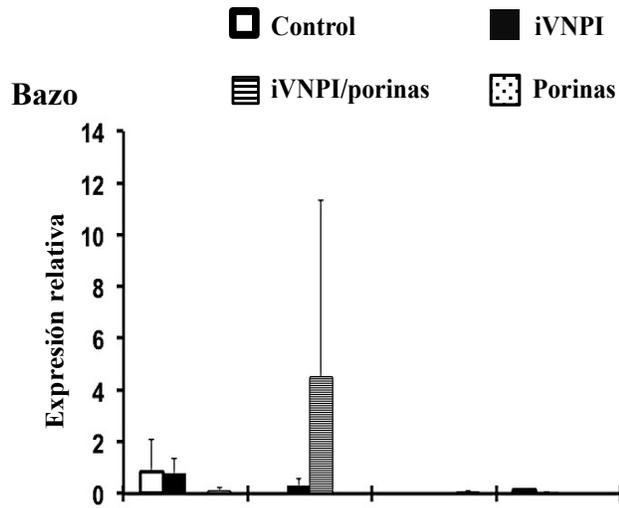
Expresión relativa del gen IgM en los sacos pilóricos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales. Las truchas fueron muestreadas a los 2, 7, 15 y 22 días post-vacunación (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).



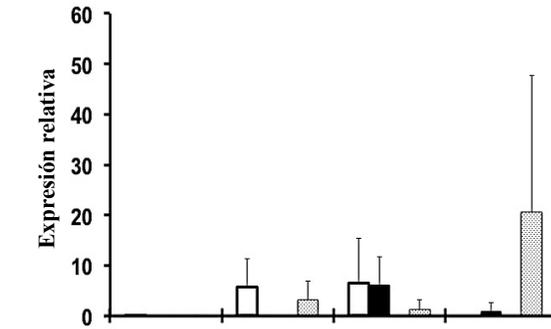
**Sacos Pilóricos**



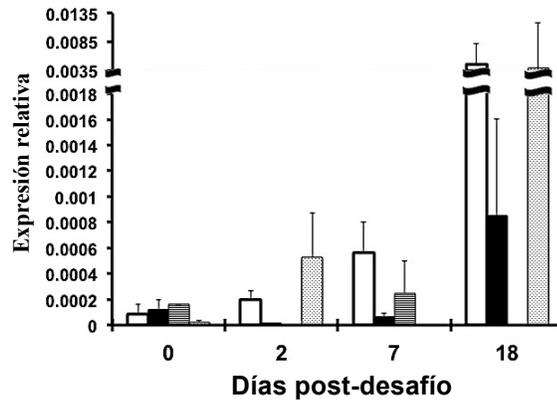
Expresión relativa del gen IFN- $\gamma$  en el riñón y sacos pilóricos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales. Las truchas fueron muestreadas a los 2, 7, 15 y 22 días post-vacunación (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).



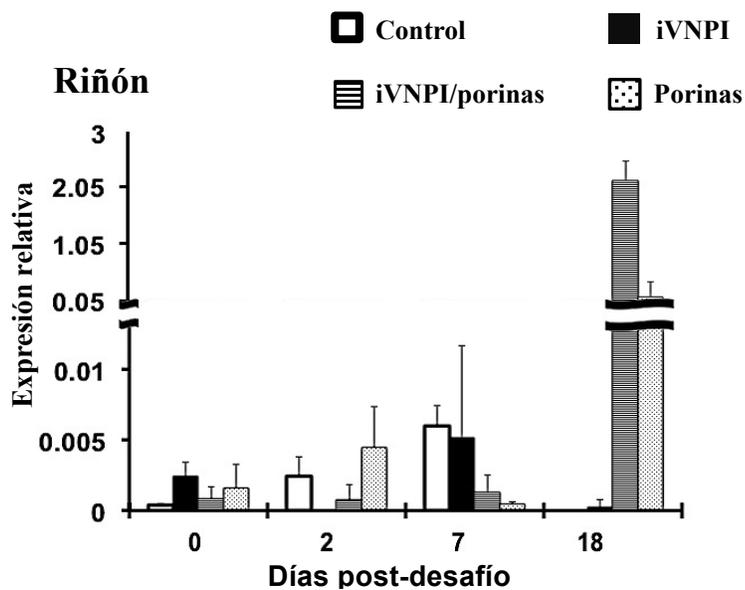
Expresión relativa del gen Mx en el bazo y sacos pilóricos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales. Las truchas fueron muestreadas a los 2, 7, 15 y 22 días post-vacunación (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).



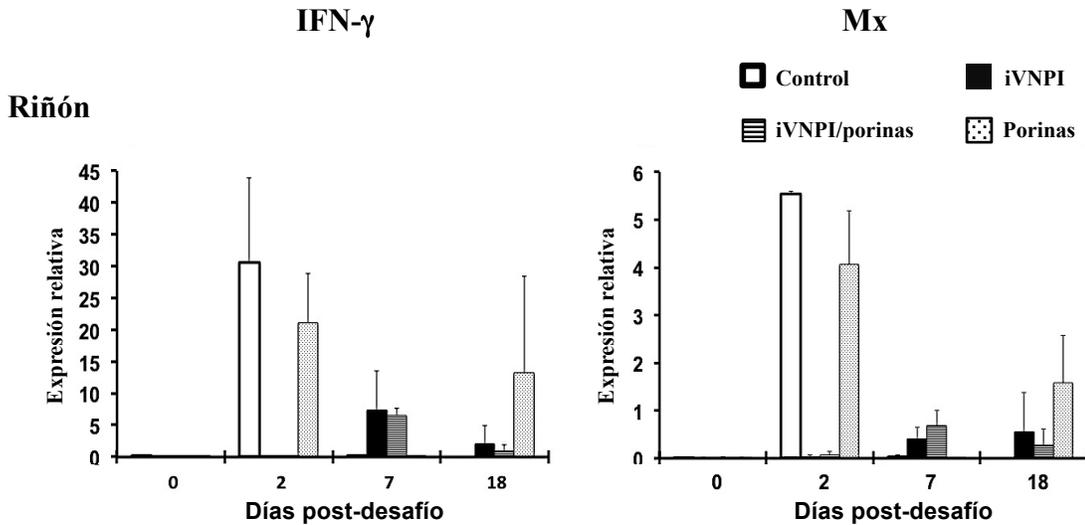
**Sacos Pilóricos**



Expresión relativa del gen CD4 en el riñón y los sacos pilóricos de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales y posteriormente desafiadas. Las truchas fueron muestreadas a los 0, 2, 7 y 18 días post-desafío (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).



Expresión relativa del gen CD8 en el riñón de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales y posteriormente desafiadas. Las truchas fueron muestreadas a los 0, 2, 7 y 18 días post-desafío (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).



Expresión relativa de los genes IFN- $\gamma$  y Mx en el riñón de las truchas vacunadas con las diferentes formulaciones vacunales y posteriormente desafiadas. Las truchas fueron muestreadas a los 0, 2, 7 y 18 días post-desafío (n=5 peces) en los diferentes grupos. Los datos se muestran como expresión génica en relación al gen EF1- $\alpha$  como un control endógeno (Promedio + desviación estándar). El asterisco denota diferencias significativas de cada formulación vacunal respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ).

## 15. REFERENCIAS

Adedeji BO, Onianwa O, Okerentugba PO, Okonko IO. Immune response of fish to viral infection. Nat Sci. 2012;10(8):70-76. Disponible en: [http://www.sciencepub.net/nature/ns1008/012\\_9784ns1008\\_70\\_76.pdf](http://www.sciencepub.net/nature/ns1008/012_9784ns1008_70_76.pdf).

Agius C, Manguwiryo H, Johnson RH, Smail DA. A more sensitive technique for isolating infectious pancreatic necrosis virus from asymptomatic carrier rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J Fish Dis. 1982;5: 285–292.

Ahne W, Thomsen I. Infectious pancreatic necrosis: detection of virus and antibodies in rainbow trout IPNV-carrier (*Salmo gairdneri*). J Vet Med. 1986;33(7):552-554.

Akhlagi M, Hosseini A. First report on the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by RT-PCR in rainbow trout fry cultured in Iran. Bull Eur Ass Fish Pathol. 2007;27(5):205-210.

Alonso M, Cano I, Castro D, Perez-Prieto SI, Borrego JJ. Development of an *in situ* hybridization procedure for the detection of sole *Aquabirnavirus* in infected fish cell cultures. J Virol Meth. 2004;116(2):133-138.

Alonso M, Rodríguez S, Pérez-Prieto SI. Viral coinfection in salmonids: infectious pancreatic necrosis virus interferes with infectious hematopoietic necrosis virus. Arch Virol. 1999;144(4):657-673.

Alsharifi M, Furuya Y, Bowden TR, Lobigs M, Koskinen A, Regner M, Trinidad L, Boyle BD, Mülbacher A. Intranasal flu vaccine protective against seasonal and H5N1 avian influenza infections. PLoS ONE. 2009;4(4):e5336.

Amos KH. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens, 3rd ed. Fish Health Section, American Fisheries Society, Corvallis; 1985.

Babb R, Chan J, Khairat EJ, Furuya Y, Alsharifi M. Gamma-irradiated influenza virus provides adjuvant activity to a co-administered poorly immunogenic SFV vaccine in mice. Front in Immunol. 2014;5(267):1-7.

Ballesteros NA, Castro R, Abos B, Rodríguez-Saint-Jean SS, Pérez-Prieto SI, Tafalla C. The pyloric caeca area is a major site for IgM+ and IgT+ B cell recruitment in response to oral vaccination in rainbow trout. PLoS ONE. 2013;8:e66118.

Ballesteros NA, Rodríguez Saint-Jean S, Pérez-Prieto SI, Aquilino C, Tafalla C. Modulation of genes related to the recruitment of immune cells in the digestive tract of trout experimentally infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or orally vaccinated. Dev Comp Immunol. 2014;44(1):195-205.

Ballesteros NA, Saint-Jean SS, Perez-Prieto SI, Coll JM. Trout oral VP2 DNA vaccination mimics transcriptional responses occurring after infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Shellfish Immunol.* 2012;33(6):1249-57.

Barrera-Mejía M, Martínez S, Ortega C, Ulloa-Arvizu R. Genotyping of infectious pancreatic necrosis virus isolates from Mexico State. *J Aquat Animal Health.* 2011;23:200-206.

Barrera-Mejía M, Simón-Martínez J, Salgado-Miranda C, Vega F, Ortega C, Aragón A. Development and validation of a short-time cell culture and multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for infectious pancreatic necrosis virus in Mexican farm-sampled rainbow trout. *J Aquat Anim Health.* 2009;21(3):167-72.

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

Blake S, Lee MK, Singer J, McAllister PE, Nicholson BL. Detection and identification of aquatic birnavirus by polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol.* 1995;33(4):835-839.

Blake SJ, Ma Y, Caporale DA, Jairath S, Nicholson BL. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis Aquat Org.* 2001a;45:89-102.

Blake SJ, Ma Y, Caporale DA, Jairath S, Nicholson BL Erratum: Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis Aquat Org.* 2001b;45:89-102.

Bowers RM, Lapatra SE, Dhar AK. Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *J Virol Methods.* 2008;147(2):226-34.

Castro R, Bromage E, Abos B, Pignatelli J, Gonzalez Granja A, Luque A, Tafalla C. CCR7 is mainly expressed in teleost gills, where it defines an IgD+IgM- B lymphocyte subset. *J. Immunol.* 2014;192:1257-1266.

Castro R, Abós B, González L, Granja AG, Tafalla C. Expansion and differentiation of IgM+ B cells in the rainbow trout peritoneal cavity in response to different antigens. *Dev Comp Immunol.* 2017;70:119-127.

Castro R, Tafalla C. Inmunidad de peces teleósteos. "En: Loza-Rubio E, Rojas-Anaya E. Temas actuales en la Sanidad de los peces teleósteos. Ciudad de México (México): CENID-MA, INIFAP; 2017:67-84.

Collet B. Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. *Dev Com Immunol*. 2014;43(2):160-173.

Comps M, Menu B, Breuil G, Bonami JR. Viral infectious associated with rotifer mortalities in mass culture. *Aquaculture*. 1991;93:1-7.

CONAPESCA. Ficha estadística Trucha 2008-2017. En: Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2017 (ed. by Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca), pp. 44. CONAPESCA, Sinaloa, México; 2017. Disponible en: [https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgpppe/2017/ANUARIO\\_ESTADISTICO\\_2017.pdf](https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgpppe/2017/ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf)

Coulibaly F, Chevalier C, Delmas B, Rey FA. Crystal structure of an Aquabirnavirus particle: insights into antigenic diversity and virulence determinism. *J Virol*. 2010;84:1792-1799.

Couve E, Kiss J, Kuznar J. Infectious pancreatic necrosis virus internalization and endocytic organelles in CHS-214 cells. *Cell Biol Int Rep*. 1992;16:899-906.

Cutrin JM, Oliveira JG, Barja JL, Dopazo CP. Diversity on infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish and other reservoirs in northwestern Spain. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:839-843.

Dadar M, Dhama K, Vakharia VN, Hoseinifar SH, Karthik K, Tiwari R, Khandia R, Munjal A, Salgado-Miranda C, Joshi SK. Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens: Global status and current trends. *Rev Fish Sci Aquac*. 2017;25(3):184–217.

Delrue I, Verzele D, Madder A, Nauwynck HJ. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Exp Rev Vaccines*. 2012;11(6):695-719.

Delmas B. Birnaviruses. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester [Internet]. 2015. doi: 10.1002/9780470015902.a0001009.pub2

Dhar A, LaPatra S, Orry A, Allnut T. 1. Infectious Pancreatic Necrosis Virus In: Woo PTK, Cipriano RC (ed) *Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection*. UK: CAB International; 2017:1-12

Dixon B, Becker L. Chapter 8 Adaptive immunity in finfish: a physiological perspective. In: Fletcher GL, Rise ML (ed) *Aquaculture Biotechnology*. 1st ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2012:121-137

Dixon PF, Hill BJ. Rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by the enzyme-linked immunosorbent assay. *J Gen Virol*. 1983;64:321–330.

Dobos P. Protein primed RNA synthesis in vitro by the virion associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*. 1995;208:19-25.

Dobos P, Roberts TE. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. *Can J Microbiol*. 1983;29:377–384.

Elliott LH, McCormick JB, Johnson KM. Inactivation of Lassa, Marburg, and Ebola viruses by gamma irradiation. *J Clin Microbiol*. 1982;16(4):704–708. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC272450/pdf/jcm00147-0130.pdf>.

Espinoza JC, A Hjalmarsson, E Everitt, J Kuznar. Temporal and subcellular localization of infectious pancreatic necrosis virus structural proteins. *Arch Virol*. 2000;145:739-748.

Evensen O, Rimstad E. Immunohistochemical identification of infectious pancreatic virus in paraffin-embedded tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Vet Diagn Invest*. 1990;2:288–293.

Ferguson HW. *Systemic Pathology of Fish*. Second Edition. Scotian Press; 2006.

Fernández AB, Ruiz I, De Blas I. El sistema inmune de los teleósteos (II): Respuesta inmune inespecífica. *Revista AquaTIC [serial online]*, 2002 [Disponible 29 de octubre de 2007]; Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=154>.

Fillatreau S, Six A, Magadan S, Castro R, Sunyer JO, Boudinot P. The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Front. Immunol*. 2013;4:28.

Fletcher TC, Secombes CJ. Immunology of Fish. In: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester [Internet]. 2010. doi: 10.1002/9780470015902.a0000520.pub2

Forlenza M, Fink IR, Raes G, Wiegertjes GF. Heterogeneity of macrophage activation in fish. *Dev Comp Immunol*. 2011;35:1246-1255.

Furuya Y. Return of inactivated whole-virus vaccine for superior efficacy. *Immunol Cell Biol*. 2012;90(6):571–578.

Furuya Y, Chan J, Regner M, Lobigs M, Koskinen A, Kok T, Manavis J, Li P, Mullbacher A, Alsharifi M. Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by gamma-irradiated influenza A viruses. *J Virol*. 2010;84(9):4212–4221.

Gahlawat SK, Munro ES, Ellis AE. A non-destructive test for the detection of IPNV carriers in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J Fish Dis*. 2004;27(4):233-239.

Garai P, Prakash GD, Chakravorty D. *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and

Typhi as model organisms. Revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence*. 2012;3:377–388.

Grayfer L, Garcia EG, Belosevic M. Comparison of macrophage antimicrobial responses induced by type II interferons of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *J Biol Chem*. 2010;285:23537e47.

Heidarieh M, Hedayati M, Mirvaghefi RA, Diallo A, Mousavi S, Sheikhzadeh N, Shahbazfar AA. Effect of gamma irradiation on inactivation of *Ichthyophthirius multifiliis* trophonts and its efficacy on host response in experimentally immunized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk J Vet Anim Sci*. 2014;38(4):388-393.

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

Hikima J, Jung TS, Aoki T. Immunoglobulin genes and their transcriptional control in teleosts. *Dev Comp Immunol*. 2011;35:924e36.

Imajoh M, Hirayama T, Oshima S. Frequent occurrence of apoptosis is not associated with pathogenic infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) during persistent infection. *Fish Shellfish Immunol*. 2005;18(2):163-177.

Ingerslev HC, Fausa EP, Jakobsen RA, Petersen CB, Wergeland HI. Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Mol Immunology*. 2006;43(8):1194-1201.

Ingerslev H-C, Ronneseth A, Pettersen EF, Wergeland HI. Differential Expression of Immune Genes in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Challenged Intraperitoneally or by Cohabitation with IPNV. *Scand J Immunol*. 2009;69(2):90-98.

Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, Gonzalez C, Moreno J, Kumate J. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi. *Infect Immun*. 1988;56(11):2953-2959.

Isibasi A, Paniagua J, Rojo MP, Martin N, Ramírez G, González CR, Lopez-Macias C, Sanchez J, Kumate J, Ortiz-Navarrete V. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;730(1):350-352.

Jarp J, Taksdal T, Tørud B. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon *Salmo salar* in relation to specific antibodies, smoltification, and infection with erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS). *Dis Aquat Org*. 1996;27, 81-88.

Jirillo F, Passantino G, Massaro MA, Cianciotta A, Crasto A, Perillo A, Passantino L, Jirillo E. *In vitro* elicitation of intestinal immune responses in teleost fish: evidence for a type IV

hypersensitivity reaction in rainbow trout. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2007;29:69-80.

Jørgensen PEV, Kehlet NP. Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout, their serological and pathogenic properties. *Nordisk Veterinaermedicin.* 1971;23(11):568-575.

Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 2006;441(7089):101-105.

Kelly RK, Souter BW, Miller HR. Fish cells lines: comparisons of CHSE-214, FHM, and RTG-2 in assaying IHN and IPN viruses. *J Fish Res Board Can.* 1978;35:1009- 1011.

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Birnaviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* New York, EUA: Academic Press; 2012:499–507.

Kollner B, Blohm U, Kotterba G, Fischer U. A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2001;11:127–142.

Korytár T, Jaros J, Verleih M, Rebl A, Kotterba G, Kühn C, Goldammer T, Köllner B. Novel insights into the peritoneal inflammation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 2013;35:1192-1199.

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

LaPatra SE. The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish. *Annu Rev Fish Dis.* 1997;6:1-28.

Larsen R, Rokenes TP, Robertsen B. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein. *J Virol.* 2004;78:7938-7944.

Lopez-Lastra M, Gonzalez M, Jashes M, Sandino AM. A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain-reaction (PCR). *J Fish Dis.* 1994;17(3):269-282.

Lowy RJ, Vavrina GA, LaBarre DD. Comparison of gamma and neutron radiation inactivation of influenza A virus. *Antiviral Res.* 2001;52(3):261–273.

Martinez-Alonso S, Vakharia VN, Saint-Jean SR, Pérez-Prieto S, Tafalla C. Immune

responses elicited in rainbow trout through the administration of infectious pancreatic necrosis virus-like particles. *Dev Comp Immunol.* 2012;36(2):378-384

McAllister PE, Owens WJ. Recovery of infectious pancreatic necrosis virus from the faeces of wild piscivorous birds. *Aquaculture.* 1992;106:227-232.

McBeath AJA, Snow M, Secombes CJ, Ellis AE, Collet B. Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish Shellfish Immunol.* 2007;22(3):230-241.

McKnight IJ, Roberts RJ. The pathology of infectious pancreatic necrosis. I. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *Br Vet J.* 1976;132:76- 85.

Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NSB, Kerr IM, Williams BRG, Hovanessian AG. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell.* 1990;62(2):379-390.

Milne SA, Galachacher S, Cash P, Porter AJR. A reliable RTPCR-ELISA method for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout. *J Virol Methods.* 2006;132(1-2):92-96.

Moreno-Eutimio MA, Tenorio-Calvo A, Pastelin-Palacios R, Perez-Shibayama C, Gil-Cruz C, López-Santiago R, Baeza I, Fernández-Mora M, Bonifaz L, Isibasi A, Calva E, López-Macías C. *Salmonella* Typhi OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties. *Immunology.* 2013;139(4):459-71.

Morley RS. A model for the assessment of the animal disease risk associated with the importation of animals and animal products. *Rev Sci Tech.* 1993;12:1055-1092.

Mulcahy D, Pascho RJ. Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish virus. *Science.* 1984;225:333-335.

Munang'andu HM, Evensen O. A Review of Intra- and Extracellular Antigen Delivery Systems for Virus Vaccines of Finfish. *J Immunol Res.* 2015;19.

Munang'andu HM, Fredriksen BN, Mutoloki S, Dalmo RA, Evensen Ø. Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Vet Res.* 2013a;44:7.

Munang'andu HM, Fredriksen BN, Mutoloki S, Dalmo RA, Evensen Ø. The kinetics of CD4+ and CD8+ T-cell gene expression correlate with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) vaccinated against infectious pancreatic necrosis. *Vaccine.* 2013b;31:1956–1963

- Munang'andu MH, Mutoloki S, Evensen O. Acquired immunity and vaccination against infectious pancreatic necrosis virus of salmon. *Dev Comp Immunol*. 2014a;43(2):184-196.
- Munang'andu HM, Mutoloki S, Evensen O. Chapter 3. Non-replicating Vaccines. In: Gudding R, Lillehaug A, Evensen O (ed) *Fish Vaccination*, 1st ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2014b:22-31.
- Munang'andu HM, Santi N, Fredriksen BN, Løkling KE, Evensen Ø. A Systematic Approach towards Optimizing a Cohabitation Challenge Model for Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One*. 2016;11(2):e0148467.
- Munro ES, Midtlyng PJ. Chapter 1. Infectious Pancreatic Necrosis and Associated Aquatic Birnaviruses. In: Woo PT, Bruno DW (ed) *Fish diseases and disorders*. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections, 2nd ed. Oxfordshire, UK: CABI; 2011:1-65.
- Neria-Arriaga DP. RT-PCR en tiempo real para la identificación del virus de la necrosis pancreática infecciosa en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) [tesis de maestría]. Cd. de México (Mex); 2016.
- Nishizawa T, Kinoshita S, Yoshimizu M. An approach for genogrouping of japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based in the VP2/NS junction region. *J Gen Virol*. 2005;86(7):1973-1978.
- Novoa B, Figueras A, Secombes CJ. Effects of in vitro addition of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leucocyte responses. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996;51(3-4):365-376.
- OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. 5th ed. Paris (Francia): 2006; Disponible en: <https://www.oie.int/doc/ged/D6510.PDF>.
- Ortega C, Enríquez R. Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). *Arch Med Vet*. 2007;39(1):7-18.
- Ortega SC, Montes de Oca R, Groman D, Yason C, Nicholson B, Blake S. Case report: Viral infectious pancreatic necrosis in farmed rainbow trout from Mexico. *J Aquat Anim Health* 2002;18(4):305-310.
- Ortega C, Rodríguez S, de las Heras AI, Romero A, Monrás M, Enríquez R. Evaluation of the level of Mx3 protein synthesis induced by infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains of different infectivity. *Vet immunol Immunopathol*. 2011;141(3-4):190-200.
- Ortega C, Valladares B. Analysis on the development and occurrence situation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farming in Mexico. *Rev Aquacult*. 2015;9(2):1-9.

Ortega SC, Vega F, Enríquez R. Occurrence of the infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Mexico. Presentado en: 13th International Conference of the European Association of Fish Pathologists. Grado, Italia, 17-21 Septiembre 2007.

Penagos G, Barato P, Iregui C. Sistema inmune y vacunación de peces. Acta biol. Colomb. 2009;14(1):3-24.

Pérez-Toledo M, Valero-Pacheco N, Pastelin-Palacios R, Gil-Cruz C, Perez-Shibayama C, Moreno-Eutimio MA, Becker I, Pérez-Tapia SM, Arriaga-Pizano L, Cunningham AF, Isibasi A, Bonifaz LC and López-Macías C. *Salmonella* Typhi Porins OmpC and OmpF Are Potent Adjuvants for T-Dependent and T-Independent Antigens. Front Immunol. 2017;8:230.

Pryde A, Melvin WT, Munro ALS. Nucleotide sequence analysis of the serotype-specific epitope of infectious pancreatic necrosis virus. Arch Virol. 1993;129(1-4):287-293.

Rauta PR, Samanta M, Dash HR, Nayak B, Das S. Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling pathways, expressions and immune responses. Immunol Lett. 2014;158:14-24.

Rimstad E, Hornes E, Olsvik O, Hyllseth B. Identification of a double-stranded RNA virus by using polymerase chain reaction and magnetic separation of the synthesized DNA segments. J Clin Microbiol. 1990;28(10):2275-2278.

Roberts RJ, Pearson M. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis. 2005;28(7):383–390.

Rodriguez SJ, Borrego JJ, Perez-Prieto SI. Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. J Virol Methods. 2001;97(1-2):23-31.

Rodríguez S-JS, Borrego JJ, Perez PSI. Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. Adv Virus Res. 2003;62:113-165.

Rombout JHWM, Yang G, Kiron V. Adaptive immune response at mucosal surfaces of teleost fish. Fish Shellfish Immunol. 2014;40(2):634-643.

Ronneseth A, Pettersen E, Wergeland HI. Neutrophils and B-cells in blood and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Fish Shellfish Immunol. 2006;20(4):610-620.

Rubio-Godoy M. Inmunología de los peces óseos. Revisión. Teleost fish immunology. Review. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 2010;1(1):47-57.

SAGARPA (2016) DOF (Diario Oficial de la Federación): Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. Primera sección. Publicado el 4 de mayo del 2016, México.

Salazar-González RM, Maldonado-Bernal C, Ramírez-Cruz NE, Rios-Sarabia N, Beltran-Nava J, Castanon-González J, Castillo-Torres N, Palma-Aguirre JA, Carrera-Camargo M, Lopez-Macias C, Isibasi A. Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol Lett.* 2004;93(2-3):115-122.

Salgado-Miranda C. Virulencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) [tesis de doctorado]. Cd. de México (Mex); 2014.

Salgado-Miranda C. Necrosis pancreática infecciosa: enfermedad emergente en la truiticultura de México. *Vet Méx.* 2006;37:467-477.

Salgado-Miranda C, Corona-Barrera E, Marín GRA, Palomares SME, Jurado CM, Ortega SC, Soriano-Vargas E. Prevalence and distribution of infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from commercial farms in Mexico. *World Aquaculture*, Veracruz, México, 25-29 September 2009.

Salgado-Miranda C, Loza-Rubio E, Rojas-Anaya E, García-Espinosa G. Viral vaccines for bony fish: past, present and future. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(5):567-578.

Salgado-Miranda C, Rojas-Anaya E, García-Espinoza G, Loza-Rubio E. Molecular characterization of the VP2 gene of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) isolates from Mexico. *J Aquat Anim Health.* 2014;26(1):43-51.

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

Santi N, Sandtrø A, Sindre H, Song H, Hong JR, Thu B, Wu JL, Vakharia VN, Evensen Ø. Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis in vitro and in vivo independent of VP5 expression. *Virology.* 2005;342(1):13-25.

Sanz F, Coll J. Techniques for diagnosing viral diseases of salmonid fish. *Dis Aquat Org.* 1992;13:211-223.

Schijns VEJC. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Crit Rev Immunol.* 2001;21(1-3):456-63.

Schmachtenberg O. Epithelial sentinels or protozoan parasites? Studies on isolated rodlet cells on the 100th anniversary of an enigma. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 2007;80:55-62.

Secundino I, López-Macías C, Cervantes-Barragán L, Gil-Cruz C., Ríos-Sarabia N, Pastelin-Palacios R, Villasis-Keever MA, Becker I, Puente JL, Calva E, Isibasi A. Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology*. 2006;117(1):59-70.

Seong SH. Application of radiation technology in vaccines development. *Clin Exp Vaccine Res*. 2015;4(2):145-158.

Sepulcre MP, Alcaraz-Perez F, Lopez-Munoz A, Roca FJ, Meseguer J, Cayuela ML, Mulero V. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation. *J Immunol*. 2009;182(4):1836-1845

Shivappa RB, Song H, Yao K, Aas-Eng A, Evensen Ø, Vakharia VN. Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. *Dis Aquat Org*. 2004;61(1-2):23-32.

Skjesol A, Skjæveland I, Elnæs M, Timmerhaus G, Fredriksen BN, Jørgensen SV, Krasnov A, Jørgensen JB. IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection. *Virol J*. 2011;8:396.

Smail DA, Bain N, Bruno DW, King JA, Thompson F, Pendrey DJ, Morrice S, Cunningham CO. Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. *J Fish Dis*. 2006;29(1):31-41.

Soliman H, Midtlyng PJ, El-Matbouli M. Sensitive and rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus by reverse transcription loop mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*. 2009;158(1-2):77-83.

Sommerset I, Krossoy B, Biering E, Frost P. Vaccines for fish aquaculture. *Exp Rec Vaccines*. 2005;4(1): 89-101.

Song H, Santi N, Evensen Ø, Vakharia VN. Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *J Virol*. 2005;79(16):10289-10299.

Sun B, Robertsen B, Wang Z, Liu B. Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Dev Comp Immunol*. 2009;33(4):547-558.

Tafalla C, Bogwald J, Dalmo RA. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol*. 2013;35(6):1740-1750.

Tafalla C, Bogwald J, Dalmo RA, Munang'andu HM, Evensen O. Chapter 7. Adjuvants in fish vaccines. En: Gudding R, Lillehaug A, Evensen O. Fish Vaccination, 1st ed. Oxford (UK): Wiley-Blackwell; 2014:68-84.

Taksdal T, Dannevig BH, Rimstad E. 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. 2001;21(5):214-219.

Taksdal T, Ramstad A, Stangeland K, Dannevig BH. Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in covertly infected Atlantic salmon *Salmo salar* L. post-smolts by stress exposure, by injection of IPN virus (IPNV) and by cohabitation. J Fish Dis. 1998;21(3):193-204.

Shankar KM, Yamamoto T. Prevalence and pathogenicity of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) associated with feral lake trout, *Salvelinus namaycush* (Walbaum). J Fish Dis. 1994;17(5):461-471.

Suzuki S, Hosono N, Kusuda R. Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription and nested PCR. Mar Biotechnol. 1997;5(4):205-209.

Ørpetveit I, Mikalsen AB, Sindre H, Evensen Ø, Dannevig BH, Midtlyng PJ. Detection of infectious pancreatic necrosis virus in subclinically infected Atlantic salmon by virus isolation in cell culture or real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage. J Vet Diagn Invest. 2010;22(6):886-895.

Tapia D, Eissler Y, Torres P, Jorquera E, Espinoza JC, Kuznar J. Detection and phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. Dis Aquat Org. 2015;116(3):173-84.

Thim HL, Villoing S, McLoughlin M, Christie KE, Grove S, Frost P, Jorgensen JB. Vaccine Adjuvants in Fish Vaccines Make a Difference: Comparing Three Adjuvants (Montanide ISA763A Oil, CpG/Poly I:C Combo and VHSV Glycoprotein) Alone or in Combination Formulated with an Inactivated Whole Salmonid Alphavirus Antigen. Vaccines. 2014;2(2):228-251.

Verde Rojo, E. Generación de una prueba para detectar anticuerpos contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) [tesis de maestría]. Cd. de México (Mex); 2018.

Villanueva AR, Galaz LJ, Valdés JA, Jashés MM, Sandino AM. Genome Assembly and Particle Maturation of the Birnavirus Infectious Pancreatic Necrosis Virus. J Virol. 2004;78(24):13829.

Wang T, Secombes CJ. The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2013;35(6):1703-1718.

Watts M, Munday BL, Burke CM. Immune responses of teleost fish. *Aust Vet J.* 2001;79(8):570-574.

Way-Shyan W, Yea-Ling W, Jainn-Shyan L. Single-tube, non-interrupted reverse transcription PCR for detection of IPNV. *Dis Aquat Org.* 1997;28(3):229-233.

Wolf K. *Fish viruses and fish virus diseases.* New York (EUA): Cornell University Press, Ithaca; 1988.

Wolf K, Quimby MC. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science.* 1962;135:1065-1066.

Wolf K, Quimby MC, Bradford A. Egg-associated transmission of IPN virus of trouts. *Virology* 1963;21:317- 321.

Zar JH. *Biostatistical analysis.* 5th ed. New Jersey (USA): Prentice Hall; 2010.

Zou J, Carrington A, Collet B, Dijkstra JM, Yoshiura Y, Bols N, Secombes C. Identification and bioactivities of IFN-gamma in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *J Immunol.* 2005;175:2484-2494.